

VIENO MĖGINTUVĖLIO ATVIRKŠTINĖS TRANSKRIPCIJOS LIZDINĖS POLIMERAZĖS GRANDININĖS REAKCIJOS (AT-PGR) PANAUDOJIMAS GREITAM PESTIVIRUSŲ NUSTATYMOUI IR DIFERENCIJAVIMUI

Arūnas Stankevičius^{1,2}, Algirdas Šalomskaš², Violeta Mockeliūnienė², Marija Stankevičienė³, Juozas Pieškus¹

¹*Imunologijos institutas, Molėtų pl. 29, 2021 Vilnius, tel. 8-22 469249*

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

³*Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, 3022 Kaunas.*

Santrauka. Vieno mėgintuvėlio lizdinė AT-PGR buvo pritaikyta greitam galvijų virusinės diarėjos viruso (GVDV) ir klasikinio kiaulių maro viruso (KKMV) nustatymui ir diferencijavimui. Šių tyrimų tikslas - išbandyti supaprastintą atvirkštinės transkripcijos lizdinę polimerazės grandininę reakciją (AT lizdinė PGR) GVDV ir KKMV diagnostikoje. Šiam tikslui bendra RNR buvo išskirta iš virusais užkrėstų ląstelių kultūrų ir iš viso EDTA stabilizuoto kraujo. Penki mikrolitrai RNR buvo transkribuoti ir amplifikuoti dviem metodais: standartiniu, trijų etapų ir modifikuotu vieno uždaro mėgintuvėlio. Kiekvienam metodui buvo panaudoti du oligonukleotidų rinkiniai. Pirmasis buvo specifiškas visiems pestivirusams ir komplementarus 5'-UTR pestivirusų genomo regionui. Antrasis, sudarytas iš E2 proteiną koduojančios regiono nukleotidų sekų, buvo naudojamas diferencijuoti KKMV nuo GVDV. Standartinis metodas, susidedantis iš trijų etapų, atliktas 3 skirtinguose mėgintuvėliuose: AT, PGRI ir lizdinė PGR. Vieno mėgintuvėlio lizdinės PGR visi trys etapai buvo atliekami uždarytame mėgintuvėlyje. Šiam metodui AT-PGRI reagentai buvo sudedami į mėgintuvėlio dugną, tuo tarpu lizdinės PGR komponentai imobilizuojami mėgintuvėlio dangtelyje, panaudojant polisacharidą trehalozę. Užbaigus AT-PGRI etapą, mėgintuvėlis buvo keletą kartų pavartomas, trumpai nucentrifuguojamas ir toliau atliekama lizdinė PGR. Tyrimai įrodė, kad vieno uždaro mėgintuvėlio AT lizdinės PGR metodas buvo labai jautrus ir mažiau linkęs į klaidingai teigiamus tyrimų rezultatus, lyginant su standartinė AT lizdine PGR arba AT-PGRI. Šis metodas galėtų pagerinti jau egzistuojančias AT-PGR nustatant GVDV ar KKMV.

Raktažodžiai: pestivirusai, AT lizdinė PGR, GVDV, KKMV.

APPLICATION OF ONE TUBE REVERSE TRANSCRIPTION AND NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-NESTED PCR) FOR RAPID DETECTION AND DIFFERENTIATION OF PESTIVIRUSES

Summary. A single tube nested RT-PCR was developed for rapid detection and identification bovine viral diarrhea virus (BVDV) and classical swine fever virus (CSFV). The aim of the study was to apply the simplified procedure of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT nested PCR) for diagnosis BVDV and CSFV. Total RNA was extracted from virus-containing cell culture supernatant and whole EDTA blood. Five microliters of RNA were reversely transcribed and amplified by two methods: standard, three steps and modified closed one-tube. Two sets of PCR primers were used for each method. The first, based on 5'UTR of pestivirus genome, was specific for all pestiviruses. The second, designed on E2 protein-coding region was used for specifically differentiate CSFV from BVDV. The standard method consisting of 3 steps was performed in 3 separate reaction tubes: RT, PCR, 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 in tube bottom, while re-agents 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 was concluded that the closed one tube RT-nested PCR method was very sensitive and less prone to giving false positive results compared to standard RT-nested PCR or RT-PCR, carried out in separate reaction tubes. This method could be an improvement over existing RT-PCR assays for BVDV and CSFV.

Keywords: pestivirus, RT-nested PCR, BVDV, CSFV.

