

EUROPINIO IR AMERIKINIO GENOTIPŲ KIAULIŲ REPRODUKCIJOS IR KVĖPAVIMO SINDROMO VIRUSO (KRKSV) NUSTATYMAS IR DIFERENCIAVIMAS MODIFIKUOTA LIZDINE ATVIRKŠTINĖS TRANSKRIPCIJOS POLIMERAZĖS GRANDININE REAKCIJA (AT-PGR) VIENAME MĖGINTUVĖLYJE

Arūnas Stankevičius¹, Algirdas Šalomska¹, Marija Stankevičienė², Juozas Pieškus³

¹ Lietuvos veterinarijos akademijos veterinarijos institutas, Instituto g. 2, LT-4230 Kaišiadorys, tel.: 8 346 60691; el. paštas: arusta@one.lt

² Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-3022 Kaunas, tel.: 8-37 36 31 43; el. paštas: marija@lva.lt

³ Imunologijos institutas, Molėtų pl. 29, LT-2021 Vilnius, tel.: 8-5 246 9249

Santrauka. Lizdinė atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija (lizdinė AT PGR), atliekama viename mėgintuvėlyje, skirta kiaulių reprodukcinio ir kvėpavimo sindromo viruso (KRKSV) greitai identifikacijai. Šio tyrimo tikslas – supaprastinti lizdinę atvirkštinės transkripcijos polimerazinę grandininę reakciją ir pritaikyti ją europinio ir amerikinio genotipų KRKS virusams diferencijuoti. Bendra RNR išskirta iš virusais užkrėstų ląstelių kultūrų ir iš kiaulių kraujo serumo. RNR transkribuota (nukopijuota) ir amplifikuota (pagausinta) dviem metodais: įprastiniu trietačiu ir modifikuotu, atliekamu viename uždareme mėgintuvėlyje. Kiekvienam metodui panaudoti du oligonukleotidinių pradmenų rinkiniai. Pirmasis buvo specifiškas europinio genotipo KRKSV ir komplementarus ORF5 baltymą koduojančiai sričiai. Antrasis naudotas amerikiniui genotipui diferencijuoti nuo europinio. Įprastasis metodas atliktas 3 skirtinguose mėgintuvėliuose trim etapais: atvirkštinės transkripcijos (AT), polimerazinės grandininės reakcijos (PGR-I) ir lizdinės PGR. Atliekant lizdinę PGR viename mėgintuvėlyje, visi trys etapai vykdyti uždareme mėgintuvėlyje. AT-PGR-I reagentai dėti į mėgintuvėlio dugną, o lizdinės PGR komponentai, panaudojant polisacharidą trehalozę, imobilizuoti mėgintuvėlio dangtelyje. Užbaigus AT-PGR-I etapą, mėgintuvėlis buvo keletą kartų pavartomas, trumpai centrifuguojamas ir toliau atliekama lizdinė PGR. Tyrimai parodė, kad vieno lizdinės AT PGR, atliekamos uždareme mėgintuvėlyje, metodas, palyginti su įprastiniu lizdinės AT PGR arba AT-PGR-I metodu, yra labai jautrus ir mažiau linkęs į klaidingai teigiamus tyrimų rezultatus. Šiuo metodu galima pagerinti AT-PGR, naudojamą europinio ir amerikinio genotipų KRKSV padermėms nustatyti. Be to, mūsų tyrimai parodė, kad Lietuvos kiaulių populiacijoje paplitusi tik europinio genotipo KRKSV padermė.

Raktažodžiai: kiaulių reprodukcinio ir kvėpavimo sindromo virusas (KRKSV), lizdinė AT PGR, diferenciacija.

DETECTION AND DIFFERENTIATION OF EUROPEAN AND AMERICAN GENOTYPES OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV) BY MODIFIED ONE TUBE REVERSE TRANSCRIPTASE NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

Summary. A single tube nested RT-PCR was developed for rapid detection and identification of PRRSV. The aim of the study was to apply the simplified procedure of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT nested PCR) to diagnose European-type and American-type of PRRSV. Total RNA was extracted from virus-containing cell culture supernatant and porcine serum samples. RNA was reversely transcribed and amplified by two methods: the standard three steps and modified closed one-tube. Two sets of PCR primers were used for each method. The first, based on ORF5 European-type PRRSV genome, was specific only for European-type PRRSV strains. The second, designed on American-type PRRSV genome was used for identification of American-type PRRSV strains only. The standard method consisting of three steps was performed in 3 separate reaction tubes: RT, PCR and nested PCR. In the single-tube method all three steps were performed in a single closed tube. In this method reagents for RT-PCR step were deposited on the bottom of the tube, while reagents for nested PCR were immobilized in a tube cap using carbohydrate trehalose. After the RT-PCR step was completed the tube was vortexed, centrifuged and the nested PCR was performed. It can be concluded that the closed one tube RT-nested PCR method has been very sensitive and less prone to give false positive results compared to standard RT-nested PCR or RT-PCR, carried out in separate reaction tubes. The method could be an improvement over existing RT-PCR assays for PRRSV genotyping and diagnosis. Furthermore, our studies have indicated that only European-type of PRRSV was prevalent in the Lithuanian swine population.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), RT nested PCR, differentiation

Įvadas. Kiaulių reprodukcinis ir kvėpavimo sindromas (KRKS) iš pradžių vadintas „paslaptinąja kiaulių liga“, pasireiškusia paršavedžių reprodukcijos sutrikimais ir paršelių kvėpavimo sistemos patologija, pirmą kartą pastebėtas JAV 1987 m. (Loula, 1990).

Tačiau Europoje ligos sukėlėjas izoliuotas tik 1990 m., o JAV – 1992 m. (Weensvoort ir kt., 1991; Collins ir kt., 1992). Jis pavadintas kiaulių reprodukcinis ir kvėpavimo sindromo virusu (KRKSV), priklausančiu *Arterivirus* genčiai. Elektroninės mikroskopijos metodais nustatyta,

kad KRKSV yra rutuliškas, maždaug 50–65 nm skersmens, turintis 30–35 nm nukleokapsidę (Benfield ir kt., 1992). Jis priklauso teigiamos RNR virusų grupei. Jo genomas apytikriai 15 kb, turi aštuonis atvirus nuskaitymo rėmelius (ORF) (Meulenberg ir kt., 1993). ORF 1a ir 1b sritis koduoja polimerazę, o ORF5-7 nukleotidų sekos –pagrindinius struktūrinius viriono baltymus (Meuklenberg ir kt., 1995). Vėlesni tyrimai įrodė, kad amerikinio ir europinio genotipų KRKSV labai skiriasi ne tik nukleotidų seka, bet ir antigenais. Pagal ORF sekas numatomų viruso baltymų sekų analizė parodė, kad minėtų genotipų KRKSV baltymų homologiškumas yra tik apie 50–70 %, išskyrus ORF6 koduojančius produktus, kurių homologiškumas – apie 80 % (Katz ir kt., 1995; Kwang ir kt., 1994; Mardassi ir kt., 1994; Mardassi ir kt., 1995; Meng ir kt., 1994).