Įvadas. Pestivirusai yra plačiai paplitę ir svarbūs patogenai galvijams, kiaulėms ir avims (Baker, 1987). Būdami pakankamai maži, turintys teigiamą RNR grandinę, jie priklauso *Flaviviridae* šeimai ir sukelia savo natūraliems šeiminkams labai įvairius klinikinius požymius. Pestivirusinis genomas apytikriai sudarytas iš 12500 nukleotidų, suskirstytų į atvirus nuskaitymo rėmelius, kurie būna išsidėstę tarp 5' ir 3' nekoduojančių regionų (UTR). 5'UTR genomo sritis turi antrinę struktūrą ir laikoma pačia konservatyviausia genomo vieta visiems pestivirusams (Deng ir Brock, 1993; Mayers

ir Thiel, 1996). Atsižvelgiant į genetinius skirtumus, šiuo metu yra žinomos keturios pestivirusų rūšys arba genetiniai tipai (Becher ir kt. 1995; Paton, 1995). Kiaulių klasikinis maras (KKM) natūraliai pasireiškia kiaulėms. Galvijų virusinės diarėjos (GVD) I tipo virusas dažniausiai nustatomas galvijams, tačiau gali būti diagnozuojamas avims ir kiaulėms. Kitas GVDV II tipo virusas, žinomas kaip atipiškas GVDV (Ridpath ir kt. 1997), taip pat pasireiškia galvijams, tačiau buvo nustatytas avims ir ožkoms. Pasienio ligos virusas yra

pagrindinis avių pestivirusinis patogenas, tačiau retkarčiais užkrečia ir kiaules.

Pestivirusai sukelia labai įvairius klinikinius požymius ir padaro didelius ekonominius nuostolius gyvulininkystėje. GVDV yra šiuo metu plačiai išplitęs galvijų populiacijose, kuriose veisliniai gyvuliai netiriami, ar jie nėra persistentiškai užsikrėtę pestivirusais. Yra žinoma, kad pagrindinis GVDV infekcijos šaltinis bandoje yra persistentiškai užsikrėtę, imunotolerantiški gyvuliai, kurie ir išplatina šį pestivirusą bandoje. GVDV užkrečia embrioninį serumą, lašelių kultūras, todėl gali trukdyti atliekant diagnostiką virusologiniais ir imunologiniais metodais (Paton, Carlsson ir kt. 1995). KKMV dažniausiai sukelia ypatingai daug problemų, nes užsikrėtusios kiaulės turi būti sunaikintos, nepaisant padermės virulentiškumo ir ligos eigos. Šiuo atveju natūraliai išskyla ir tikslios diagnozės poreikis, kadangi yra labai sunku nustatyti, koks pestivirusas buvo diagnozuotas tiriamojame medžiagoje. Ypač turint galvoje tai, kad galvijų ir kaulių pestivirusai gali būti sunkiai diferencijuojami tradiciniais virusologiniais ir imunologiniais metodais. Patikimų ir greitų pestivirusų nustatymo metodų poreikis atsirado ne tik dėl ekonominių priežasčių, bet ir todėl, kad šiems pestivirusams nėra būdingas griežtas dauginimosi rūšinis specifiškumas, o didelis genomo panašumas diagnostikoje gali būti kryžminių reakcijų priežastimi.

Pagrindiniai pestivirusų rutininės diagnostikos metodai yra virusų izoliavimas lašelių kultūrose ir identifikavimas panaudojant specifinių antikūnų turinčius serumus. Monokloninių antikūnų panaudojimas (mABs) pagerino pestivirusų diagnostiką ir diferencijavimą, nes leido tiriamojame medžiagoje atskirti GVDV ir KKMV (Edwards ir kt. 1991). Tačiau mABs panaudojimas diferencijuojant pestivirusus yra gana problematiškas todėl, kad dauguma pestivirusinių padermių nepasižymi citopatinio efektu, todėl reikalingas papildomas identifikavimas imunoperoksidazės reakcija. Svarbu tai, kad dažnai tiriamoji patloginė medžiaga gali būti toksiška lašelių kultūroms, kuriose bandoma virusus izoliuoti ir identifiukuoti, todėl iš viso negalima atlikti tyrimus.

Pestivirusų diagnostikai ir diferencijavimui pastaraisiais metais buvo panaudoti cDNR amplifikavimo metodai, kurie leido nustatyti netgi labai nedidelius specifinės virusinės nukleininės rūgšties kiekius tiriamojame medžiagoje. Atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija pirmiausia buvo pritaikyta pestivirusų nustatymui. Šiam tikslui buvo panaudoti specifiniai pradmenys iš nekoduojančio 5'UTR regijono arba iš proteinus koduojančių pestivirusų genomo regijonų (Sandvik ir kt. 1997; Letellier ir kt. 1999). Pestivirusų diferencijavimui PGR metodu buvo pasiūlyti oligonukleotidų pradmenys komplementarus proteinus koduojantiems regionams, kurie buvo specifiški KKMV (Canal ir kt. 1996; Katz ir kt. 1993; Wirz ir kt. 1993; Vilcek ir kt. 1994) arba GVDV (Hyndman ir kt. 1998, Sullivan ir kt. 1995). Pastaruoju metu pestivirusų diagnostikai ir diferencijacijai buvo pasiūlytas TaqMan RT-PCR metodas, leidžiantis pestivirusinę nukleininę

rūgštį ne tik identifiukuoti kokybiškai bet ir kiekybiškai (McGoldrick ir kt. 1998; Bhudevi ir kt. 2001).

Nepaisant to, kad yra paskelbta nemažai publikacijų apie AT-PGR panaudojimą pestivirusų diagnostikoje ir diferencijavime, šio metodo ir ypač lizdinės AT-PGR platesnis pritaikymas, siekiant padidinti metodo jautrumą, išlieka vis dar ribotas dėl to, kad labai dažnai pastebimi klaidingai teigiami reakcijos rezultatai. Tyrimų metu reikia 2-3 kartus atidaryti ir vėl uždaryti PGR mėgintuvėlius. Tai padidina riziką kontaminuoti tiriamąjį mėginį pašaline pestivirusine RNR arba cDNR. Todėl pestivirusų diagnostikos ir diferencijavimo metodus lizdine AT-PGR prirėikė supaprastinti ir tokiu būdu sumažinti kaidingų rezultatų galimybę.

Šio darbo tikslas - pritaikyti lizdinę AT-PGR viename, uždarytame mėgintuvėlyje, optimizuoti lizdinės PGR panaudojimą diferencijuojant GVDV ir KKMV panaudojant keturias poras oligonukleotidų pradmenų iš bendro visiems pestivirusams 5'UTR genomo regijono ir specifinės, KKMV E2 proteiną koduojančios srities, išbandyti metodą rutininėje GVDV diagnostikoje.

Medžiagos ir metodai. Tyrimuose buvo panaudotos referentinės pestivirusinės galvijų virusinės diarėjos (GVDV) "NADL" ir "NY-1" padermės, atitinkančios citopatinį ir necitopatinį GVDV biotipus, klasikinio kaulių maro (KKMV) referentinė Europos Sąjungoje padermė "Alfort 187", kurios buvo pagausintos pestivirusams jautriose lašelių kultūrose MDBK ir PK-15 pagal anksčiau aprašytą metodiką (Mockeliūnienė ir kt. 2000).

RNR išskyrimas. AT-PGR metodu tyrimuose panaudota pestivirusinė RNR buvo išskirta iš EDTA stabilizuoto kraujo vienbranduolių lašelių arba MDBK, PK-15 lašelių kultūrų mėginių šiam tikslui panaudojant išskyrimo rinkinį "Total RNA Prep Plus", kurio veikimas paremtas modifikuotu Chomczynski metodu (Chomczynski ir Sacchi, 1987). Visa RNR izoliavimo procedūra buvo atliekama pagal gamintojų (A&A Biotechnology, Gdynia, Lenkija) pateiktą aprašymą. Trumpai, 250 µl tiriamo serumo arba lašelių kultūrų terpės buvo paveikiama 800 µl fenozolo, kuris sukelia visišką lašelių lizę. Inkubuojama 50 °C 5 min. ir užpilama 200 µl chloroformo, intensyviai kratoma (purtyklė MS1 Minishaker) 15 s, 3 min. laikoma kambario temperatūroje ir 10 min. centrifuguojama (10 tūkst.aps./min.). Paviršinė frakcija perkeliama į naują mėgintuvėlį, užpilama 250 µl izopropanolio, išmaišoma ir vėl perkeliama į kitą mėgintuvėlį, turintį specialią membraną, imobilizuojančią RNR, centrifuguojama (10 tūkst.aps./min., 1 min). Šioje stadijoje virusinės RNR molekulės, prisitvirtinusios membranos struktūroje, tris kartus praplaunamos specialiu tirpalu, kurio sudėtyje yra 96⁰ etanolio. 700µl minėto plovimo tirpalo užpilama ant membranos su RNR, centrifuguojama 10 tūkst.aps./min., 2 min. Nusausinus RNR centrifugavimu (2 min. 10 tūkst.aps./min.), ant membraną užpilama 100 µl vandens, kuris neturi Rnazių ir kitų inhibitorinių medžiagų (DEPC vanduo). Bendra ekstrahuota RNR buvo panaudota kaip matrica vieno mėgintuvėlio atvirkštinės transkripcijos

lizdinėje PGR ir tradicinėje, trijų pakopų (atvirkštinės transkripcijos, pirmosios PGR ir lizdinės PGR) AT-PGR.

RT-PGR. Tradicinė, trijų etapų RT-PGR buvo atliekama pagal Hydman ir kt. (1998) AT-PGR metodiką.

Supaprastintoje vieno mėgintuvėlio lizdinėje AT-PGR pirmiausia paruošiami reagentai antram, t.y. lizdinės PGR etapui. Šiam tikslui paruošiamas reakcijos mišinys, kuriame yra 5 µl 22% trechalozės (Sigma), naudojamos kitiems reakcijos komponentams išlaikyti, 20 pmol/µl

kiekvieno iš vidinių nukleotidų pradmenų (A11, A14 arba B,C, 1 lentelė), 1 µl dNTPs mišinio (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 mM tirpalo, 0,25 µl Taq DNA polimerasės (1,25 U, Fermentas, Vilnius). Į kiekvieno 0,2 ml Eppendorf mėgintuvėlio dangtelį tokio lizdinės PGR mišinio išpilstoma po 8,25 µl ir paliekama 2 val. kambario temperatūroje džūti. Tokiu būdu išdžiovinti lizdinės PGR reagentai yra tinkami naudoti 6 mėn.