KRKSV dažniausiai tirti ir identifikuoti klasikiniiais virusologijos metodais, ypač viruso izoliavimu ląstelių kultūroje. Tačiau problemą kėlė tam tikros biologinės KRKSV savybės: europinio genotipo KRKSV praktiškai nesidaugina persėjamųjų linijų ląstelėse. Virusams izoliuoti nuolat reikia kiaulių alveolinių makrofagų, kurių pirminę ląstelių kultūrą labai sunku paruošti, neįmanoma ilgiau kultivuoti, virusams nustatyti nuolat reikia 6 savaičių paršelių, neturėjusių kontaktų su KRKSV padermėmis. Dėl to KRKSV kontrolė įprastiniais virusologijos metodais (imunoflorescencija, imunoperoksidazės reakcija, viruso neutralizacija ir kt.) yra labai brangi, ilga ir sudėtinga. Būtinai reikia paminėti, kad persėjamųjų linijų ląstelėse įmanoma išlaikyti ir pagausinti tik amerikinio genotipo virusus. Jie sėkmingai kultivuoti CL 2621 ir MARC-145 linijų ląstelėse, kurios buvo gautos iš beždžionių inkstų ląstelių MA-104 (Batistuta ir kt., 1993; Kim ir kt., 1993). Tuo tarpu europinio genotipo KRKSV padermės gerai dauginasi tik alveoliniuose makrofaguose (Wensvoort ir kt., 1991). Todėl europinio genotipo KRKSV identifikavimas, moksliniai tyrimai, ligos kontrolė kelia problemų. Svarbu tai, kad net turint tinkamą kiaulių alveolinių makrofagų kultūrą, kartais virusų neįmanoma izoliuoti todėl, kad tiriamoji patloginė medžiaga, ypač kuilių sperma, gali būti labai toksiška ląstelių kultūroms, kuriose bandoma KRKSV identifikuoti, ir todėl negalima atlikti tyrimų. Kai kurių vietinių KRKSV padermių kartais iš viso neįmanoma pagausinti pirminėse ląstelių kultūrose.

Pastaraisiais metais amerikinio ir europinio genotipų KRKS virusams nustatyti ir diferencijuoti taikyti cDNR amplifikavimo metodai. Jais tiriamojame medžiagoje nustatyti netgi labai nedideli nukleorūgšties kiekiai. AT ir PGR metodu sėkmingai pavyko pritaikyti KRKS virusams identifikuoti oligonukleotidiniais pradmenimis iš ORF 1–7 genomo regionų (Madrassi ir kt., 1994; Suarez ir kt., 1994; Gilbert ir kt., 1997; Larochelle ir kt., 1997; Legeay ir kt., 1997). Tačiau pasiūlytos pradmenų sekos nebuvo pakankamai specifinės visoms Europoje ir Amerikoje paplitusioms vietinėms KRKSV padermėms. Ypač daug netikslumų pasitaikydavo, kai reikėdavo AT-PGR metodu diferencijuoti „laukines“ europinio KRKSV padermes nuo vakcininės amerikinio tipo padermės tuose ūkiuose,

kur kiaulės pradėtos imunizuoti gyva, nusilpninta amerikinio genotipo KRKSV vakcina *Ingelvac PRRS MLV*. Todėl buvo pasiūlyta panaudoti ORF5 ir ORF7 genomo regionus atitinkančius oligonukleotidinius pradmenis. Tai labai padidino ne tik AT-PGR metodo jautrumą, specifiškumą, bet ir tikslumą, diferencijuojant skirtingų genotipų KRKSV (Oleksiewicz ir kt., 1998; Spagnuolo-Weaver ir kt., 1998). Pastaruoju metu europinio ir amerikinio genotipų KRKS virusams nustatyti ir diferencijuoti pasiūlytas *TaqMan* AT-PGR metodas, kuriuo ne tik kokybiškai identifikuojama KRKSV nukleorūgštis, bet ir nustatomas amplifikuoto produkto kiekis (Egli ir kt., 2001).

Apie KRKSV nustatymą ir diferenciaciją AT-PGR nemažai rašoma mokslo literatūroje. Tačiau šis metodas, ypač lizdinė AT-PGR, plačiau netaikomas ne tik mokslo tikslams, bet ir rutininei KRKSV diagnostikai dėl labai dažnai pasitaikančių klaidingai teigiamų rezultatų. Tyrimų metu reikia 2–3 kartus atidaryti ir vėl uždaryti reakcijos mėgintuvėlius, o tai didina pavojų užteršti tiriamąjį mėginį pašaline KRKS viruso RNR arba cDNR. KRKS virusams nustatyti nebeužtenka vien tik įprastinės AT-PGR, nes virusinė KRKS infekcija retai kada būna ūmios eigos, kiaulių organizme cirkuliuoja arba iš jo į aplinką išskiriama labai mažai virusų, todėl šiems virusams nustatyti ir juos diferencijuoti būtinai reikia gerokai (bent 100–1000 kartų) jautresnių molekulinės biologijos metodų, pvz., lizdinės AT-PGR.

Apie KRKSV paplitimą Lietuvos kiaulių bandose pirmą kartą pranešta 2000 m. (Janutėnaitė ir kt., 2000). Paskelbti duomenys pagrįsti tik imunofermentine antikūnų analize (IFA), kuria autoriams pavyko nustatyti, kad Lietuvos kiaulių ūkiuose paplitusios abiejų genotipų KRKS virusų padermės. Išsamesnių tyrimų neatlikta, o gauti duomenys visiškai neatitinka daugelio kitų Europos mokslininkų atliktų tyrimų rezultatų, kurie rodo, kad „laukinio“ amerikinio genotipo KRKSV nenustatoma. KRKSV paplitimas 1997–2001 m. analizuotas antikūnų IFA (Stankevičienė ir kt., 2002). Patys virusai netyrinėti molekulinės biologijos metodais. Kadangi tik keliuose Lietuvos ūkiuose pradėtos naudoti amerikinio tipo vakcinos, tai labai svarbu išsiaiškinti, ar šis „laukinis“ virusas nėra paplitęs kituose Lietuvos ūkiuose, ar AT-PGR tinkama europinio ir amerikinio genotipų KRKS virusams diferencijuoti, ar pakankamai gerai parinktos pradmenų sekos iš ORF5 regiono.