1 lentelė. AT lizdinėje PGR panaudoti ologonukleotidų pradmenys

| Pradmenys | Oligonukleotidų pradmenų pavadinimai | | Kryptis 5'→3' | Oligonukleotidų pradmenų seka 5'→3' | Pozicija nukleotide | Genomo regionas |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------|---------------|-------------------------------------|---------------------|------------------------|
| Bendri visiems pestivirusams | V324 | Išoriniai | → | ATGCCC(T/A)TAGTAGGACTAGCA | 90-110 | 5'UTR |
| | V326 | | ← | TCAACTCCATGTGCCATGTAC | 353-373 | 5'UTR/N ^{PRO} |
| | A11 | Vidiniai | → | AGTACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCG | 161-186 | 5'UTR |
| | A14 | | ← | CAACTCCATGTGCCATGTACAGCAG | 348-372 | 5'UTR/N ^{PRO} |
| Specif. klasikiniam kiaulių marui | A | | → | ATATATGCTCAAGGGCGAGT | 3378-3397 | E2 |
| | D | | ← | ACAGCAGTAGTATCCATTTCTTTA | 3499-3519 | E2 |
| | B | | → | CTGTGGCTAATAGTGACCTAC | 3652-3671 | E2/NS2 |
| | C | | ← | CATTTCTTTATGGGCTCATC | 3662-3685 | E2/NS2 |

Sekančiame etape buvo panaudoti tie patys 0,2 ml Eppendorfo mėgintuvėliai, kurių kamšteliuose buvo trechalozėje išdžiovinti lizdinės PGR komponentai. Atvirkštinė transkripcija (AT) ir PGR-I buvo atliekama minėtų mėgintuvėlių dugne. Amplifikacijai buvo naudojamas 50 µl mišinys: 5 µl bendros RNR, 5 µl 10xPGR buferio (100mM 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 (V324, V326, arba A,D 20 pmol/µl koncentracija, 1 lentelė), 1µl 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 mišinio, esančio mėgintuvėlio dugne, atskyrimui nuo lizdinės PGR komponentų mėgintuvėlio kamštelyje buvo naudojamas mineralinis aliejus (Sigma). Vieno mėgintuvėlio AT lizdinė PGR buvo atliekama amplifikatoriuje Mastercycler[®] (Eppendorf). Sumaišius RNR ir AT-PGRI mišinį, atvirkštinė transkripcija buvo atliekama cikleryje esant 40 °C temperatūrai 30 min, AT fermentai inaktyvuojami kaitinant 95 °C 3 min. Iš karto po to pradama 20 ciklų amplifikacijos reakcija: cDNR denatūravimas – 94 °C 1 min., hibridinimas su specifiniais pradmenimis- esant 52 °C 1 min., cDNR elongacija (prailginimas) – esant 72 °C temperatūrai 1 min. Pasibaigus pirmajam amplifikacijos etapui mėgintuvėliai buvo apverčiami keletą kartų, siekiant sumaišyti ir ištirpinti lizdinės PGR komponentus mėgintuvėlio dangtelyje su PGRI produktais, esančiais dugne. Po to mėgintuvėliai buvo trumpai nucentrifuguojami ir

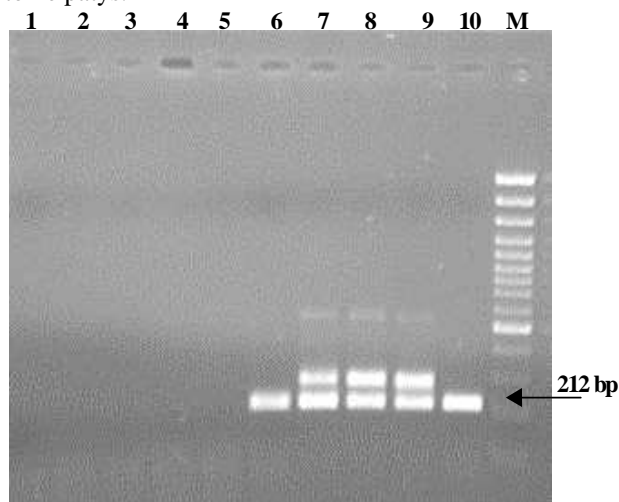
atliekama lizdinė PGR naudojant 30 amplifikavimo ciklų: 94 °C 1 min., 52 °C 1 min., 72 °C 1 min.

AT-PGR amplifikacijos produktai buvo analizuojami 2% agarozės gelyje (Top Vision[™] GQ Agarose, Fermentas), dažytame etidžio bromidu (koncentracija 1 µg/ml.). 10µl PGR produkto buvo atliekama elektroforezė 1xTBE buferyje (90mM Tris, 90mM boro rūgštis, 2 mM EDTA), leidžiant 120 V srove 45 min. PGR rezultatai buvo matomi UV lempos spinduliuose, esant specifiniam DNR juostelių švytėjimui 212 bp arba 172 bp molekulinį žymeklį GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas) atitinkančiose pozicijose.

Statistinė duomenų analizė buvo atliekama kompiuterine programa "Graph Prism[™]". Apskaičiuotas Student'o patikimumo koeficientas. Duomenys laikyti patikimais, kai p< 0,05.

Tyrimų rezultatai. Atliekant lizdinę AT-PGR viename mėgintuvėlyje arba tradicinę AT-PGR skirtinguose mėgintuvėliuose (atskirai AT, PGR I, lizdinė PGR) su bendrais visiems pestivirusams pradmenimis (1 lentelė), buvo gauti tie patys specifiniai amplifikavimo 212 bp produktai, kurių dydis atitiko norimą ampifikuoti pestivirusų genomo regioną. Vieno mėgintuvėlio lizdinei AT-PGR buvo eksperimentiškai nustatyta optimali hibridinimo temperatūra ir MgCl₂ koncentracija (duomenys neparodyti), kurie leido optimaliai padidinti reakcijos jautrumą ir specifiškumą. Eksperimentiniai mėginiai su "NADL", "NY-1" (GVDV) ir "Alfort-187" (KKMV) padermėmis generavo tuos pačius amplifikavimo produktus (1 pav.) Sumaišius minėtas padermes tarpusavyje buvo gauti tie patys visiems

pestivirusams būdingi 212 bp amplifikavimo produktai. Tiriant vieno mėgintuvėlio lizdinę AT-PGR neužkrėstų lastelių kultūrų mėginius, taip pat dejonizuotą vandenį arba persistentiškai neužkrėstų galvijų kraują, pestivirusinė cDNR nebuvo identifikuota. Kiekvienos pestivirusinės padermės AT-PGR tyrimai buvo atliekami po penkis kartus ir visais atvejais gauti rezultatai buvo tokie patys.



1 pav. Vieno mėgintuvėlio AT lizdinės PGR rezultatai 2% agarozės gelyje su bendrais visiems pestivirusams oligonukleotidų pradmenimis

1 linija – neužkrėstų pestivirusais MDBK lastelių kultūros suspensija.

2 linija – neužkrėstų pestivirusais PK-15 lastelių kultūros suspensija.

3 linija – dejonizuotas vanduo (AT-PGR neigiama kontrolė).

4 linija – dejonizuotas vanduo (AT-PGR neigiama kontrolė).

5 linija- persistentiškai neužsikrėtusių, serologiškai neigiamų 10 galvijų kraujo jungtinis mėginys, AT-PGR rezultatas neigiamas.

6 linija – persistentiškai užsikrėtusių 10 galvijų kraujo jungtinis mėginys, AT lizdinė PGR teigiama, amplifikuotas 212 bp produktas.

7 linija – GVDV citopatinė “NADL” padermė, teigiama reakcijos kontrolė.

8 linija – GVDV necitopatinė “NY-1” padermė, teigiama reakcijos kontrolė.

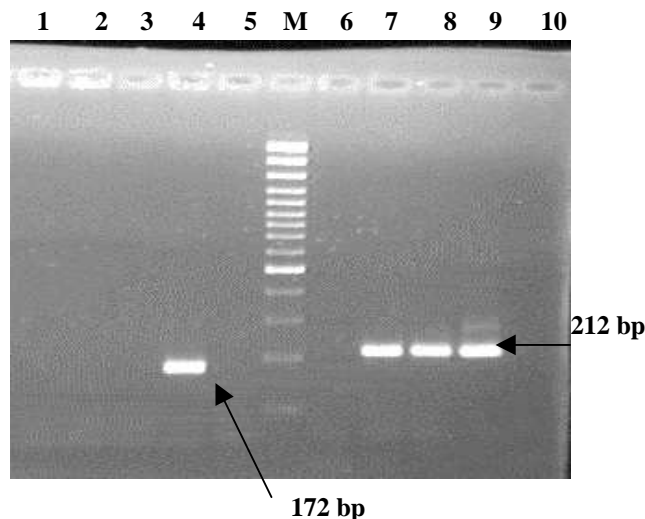
9 linija – KKMV “Alfort 187” padermė, teigiama reakcijos kontrolė.

10 linija-sumaišytų GVDV (“NADL” ir “NY-1”), KKMV (“Alfort 187”) padermių amplifikavimo rezultatai, teigiama visų pestivirusų kontrolė.

M – molekulinės masės žymuo GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Viena linija atitinka 100 bp amplifikuoto produkto dydį.