Darbo tikslas – supaprastinti lizdinę AT-PGR ir atlikti ją viename uždareme mėgintuvėlyje, optimizuoti lizdinės PGR taikymą amerikinio ir europinio genotipų KRKS virusams diferencijuoti, panaudojant keturias poras oligonukleotidinių pradmenų iš ORF5 baltymą koduojančios srities, išbandyti metodą rutininei KRKSV diagnostikai, išsiaiškinti, kokio genotipo KRKSV padermės paplitusios Lietuvos kiaulių populiacijoje.

Medžiagos ir metodai. Tyrimams naudota europinė KRKSV padermė „*Lelystad*“ ir amerikinė KRKSV padermė „VR-2332“, gautos iš Lenkijos nacionalinio veterinarijos instituto. Virusai pagausinti MARC-145 ląstelių kultūroje, tiriamoji medžiaga užkrėsta

eksperimentiškai.

RNR išskyrimas. Tyrimams naudota KRKS virusų RNR, išskirta iš kiaulių kraujo serumo mėginių. Šiam tikslui naudotas išskiriamasis rinkinys „Total RNA Prep Plus“, kurio veikimas pagrįstas modifikuotu Chomczynskio metodu (Chomczynski ir Sacchi, 1987). Visa RNR izoliavimo procedūra buvo atlikta pagal gamintojų (A&A Biotechnology, Gdynė, Lenkija) pateiktą aprašymą. 250 µl tiriamojo serumo su 800 µl fenozolo, kuris sukelia visišką ląstelių lizę, 5 min. inkubuota 50 °C temperatūroje. Įpylus 200 µl chloroformo, mišinys 15 s intensyviai kratytas (MS1 Minishaker purtykle), 3 min. laikytas kambario temperatūroje ir 10 min. centrifuguotas (10 tūkst.aps./min). Paviršinė frakcija perkelta į kitą mėgintuvėlį, užpilta 250 µl izopropanolio, išmaišyta, vėl perkelta į kitą mėgintuvėlį, turintį specialią membraną, imobilizuojančią RNR, ir 1 min. centrifuguota (10 tūkst.aps./min). Šioje stadijoje virusų RNR molekules, prisitvirtinusios membranos struktūroje, tris kartus plautos specialiu tirpalu, turinčiu 96 ° etanolio. 700 µl šio plaunamojo tirpalo užpilta ant membranos su RNR,

2 min. centrifuguota (10 tūkst.aps./min). Ant membranos užpilta dar 100 µl vandens, neturinčio Rnazių ir kitų inhibitorinių medžiagų (DEPC vanduo). Bendra ekstrahuota RNR naudota kaip matrica lizdinei atvirkštinės transkripcijos polimerazinei grandinei reakcijai (AT-PGR), atliekamai viename mėgintuvėlyje.

AT-PGR. Įprastinė AT-PGR-I atlikta pagal Oleksiewicziaus ir kt. (1998) pateiktą metodiką. Pirmiausia ruošti reagentai antrajam, t.y. lizdinės PGR, etapui. Šiam tikslui ruoštas reakcijos mišinys, kuriame yra 5 µl 22 % trechalozės (Sigma), naudojamos kitiems reakcijos komponentams išlaikyti, 20 pmol/µl kiekvieno iš vidinių nukleotidų pradmenų EUORF5F ir EUORF5R (Suarez ir kt., 1996) arba USORF5B, USORF5C (1 lentelė), 1 µl dNTPs mišinio (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 mM tirpalo, 0,25 µl Taq DNA polimerazės (1,25 U, Fermentas, Vilnius). Į kiekvieno 0,2 ml Eppendorf mėgintuvėlio dangtelį tokio lizdinės PGR mišinio įpilta po 8,25 µl ir palikta 2 val. kambario temperatūroje džiuoti. Taip išdžiovinti lizdinės PGR reagentai tinkami naudoti 6 mėn.

1 lentelė. Lizdinei AT PGR panaudoti oligonukleotidų pradmenys

Pradmenys	Oligonukleotidų pradmenų pavadinimai	Kryptis 5'→3'	Oligonukleotidų pradmenų seka 5'--3'	AT-PGR produkto ilgis bp	Genomo regionas (šaltinis)	
Europinio genotipo KRKSV	EUOR F5B	Išoriniai	→	CAATGAGGTGGGCIACAACC	719	ORF5 (Oleksiewicz ir kt., 1998)
	EUOR F5C		←	TATGTIATGCTAAAGGCTAGCAC		
	ORF 5F	Vidiniai	→	ATGAGATGTTCTCACAAATTGGGGCG	606	ORF5 (Suarez ir kt., 1996)
	ORF 5R		←	CTAGGCCTCCCATTGCTCAGCCGAAGT		
Amerikinio genotipo KRKSV	208F	Išoriniai	→	GTACGGCGATAGGGACACC	914	ORF5 (Umthun ir kt., 1999)
	331R		←	CCAGAATGTACTTGCGGCC		
	USORF5B	Vidiniai	→	GCTCCATTTTCATGACACCTG	818	ORF5 (Meulenberg ir kt., 1993)
	USORF5C		←	AAAGGTGCAGAAGCCCTAGC		