Vieno mėgintuvėlio lizdinė AT-PGR ir tradicinė AT-PGR skirtinguose mėgintuvėliuose su specifiniais kiaulių maro viruso pradmenimis (1 lentelė) leido diferencijuoti KKMV referentinę ES padermę “Alfort 187” nuo GVDV

“NADL” ir “NY-1” padermių. Lizdinė AT-PGR leido amplifikuoti 172 bp produktą (2 pav.), kurio dydis atitiko norimą amplifikuoti E2 KKMV specifinį genomo regioną. Neužkrėstų lastelių kultūrų mėginių arba vandens tyrimai KKMV RNR neidentifikavo, pakartotinių penkių tyrimų rezultatai buvo identiški pirmajam. Amplifikuojant GVDV referentines padermes AT-PGR produkto nebuvo gauta (2 pav.).



2 pav. Vieno mėgintuvėlio lizdinė AT-PGR su specifiniais kiaulių maro viruso pradmenimis iš E2 koduojančio regiono leido diferencijuoti GVDV nuo KKMV.

1 linija – neužkrėstų KKMV PK-15 lastelių kultūros suspensija. AT-PGR nevyko.

2 linija – GVDV citopatinė “NADL” padermė. Specifinio amplifikavimo produkto nebuvo gauta.

3 linija – GVDV necitopatinė “NY-1” padermė. AT-PGR specifinio produkto nebuvo gauta.

4 linija – KKMV “Alfort 187” padermė. Lizdinė AT-PGR amplifikavo specifinį 172 bp produktą.

5 linija – dejonizuotas vanduo, neigiama kontrolė.

M linija – molekulinės masės žymuo GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Viena linija atitinka 100 bp amplifikuoto produkto dydį.

6 linija- neužkrėstų pestivirusais MDBK lastelių kultūros suspensija.

7 linija –GVDV citopatinė “NADL” padermė, teigiama AT-PGR su bendrais visiems pestivirusams pradmenimis.

8 linija – GVDV necitopatinė “NY-1” padermė, teigiama AT-PGR su bendrais visiems pestivirusams pradmenimis.

9 linija – KKMV “Alfort 187” padermė, teigiama teigiama AT-PGR su bendrais visiems pestivirusams pradmenimis.

10 linija – dejonizuotas vanduo, neigiama kontrolė.

Lizdinės vieno mėgintuvėlio AT-PGR reakcijos jautrumas buvo patvirtintas lyginant modifikuotą metodą su paprasta AT-PGR arba trijų etapų lizdine AT-PGR (2 lentelė). Kiekvienu metodu atliekant tyrimus po penkis

kartus buvo gauti tokie patys rezultatai, tačiau tradicinės trijų mėgintuvėlių AT-PGR dviejų tyrimų kai kuriuose neigiamos kontrolės mėginiuose buvo gauti klaidingai teigiami rezultatai (smulkiau neparodyta). Tradicinės ir vieno mėgintuvėlio lizdinės AT-PGR rezultatai sutapo, tačiau pirmuoju atveju buvo nustatyti teigiami rezultatai tokiuose mėginiuose, kuriuose pestivirusų negalėjo būti

(neigiama kontrolė). Visais atvejais lizdinės PGR reakcijos jautrumas buvo bent jau 100 kartų didesnis už paprastą AT-PGR, o specifiniai reakcijos produktai agarozės gelyje ryškiausi. Teigiami vieno mėgintuvėlio AT-PGR rezultatai buvo gauti net atskiedus pestivirusus iki 10^{-6} .

2 lentelė. AT-PGR įvairių metodų jautrumo palyginamasis įvertinimas

| Virusinė padėmė ir AT-PGR metodas | Virusų atskiedimas mėginyje prieš RNR išskyrimą | | | | | | | | | |
|--|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------------|
| | Pradinis | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} | 10^{-8} | Neigiama kontrolė |
| GVDV NADL | | | | | | | | | | |
| AT-PGR I | ++ | ++ | ++ | + | + | - | - | - | -* | -* |
| Trijų mėgintuvėlių lizdinė AT-PGR | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | - | - | - | - |
| Vieno uždaro mėgintuvėlio lizdinė AT-PGR | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | - | - | - | - |
| GVDV New York | | | | | | | | | | |
| AT-PGR I | ++ | ++ | ++ | ++ | + | - | - | - | - | - |
| Trijų mėgintuvėlių lizdinė AT-PGR | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | - | -* | -* |
| Vieno uždaro mėgintuvėlio lizdinė AT-PGR | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | - | - | - |
| KKMV Alfort 187 | | | | | | | | | | |
| 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 buvo nustatytas klaidingai teigiamas rezultatas (neigiamos kontrolės kontaminacija pestivirusine RNR).