Kitu etapu naudoti tie patys 0,2 ml Eppendorf mėgintuvėliai, į kurių kamšteliuos dėta trechalozėje išdžiovintų lizdinės PGR komponentų. AT ir PGR-I atlikta šių mėgintuvėlių dugne. Amplifikacijai naudota 50 µl tokio mišinio: 5 µl bendros RNR, 5 µl 10xPGR buferio (100 mM Tris-HCH, pH 8,8, 500 mM KCl, 0,8 % nonidet P40, Fermentas), 5µl MgCl₂ (25 mM, Fermentas), 2 µl dNTPs (10 mM, Fermentas), po 5 pmol išorinių pradmenų EUORF5B ir EUORF5C arba 208F, 331R, 1 µl 10 % tritonX-100 (Sigma), 0,5 µl (2,5 U) Taq DNA polimerazės (Fermentas), 0,2 µl (10 U) RNasin (Fermentas) ir 0,5 µl (100U) MMLV reversinės transcriptazės (Fermentas) ir 29,25 µl DEPC vandens. AT-PGR mišiniui, esančiam mėgintuvėlio dugne, atskirti nuo lizdinės PGR komponentų mėgintuvėlio kamštelyje

naudotas mineralinis aliejus (Sigma). Lizdinė vieno mėgintuvėlio AT PGR atlikta amplifikatoriuje *Mastercycler*® (Eppendorf). Sumaišius RNR ir AT-PGR-I mišinius, AT 30 min. vykdyta termocikleryje 42 °C temperatūroje. AT fermentai inaktyvuoti 5 min. kaitinant 95 °C temperatūroje. Po to iš karto vykdyta 20 ciklų amplifikacijos reakcija: 1 min. cDNR denatūruota 94 °C temperatūroje, 1 min. hibridinta su specifiniais pradmenimis 55 °C temperatūroje, 1 min. cDNR ilginta 72 °C temperatūroje. Pasibaigus pirmajam amplifikacijos etapui, mėgintuvėliai kelis kartus pavartyti, kad susimaišytų ir ištirptų lizdinės PGR komponentai mėgintuvėlio dangtelyje ir PGR-I produktai, esantys dugne. Po to mėgintuvėliai trumpai centrifuguoti. Toliau per 35 amplifikavimo ciklus vykdyta lizdinė PGR:

1 min.94 °C, 1 min. 55 °C, 1,5 min. 72 °C temperatūroje. Amplifikavimui galutinai užbaigti cDNR 10 min. ilginta 72 °C temperatūroje.

AT-PGR amplifikacijos produktai analizuoti 1,5 % agarozės gelyje (Top Vision™ GQ Agarose, Fermentas), dažytame 1 µg/ml koncentracijos etidžio bromidu. Atlikta 10 µl PGR produkto elektroforezė 1xTBE buferyje (90mM Tris, 90mM boro rūgštis, 2 mM EDTA), 45 min. leidžiant 120 V srovę. PGR rezultatai vertinti UV spindulių lempos šviesoje: DNR juostelės specifiskai švytėjo 606 bp molekulinių žymeklių GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas) atitinkančioje pozicijoje.

KRKSV nukleotidų sekų analizei naudota kompiuterinė programinio paketo *Lasergene* programa. Statistinė duomenų analizė atlikta kompiuterine „Graph Prism™“ programa. Apskaičiuotas Stjudento patikimumo koeficientas (p). Duomenys laikyti patikimais, kai $p < 0,05$.

Tyrimų rezultatai. Atliekant lizdinę AT-PGR viename mėgintuvelyje arba įprastinę AT-PGR skirtinguose mėgintuvėliuose (atskirai AT, PGR-I ir lizdinę PGR) su ORF5 regiono pradmenimis (žr. 1 lentelę), buvo gauti tie pat specifiniai amplifikavimo 606 bp produktai (1 pav.), kurių dydis atitiko norimą amplifikuoti europinio KRKSV „*Lelystad*“ padermės genomo regioną. Eksperimentiškai buvo nustatyta, kokia yra optimali lizdinei viename mėgintuvelyje atliekamai AT-PGR hibridizacijos temperatūra ir MgCl₂ koncentracija (duomenys nepateikti). Tais pačiais metodais tiriant amerikinio genotipo KRKSV „VR-2332“ padermę, specifinių amplifikavimo produktų nebuvo gauta. Kiekvienos KRKSV padermės AT-PGR tyrimai buvo atliekami po penkis kartus, ir visais atvejais gauti rezultatai nesiskyrė.

Atliekant lizdinę AT-PGR viename mėgintuvelyje arba įprastinę AT-PGR skirtinguose mėgintuvėliuose su amerikinio genotipo pradmenimis, specifiniai amplifikavimo 818 bp produktai buvo gauti tik su VR-2332 mėginiais (2 pav.). Reakcijas pakartojus penkis kartus, buvo gauti tokie pat tyrimų rezultatai. Viename tiriamajame mėginyje sumaišius europinio ir amerikinio genotipų padermes, specifiniai AT-PGR produktai buvo nustatomi atsižvelgiant į oligonukleotidinius pradmenis, naudotus reakcijose. Visais atvejais AT-PGR produktą buvo galima lengvai diferencijuoti atsižvelgiant į jo 606 bp arba 818 bp molekulinę masę.

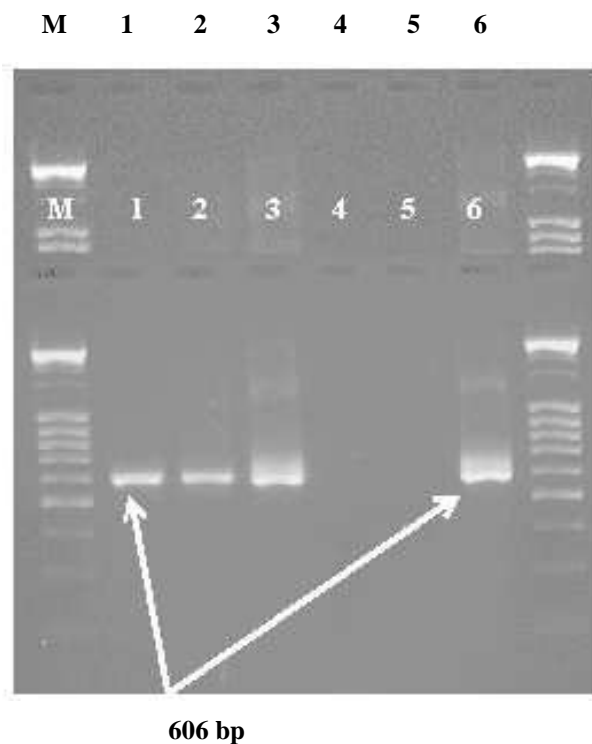
Viename mėgintuvelyje atliekamos lizdinės AT-PGR specifiskumas buvo išbandytas su kitais RNR virusais. Eksperimentiniai mėginiai su pestivirusinėmis „NADL“, „NY“ galvijų virusinės diarejos viruso (GVDV) ir „Alfort“ klasikinio kiaulių maro viruso (KKMV) padermėmis negeneravo specifinių AT-PGR produktų. Neigiami tyrimų rezultatai buvo gauti ir lizdine AT-PGR tiriant neužkrėstų MARK-145 ląstelių kultūrų mėginius, taip pat dejonizuotą vandenį arba persistentiškai neužkrėstų KRKSV kiaulių kraujo serumą.