3 lentelė. Galvijų kraujo mėginių tyrimų rezultatai įvairiais AT-PGR metodais

| AT-PGR metodas | Bendri visiems pestivirusams pradmenys ir amplifikuoto produkto dydis | Iš viso tirta galvijų kraujo mėginių | AT-PGR rezultatas | | Specifiniai tik KKMV oligonukleotidų pradmenys ir amplifikuoto produkto dydis | Iš viso tirta galvijų kraujo mėginių | AT-PGR rezultatas | |
|--|---|--------------------------------------|-------------------|-------------------|---|--------------------------------------|-------------------|-------------------|
| | | | Teigiamų skaičius | Neigiamų skaičius | | | Teigiamų skaičius | Neigiamų skaičius |
| AT-PGR I | V324, V326 288 bp | 49 | 6* | 43* | A, D 282 bp | 49 | 0 | 49 |
| Trijų etapų lizdinė AT-PGR | V324, V326 A11, A14 212 bp | 49 | 10* | 39* | A, D B,C 172 bp | 49 | 0 | 49 |
| Vieno uždaro mėgintuvėlio lizdinė AT-PGR | V324, V326 A11, A14 212 bp | 49 | 10* | 39* | A, D B, C 172 bp | 49 | 0 | 49 |

* $p < 0,05$

Lizdinės vieno mėgintuvėlio AT-PGR metodo tinkamumas buvo išbandytas rutiniuose tyrimuose nustatant persistentiškai užsikrėtusius GVDV individus bandoje. Specifinių antikūnų neturėjusių galvijų kraujo mėginiai buvo ištirti trimis metodais, panaudojant visiems bendrus pestivirusams ir specifinius KKMV ologonukleotidų pradmenis (3 lentelė). Lentelėje pateikti duomenys rodo, kad lizdinės vieno mėgintuvėlio AT-PGR metodas leidžia identifikuoti GVDV nešiotojus bandoje lygiai kaip ir tradicinis trijų etapų lizdinės AT-PGR metodas. Čia kokių nors duomenų skirtumų nebuvo pastebėta, tačiau statistiškai patikimi skirtumai buvo nustatyti tarp AT-PGRI ir vieno uždaro mėgintuvėlio lizdinės AT-PGR ($p < 0,05$). Antruoju metodu persistentiškai infekuotų individų buvo nustatyta 1,67 karto statistiškai patikimai daugiau. Specifiniai PGR produktai su bendrais pestivirusiniais pradmenimis ir neigiami tyrimų rezultatai su specifiniais KKMV pradmenimis rodo, kad šis metodas leidžia nustatyti persistentiškai užsikrėtusius GVDV galvijus, kurių tyrimai srologiniais metodais buvo neigiami. Eksperimentiškai užkrėtus 20 persistentiškai neužsikrėtusių GVDV galvijų kraujo mėginių KKMV referentine Alfort 187 paderme, vieno mėgintuvėlio lizdiniu AT-PGR metodu buvo gauti specifiniai amplifikavimo produktai tiek su bendrais pestivirusiniais tiek ir su specifiniais kiaulių maro viruso oligonukleotidų pradmenimis, kaip parodyta 2 pav.

Aptarimas ir išvados. Nors AT-PGR pasižymi dideliu, jautrumu, specifiskumu ir greičiu, tačiau jos panaudojimą virusologijoje apsunkina tai, kad reikia atlikti nemažai etapų, kol gaunamas tyrimų rezultatas. Ypač tai liečia tradicinę lizdinę AT-PGR. Jos metu prireikia net keletą kartų atidaryti mėgintuvėlius atliekant atskirai AT, PGRI ir po to lizdinę PGR. Dėl to, tikimybė kontaminuoti mėginius pašaline virusine RNR ir gauti klaidingai teigiamus rezultatus išauga. Tai smarkiai apriboja tradicinės AT-PGR, o po to ir lizdinės PGR panaudojimą virusinių ligų diagnostikoje ir moksliniuose tyrimuose. Yra nemažai duomenų, kad atskiri mėgintuvėliai AT, mėgintuvėlių atidarymas ir uždarymas įdant reagentus, visas kompleksas atskirų etapų ir temperatūrinių ciklų neleidžia šio labai jautraus metodo efektyviai pritaikyti rutiniuose diagnostikoje (McGoldrick ir kt. 1999).

Mūsų išbandytas ir optimizuotas pestivirusų diagnostikoje ir diferencijavime vieno mėgintuvėlio lizdinės AT-PGR metodas leido išvengti tiriamųjų mėginių kontaminacijos pašaline RNR. Tyrimai parodė, kad šiuo metodu nebuvo pastebėta mėginių užterštumo pašaline RNR (2 lentelė). Tuo tarpu atskiruose mėgintuvėliuose atliekamos AT-PGR arba lizdinės AT-PGR rezultatai keletą kartų rodė klaidingai teigiamus rezultatus. Pagrindinis mūsų pritaikyto ir išbandyto metodo privalumas yra tas, kad visi AT-PGR etapai, t.y. AT, PGR I, lizdinė PGR vyko neatidarant mėgintuvėlio, iš karto sudėjus visus reagentus ir tiriamąją RNR. Lizdinės PGR reagentai buvo išdžiovinami mėgintuvėlių dangteluose, o AT, ir PGRI reagentai kartu su RNR patalpinami į mėgintuvėlio dugną. Dugne esančias