Lizdinės viename mėgintuvelyje atliekamos AT-PGR reakcijos jautrumas buvo patikrintas lyginant modifikuotą metodą su įprastos AT-PGR-I arba trietapės lizdinės AT-PGR metodais (2 lentelė). Kiekvienu metodu tyrimus pakartojus penkis kartus, gauti tokie pat rezultatai, bet

dviem tyrimams įprastine trietape AT-PGR naudotų kai kurių neigiamos kontrolės mėginių rezultatai gauti klaidingai teigiami. Įprastinės ir viename mėgintuvelyje atliekamos lizdinės AT-PGR rezultatai sutapo, bet pirmuoju metodu teigiamais buvo nustatyti ir tokie mėginiai, kuriuose KRKSV negalėjo būti, pvz., labai praskiestuose (iki 10⁻⁷ arba 10⁻⁸) neigiamos kontrolės mėginiuose. Visais atvejais lizdinė PGR buvo bent jau 100 kartų jautresnė už įprastą AT-PGR-I, o specifiniai pirmosios reakcijos produktai agarozės gelyje ryškesni. Teigiami AT-PGR, atliekamos viename mėgintuvelyje, rezultatai buvo gauti KRKSV europinio genotipo padermę praskiedus net iki 10⁻⁵, o amerikinio genotipo – net iki 10⁻⁶.

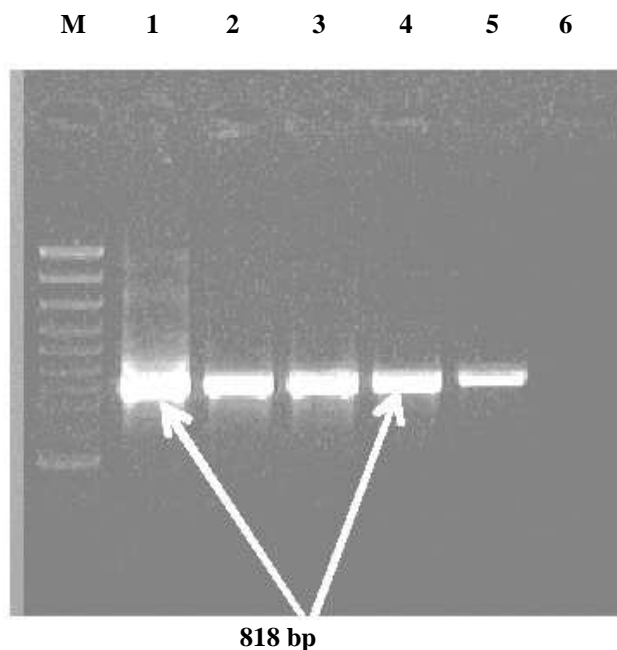
Išbandytas ir lizdinės AT-PGR, atliekamos viename mėgintuvelyje, tinkamumas rutiniams persistentiškai KRKSV užsikrėtusių kiaulių tyrimams. Atsitiktinai parinkti ir trimis metodais ištirti įvairaus amžiaus kiaulių kraujo serumo, kuriame IFA nustatyta specifinių antikūnų (Stankevičienė ir kt., 2002), mėginiai. Naudoti europinio ir amerikinio genotipų KRKSV oligonukleotidiniai pradmenys (žr. 1 lentelę). Kad būtų galima nustatyti, kokio genotipo KRKSV yra paplitęs Lietuvos kiaulių populiacijoje, kraujo serumo mėginiai atrinkti atsižvelgiant tik į IFA antikūnų titrą. Vieno ūkio buvo tirama ne daugiau kaip 10 įvairaus amžiaus kiaulių kraujo serumo mėginių. Tyrimų rezultatai parodė, kad lizdine AT-PGR, atliekama viename mėgintuvelyje, kaip ir įprastine trietape AT-PGR, galima identifikuoti visas kiaules, kurios yra KRKSV nešiotijos, nesvarbu, kokio genotipo virusas persistuoja kraujo serume (2 lentelė). Jokių duomenų skirtumų nepastebėta, tik statistiškai patikimų skirtumų nustatyta tarp AT-PGR-I ir įprastinės lizdinės AT-PGR bei modifikuotos, viename mėgintuvelyje atliekamos lizdinės AT-PGR rezultatų ($p < 0,05$). Lizdine AT-PGR, atlikta su europinio tipo pradmenimis, statistiškai patikimai buvo nustatyta 2,8 karto daugiau KRKSV užkrėstų mėginių, negu tiriant įprastą AT-PGR-I. Pastebėta, kad KRKSV buvo identifikuotas 44–80 dienų kiaulių kraujo serumo mėginiuose. Amerikinio genotipo KRKSV nustatytas tik viename šiaurės Lietuvos ūkyje, kuriame kiaulės vakcinuotos gyva amerikinės KRKSV padermės vakcina. Atkreiptinas dėmesys į tai, kad 4 kraujo serumo mėginiuose, kuriuose aptikta amerikinio genotipo KRKSV, su kitais oligonukleotidiniais pradmenimis buvo nustatyta ir europinio genotipo KRKSV.

Aptarimas. Nors AT-PGR, ypač įprasta lizdinė AT-PGR, yra labai jautri, specifiška ir greita, bet ji yra daugiaetapė. Reakcijos metu tenka net keletą kartų atidaryti mėgintuvėlius, todėl kyla pavojus atsitiktinai užteršti mėginius pašaline virusine RNR ir gauti klaidingai teigiamus rezultatus. Tai smarkiai riboja tiek įprastinės AT-PGR, tiek lizdinės PGR taikymą virusinių ligų diagnostikai ir moksliniams tyrimams. Yra nemažai duomenų, patvirtinančių, kad dėl mėginių ir jų reakcijos produktų perkėlimo iš mėgintuvėlio į mėgintuvėlį, dėl mėgintuvėlių atidarymo reagentams įdėti, dėl daugelio atskirų reakcijos etapų ir temperatūrinių ciklų, šio labai jautraus metodo negalima efektyviai taikyti rutininėje diagnostikoje (McGoldrick ir kt., 1999).



1 pav. Lizdinės vieno mėgintuvėlio AT-PGR produktai 1,5 % agarozės gelyje su europinio genotipo KRKSV pradmenimis:

M- molekulinės masės žymeklis GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Viena juostelė atitinka 100 bp PGR produkto ilgį; 1 – Europinio genotipo KRKSV identifikavimas kiaulių kraujo serume. Susidaręs specifinis 606 bp ilgio produktas įrodo, kad lizdinė vieno mėgintuvėlio AT-PGR gali būti tinkama persistentiškai užkrėstiems individams bandoje nustatyti; 2 - KRKSV nustatymas kiaulių kraujo serume įprastine trijų mėgintuvėlių lizdine AT-PGR. Gauti rezultatai rodo, kad modifikuoto ir įprastinio lizdinės AT PGR metodų rezultatai yra identiški, bet galimybė užteršti mėginus pašaline RNR arba cDNR sumažėja taikant būtent vieno mėgintuvėlio lizdinę AT-PGR; 3 – europinio genotipo KRKSV padermės „Lelystad“ amplifikavimo rezultatai eksperimentiškai užkrėtus kiaulių kraujo serumą virusine paderme, kurios koncentracija prieš RNR ekstrakciją buvo 10^{-3} ; 4 – amerikinio genotipo KRKSV padermės „VR-2332“ amplifikavimo, naudojant europinio genotipo oligonukleotidinius pradmenis, rezultatai. Nesusidaręs specifinis PGR produktas leidžia kraujo serumo mėginiuose atskirti europinio ir amerikinio genotipo KRKSV; 5 - Pestivirusų amplifikavimo su europinio tipo KRKSV pradmenimis rezultatai. Specifinio produkto nesusidaro; 6 - KRKSV „Lelystad“ netirtuota padermė, panaudota kaip teigiama AT-PGR kontrolė. Susidarė labai aiškus specifinis PGR produktas. PASTABA. skaičiais pažymėti takeliai agarozės gelyje, kuriuose matomi PGR produktai.



2 pav. Lizdinės vieno mėgintuvėlio AT-PGR produktai 1,5 % agarozės gelyje su amerikinio genotipo KRKSV „VR-2332“:

M- molekulinės masės žymeklis GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Viena juostelė atitinka 100 bp PGR produkto ilgį. 1 – amerikinio genotipo KRKSV (VR-2332) kiaulių kraujo serume. Susidaręs specifinis 818 bp ilgio produktas rodo, kad tiriamajame mėginyje lizdine vieno mėgintuvėlio AT-PGR galima identifikuoti amerikinio genotipo KRKSV virusus; 2 – amerikinio genotipo KRKSV kiaulių kraujo serume taip pat buvo nustatyti ir įprastine trijų mėgintuvėlių lizdine AT-PGR. Gauti rezultatai įrodo, kad modifikuoto ir įprastinio lizdinės AT PGR metodų rezultatai yra identiški; 3, 4 – amerikinio genotipo KRKSV padermių Lietuvos kiaulių populiacijoje pavyko nustatyti tik viename ūkyje, kuriame kiaulės buvo pradėtos vakcinuoti gyva vakcina *Ingelvac* PRRS MLV. Tuose pačiuose kraujo serumo mėginiuose buvo ir europinio genotipo KRKSV RNR, nes AT-PGR buvo teigiama ir su europinio tipo oligonukleotidiais pradmenimis; 5 - teigiami vieno mėgintuvėlio lizdinės AT-PGR rezultatai buvo gauti net atskiedus KRKSV amerikinio genotipo padermę iki 10^{-6} ; 6 - neigiamas vieno mėgintuvėlio lizdinės AT-PGR rezultatas buvo gautas amplifikuojant europinio genotipo padermę „Lelystad“. PASTABA. Skaičiais pažymėti takeliai agarozės gelyje, kuriuose matoma PGR produktų.

2 lentelė. Kiaulių kraujo serumo mėginių tyrimų įvairiais AT-PGR metodais rezultatai

AT-PGR metodas	Europinio genotipo KRKSV pradmenys ir amplifikuoto produkto dydis	Iš viso ištirta kiaulių kraujo serumo mėginių	AT-PGR rezultatas		Amerikinio genotipo KRKSV pradmenys ir amplifikuoto produkto dydis	Iš viso ištirta kiaulių kraujo serumo mėginių	AT-PGR rezultatas	
			Teigiamų skaičius	Neigiamų skaičius			Teigiamų skaičius	Neigiamų skaičius
AT-PGR I	EUORF5B ir EUORF5C 719 bp	165	5*	160*	208F, 331R 886 bp	165	0*	165
Trijų mėgintuvėlių lizdinė AT-PGR	EUORF5B, EUORF5C, ORF5F, ORF5R 606 bp	165	14*	151*	208F, 331R USORF5B, USORF5C 818 bp	165	4	161
Vieno uždaro mėgintuvėlio lizdinė AT-PGR	EUORF5B, EUORF5C, ORF5F, ORF5R 606 bp	165	14*	151*	208F, 331R USORF5B, USORF5C 818 bp	165	4	161

* – skirtumas statistiškai patikimas ($p < 0,05$)

KRKS virusams nustatyti ir diferencijuoti išbandytas ir optimizuotas lizdinės AT-PGR, atliekama viename mėgintuvėlyje metodas, pranašesnis tuo, kad juo išvengiama tiriamųjų mėginių atsitiktinio užteršimo pašaline RNR (3 lentelė). Tuo tarpu kelių tyrimų AT-PGR arba lizdinės AT-PGR, atliktų atskiruose mėgintuvėliuose, rezultatai buvo klaidingai teigiami. Pagrindinis mūsų pritaikyto ir išbandyto metodo privalumas yra tas, kad visi AT-PGR etapai, t.y. AT, PGR-I, lizdinė PGR, vykdyti neatidarant mėgintuvėlio, iš karto sudėjus visus reagentus ir tiriamąją RNR. Lizdinės PGR reagentai buvo išdžiovinami mėgintuvėlių dangteliuose, o AT, ir PGR-I reagentai kartu su RNR dedami į mėgintuvėlio dugną. Dugne esančioms medžiagoms atskirti nuo lizdinės PGR komponentų naudotas mineralinis aliejus. Ankstesni tyrimai įrodė, kad Taq polimerazė, dNTPs ir oligonukleotidų pradmenys, išdžiovinti trechalozėje, lieka aktyvūs net 6 mėn. (Wolff ir kt., 1995). Atlikus AT ir PGR-I, mėgintuvėliai buvo apverčiami ir pirmosios PGR komponentai sumaišomi su išdžiovintais lizdinės PGR pradmenimis ir kitais reagentais. Atkreiptinas dėmesys į tai, kad termostabilus reakcijos fermentas Taq DNR polimerazė yra neaktyvus iki 95 °C. Todėl AT etapu, kai temperatūra yra tik 42 °C, temperatūrų polimerazė būna neaktyvi, bet po to suaktyvinama 5 min. palaikant 95 °C temperatūros. Tai leidžia kartu inaktyvuoti ir AT fermentą. Po trumpo centrifugavimo amplifikacija vykdyta toliau, tik jau su vidiniais pradmenimis. Pirmą kartą polisacharidas trechalozė panaudotas lizdinei PGR, tyrinėjant žmonių virusus (Wolff ir kt., 1996). A. McGoldrickis ir kt. (1999) lizdinės AT-PGR, atliekamos viename mėgintuvėlyje principą panaudojo KKMV ir kitiems pestivirusams diferencijuoti, bet KRKSV šis metodas nebuvo pritaikytas. Mokslo literatūroje yra labai nedaug duomenų apie trietapės lizdinės AT-PGR taikymą KRKSV diagnostikai, kai oligonukleotidiniai pradmenys buvo pasirinkti iš atitinkamų ORF1; ORF6 arba ORF7

KRKSV genomo regionų (Kono ir kt., 1996; Gilbert ir kt., 1997; Guarino ir kt., 1999).

Mūsų pasirinkti oligonukleotidų pradmenys iš ORF5 regiono (žr. 1 lentelė) leido amplifikuoti specifinius europinio genotipo KRKSV PGR 606 bp produktus (1 pav.) arba amerikinio genotipo KRKSV PGR 818 bp produktus (žr. 2 pav.). Atlikti tyrimai įrodė, kad su ORF5 genomo sričiai komplementarūs pradmenys sudarė sąlygas tiriamojoje medžiagoje nustatyti tiek europinio, tiek amerikinio genotipo KRKSV cDNR. Mūsų nuomone, lizdinė AT-PGR, atliekama viename mėgintuvėlyje, yra labai patogi europinėms arba amerikinėms KRKSV padermėms identifikuoti tiriamojoje medžiagoje, nes reakcijos mišinys su skirtingais oligonukleotidiniais pradmenimis galima amplifikuoti naudojant tą pačią amplifikavimo programą (žr. 3 lentelė). Taigi lizdinė AT-PGR, atliekama viename mėgintuvėlyje, tinkama ne tik eksperimentiniams tyrimams, bet ir rutininei diagnostikai.

Palyginus trijų skirtingų PGR metodų jautrumą, paaiškėjo, kad lizdinė AT-PGR yra bent jau 100 kartų jautresnė už įprastą AT-PGR-I (žr. 3 lentelė). Mėginiuose su skirtingomis KRKSV padermėmis trietape lizdine ir viename mėgintuvėlyje atliekama lizdine AT-PGR gauta specifinių amplifikavimo produktų net ir tuo atveju, kai virusų padermės būdavo praskiestos iki 10^{-5} (europinio genotipo) arba 10^{-6} (amerikinio genotipo). Lizdinės viename mėgintuvėlyje atliekamos AT-PGR specifiniai produktai agarozės gelyje buvo matomi daug geriau negu įprastos AT-PGR-I. Be to, modifikuotos lizdinės AT-PGR rezultatus galima įvertinti vidutiniškai jau po 9–10 val., tuo tarpu įprasto metodo rezultatai gaunami ne anksčiau kaip po 24 val. vieno uždaro mėgintuvėlio lizdinę AT-PGR daro ypatingai patrauklią ir vertingą KRKSV identifikavime. Taigi dėl greitesnio KRKSV nustatymo ir mažesnės tikimybės atsitiktinai užteršti mėginius pašaline KRKSV RNR arba cDNR, lizdinė vieno mėgintuvėlio AT-PGR gali būti labai naudinga rutininei KRKSV diagnostikai.

3 lentelė. Įvairių AT-PGR metodų, KRKSV padermėms nustatyti, jautrumo palyginamasis įvertinimas

Viruso padermė	AT-PGR metodas	Virusų praskiedimas mėginyje prieš RNR išskyrimą									
		pradinis	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	neigiama kontrolė
KRKSV europinio genotipo "Lelystad" padermė	AT-PGR-I	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-*	-*
	Trijų mėgintuvėlių lizdinė AT-PGR	+++	+++	++	++	++	+	-	-*	-	-*
	Vieno uždaro mėgintuvėlio lizdinė AT-PGR	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-
KRKSV amerikinio genotipo VR-2332 padermė	AT-PGR-I	+++	++	++	+	+	-	-*	-	-*	-
	Trijų mėgintuvėlių lizdinė AT-PGR	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-*	-*
	Vieno uždaro mėgintuvėlio lizdinė AT-PGR	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-	-

+: ++; +++ – PGR produktų juostų intensyvumas po agarozės gelio elektroforezės; – neigiamas PGR rezultatas; * - bent vieną kartą iš penkių tyrimų nustatytas klaidingai teigiamas rezultatas (neigiamos kontrolės atsitiktinis užteršimas KRKSV RNR arba cDNR)

Siekiant molekulinės biologijos metodais nustatyti, koks KRKSV genotipas paplitęs Lietuvos kiaulių populiacijoje, AT-PGR buvo iširta 165 atsitiktinai parinkti kiaulių kraujo serumo mėginiai. Europinio genotipo KRKSV padermės nustatytos 14 (8,5 %) mėginių, o amerikinio tipo KRKSV identifiкуotas tik viename ūkyje, kuriame kiaulės buvo pradėtos vakcinuoti gyva amerikinio genotipo atenuotų virusų vakcina. Kituose Lietuvos ūkiuose amerikinio genotipo KRKSV nebuvo nustatyta. Šie tyrimų rezultatai visiškai neatitinka Janutėnaitės ir kt. (2000) paskelbtiems duomenis, kurie rodo, kad tarp Lietuvos kiaulių paplitę abiejų genotipų KRKSV. Rytų Europoje atlikti filogenetiniai KRKSV tyrimai taip pat patvirtina, kad „laukinio“ amerikinio tipo KRKSV nenustatyta net išanalizavus daugiau kaip 80 skirtingų KRKSV padermių sekų ne tik ORF5, bet ir ORF7 genomo regione (Stadejek ir kt., 2002). Įvairaus amžiaus kiaulių kraujo serumo tyrimai lizdine AT-PGR parodė, kad KRKSV dažniausiai persistuoja 44-80 dienų kiaulių organizme. Mums nepavyko šio viruso nustatyti jaunesnių arba vyresnių kiaulių kraujo serumo mėginiuose. Taip pat vertas dėmesio ir tas faktas, kad vieno mėgintuvėlio lizdine AT-PGR galima tame pačiame mėginyje identifiкуoti abiejų genotipų KRKSV.

Išvados. 1. Modifiкуoto vieno mėgintuvėlio lizdinės AT-PGR jautrumas ir specifiškumas yra toks pat, kaip ir įprastos trietapės lizdinės AT-PGR, bet dėl mažesnės tikimybės atsitiktinai užteršti mėginius pašaline KRKSV RNR arba cDNR šis metodas labai naudingas rutininei KRKSV diagnostikai ir moksliniams tyrimams.

2. Vieno mėgintuvėlio lizdinei AT-PGR panaudoti oligonukleotidiniai pradmenys iš ORF5 genomo regiono leidžia tiriamajame mėginyje identifiкуoti europinio arba amerikinio genotipo KRKSV padermes.

3. Lietuvos kiaulių populiacijoje yra paplitę tik europinio genotipo KRKSV, o amerikinio genotipo šių virusų gali pasitaikyti tik tuose ūkiuose, kuriuose pradėta kiaules vakcinuoti amerikinio genotipo KRKSV vakcina.

Literatūra

1. Benfield D., Nelson E., Collins J. et al. Characterization of swine infertility and reproductive syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC-VR2332). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*. 1992. T. 4. P. 127–133.
2. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987. T. 162. P. 156–159.
3. Egli Ch., Thur B., Liu L., Hofmann M. Quantitative TaqMan RT-PCR for the detection and differentiation of European and North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virological Methods*. 2001. T. 98. P. 63–75.
4. Gilbert S., Larochelle R., Magar R. et al. Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses by a multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997. T. 35. P. 264–267.
5. Guarino H., Goyal S., Murtaugh M. et al. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription-polymerase chain reaction using different regions of the viral genome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*. 1999. T. 11. P. 27–33.
6. Janutėnaitė J., Ščerbavičius R., Blažiavičius E. Current status of porcine reproductive and respiratory syndrome in Lithuania, sero-epidemiological study by ELISA. *Proceedings of the 5th International Congress of Veterinary Virology*. 2000. P. 244–245.
7. Katz J., Shafer A., Eernise K. et al. Antigenic differences between European and American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are encoded by the carboxy terminal portion of viral open reading frame 3. *Veterinary Microbiology*. 1995. T. 44. P. 65–76.
8. Kono Y., Kwang J., Yoon I. et al. Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1996. T. 58. P. 941–946.
9. Kwang J., Kim H., Joo H. Cloning, expression, and sequence analysis of the ORF4 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus MN-1b. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*. 1994. T. 6. P. 293–296.
10. Larochelle R., Magar R. Evaluation of the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in packed pig meat using virus isolation and polymerase chain reaction (PCR) method. *Veterinary Microbiology*. 1997. T. 58. P. 1–8.
11. Legeay O., Bounaix S., Denis M., et al. Development of a RT-PCR test couplet with microplate colorimetric assay for the detection of a swine Arteriovirus (PRRSV) in boar semen. *Journal of Virological Methods*. 1997. T. 68. P. 65–80.

12. Loula T. Clinical presentation of mystery pig disease in the breeding herd and sucking piglets. In: Proc Mystery Swine Disease Committee Meeting, Denver. 1990. Livestock Conservation Institute, Madison. P. 29–31.
13. Madrassi H., Wilson L., Mounir S., Dea S. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. *Journal of Clinical microbiology*. 1994. T. 32., P. 2197–2203.
14. Mardassi H., Mounir S., Dea S. Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of Quebec and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*. 1994. T. 75. P. 681–685.
15. Mardassi H., Mounir S., Dea S. Molecular analysis of ORFs3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Quebec reference strain. *Archives of Virology*. 1995. T. 140. P. 1405–1418.
16. McGoldrick A., Bensaude E., Ibata G. et al. Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *Journal of Virological Methods*. 1999. T. 79. P. 85–95.
17. Meng X., Paul P., Halbur P. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3'-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*. 1994. T. 75. P. 1795–1801.
18. Meulenberg J., Hulst M., De Meijer E. et al. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology*. 1993. T. 192. P. 62–72.
19. Meulenberg J., Petersen-den Besten E., De Kluyver R et al. Wensvoort G. Characterisation of proteins encoded by ORFs2 to 7 Lelystad virus. *Virology*. 1995. T. 206. P. 155–163
20. Oleksiewicz M., Botner A., Madsen K., Storgaard T. Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Veterinary Microbiology*. 1998. T. 64. P. 7–22.
21. Spagnuolo-Weaver M., Walker I., McNeilly F. et al. The reverse transcription polymerase chain reaction for the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome: comparison with virus isolation and serology. *Veterinary Microbiology*. 1998. T. 62. P. 207–215.
22. Stadejek T., Stankevičius A., Storgaard T. et al. Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *Journal of General Virology*. 2002. T. 83. P. 1861–1873.
23. Stankevičienė M., Stankevičius A. Kiaulių reprodukcijos ir kvėpavimo sindromo viruso (KRKSV) seroepizootinio tyrimai Lietuvos kiaulininkystės ūkiuose. *Veterinarija ir zootechnika*. 2002. Spaudoje.
24. Suarez P., Zaroya R., Prieto C. et al. Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Archives of Virology*. 1994. T. 135. P. 89–99.
25. Umthun A., Mengeling W. Restriction fragment length polymorphism analysis of strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by use of a nested-set reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *American Journal of Veterinary Research*. 1999. T. 60. P. 802–806.
26. Wensvoort G., de Kluijver E.P., Luijze E.A., et al. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1992. T. 4. P. 134–138.
27. Wensvoort G., Terpstra C., Pol J. et al. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *The Veterinary Quarterly*. 1991. T. 3. P. 121–130.
28. Wolff C., Hornschemer D., Wolff D., Kleesiek K. Single-tube nested PCR with room temperature stable reagents. *PCR Methods Appl*. 1995. T. 4. 376–379.
29. Wolff D., Skourtopoulo M., Hornschemer D. et al. Longitudinal monitoring of latent and active human cytomegalovirus infections in peripheral blood of heart transplant recipients by single tube nested RT-PCR. *Microbiological Research*. 1996. T. 151. P. 343–349.

2003 0103