medžiagas atskirti nuo lizdinės PGR komponentų buvo naudojamas mineralinis aliejus. Ankstesni tyrimai įrodė, kad Taq polimerazė, dNTPs ir oligonukleotidų pradmenys išdžiovininti trechalozėje išlaiko aktyvumą iki 6 mėn. (Wolff ir kt. 1995). Atlikus AT ir PGRI mėgintuvėliai buvo apverčiami ir pirmosios PGR komponentai sumaišomi su išdžiovintais lizdinės PGR pradmenimis ir kitais reagentais. Būtina paminėti, kad termostabilus reakcijos fermentas Taq DNR polimerazė yra neaktyvus iki 95 °C. Todėl AT etape, esant tik 42 °C, polimerazė būna neaktyvi, tačiau po to suaktyvinama pakėlus temperatūrą iki 95 °C 10 min. Tai leidžia kartu inaktyvuoti ir AT fermentą. Trumpai nucentrifūgavus, amplifikacija buvo tęsiama, tik jau su vidiniais pradmenimis. Pirmą kartą polisacharidas trechalozė buvo panaudotas lizdinėje PGR tyrinėjant žmonių virusus (Wolff ir kt. 1996). McGoldrick ir kt. (1999), Barlic-Maganja ir kt. (2001) vieno mėgintuvėlio AT-PGR principą panaudojo diferencijuojant KKMV ir kitus pestivirusus. Tas pats RT-PGR principas buvo pritaikytas ir nustatant PI GVDV galvijus (Rossmann ir kt. 2001).

Mūsų pasirinkti ologonukleotidų pradmenys (1 lentelė) leido amplifikuoti specifinius visiems pestivirusams PGR 212 bp produktus (1 pav.). Eksperimentai įrodė, kad 5'UTR pestivirusų genomo sričiai komplementarūs pradmenys leido tiriamojoje medžiagoje nustatyti GVDV citopatinių ir necitopatinių padermių, taip pat KKMV cDNR. Mūsų nuomone, 5'UTR srities oligonukleotidų pradmenis labai patogiu naudoti rutiniuose diagnostikoje, nes jie yra komplementarūs daugeliui labai skirtingų pestivirusų biotipams, todėl lengvai generuoja specifinio produkto amplifikavimą. Nustačius tiriamajame mėginyje pestivirusinę cDNR, yra daug paprasčiau panaudoti KKMV E2 genomo regionui komplementarius pradmenis, kurie leidžia nustatyti, ar tai KKMV ar GVDV. Moksliniuose tyrimuose pravartu papildomai tokius mėginius ištirti ir su kitais pradmenimis, komplementariais, pavyzdžiui GVDVI arba GVDVII biotipams (Tajima ir kt. 2001). GVDV tyrimų duomenys rodo, kad būtent 5'UTR pestivirusinio genomo dalis, kuri yra svarbi virusų replikacijai, yra naudingiausias regionas pasirinkti oligonukleotidų pradmenis, kurie leidžia nustatyti maksimalų GVDV vietinių padermių kiekį (Ridpath ir kt. 1993).

Būtina paminėti, kad vieno mėgintuvėlio lizdinė AT-PGR buvo išbandyta tiriant ne tik eksperimentinius, bet ir klinikinius EDTA kraujo mėginius (3 lentelė). Gauti rezultatai rodo, kad vieno mėgintuvėlio ir trijų etapų lizdinės AT-PGR leido gauti tokius pat rezultatus, o paprasta AT-PGR nustatė ne visus lizdine AT-PGR diagnozuotus persistentiškai užsikrėtusius galvijus. Antrasis metodas leido nustatyti 1,7 karto statistiškai patikimai daugiau GVDV teigiamų gyvulių. Tyrimų rezultatai rodo, kad šis yra pakankamai jautrus ir saugus, kad jį būtų galima pritaikyti GVDV likvidavimo programose.

Mūsų atliktas trijų skirtingų PGR metodų jautrumo įvertinimas parodė, kad lizdinė AT-PGR yra bent jau 100 kartų jautresnė už paprastą AT-PGR (2 lentelė). Trijų etapų lizdinės ir vieno mėgintuvėlio lizdinės AT-PGR

rezultatai su skirtingomis pestivirusų padermėmis leido gauti specifinius amplifikavimo produktus atskiedus virusų padermes iki 10^{-6} . Tai, pavyzdžiui, atitiko KKMV 1,55 TCID₅₀. Būtina paminėti, kad lizdinės AT-PGR specifiniai produktai buvo matomi agarozės gelyje daug geriau, nei tradicinės AT-PGRI atveju. Vieno mėgintuvėlio lizdinės AT-PGR rezultatus galima įvertinti vidutiniškai jau po 7-8 val., tuo tarpu tradiciniu, trijų etapų lizdinė AT-PGR rezultatų leidžia tikėtis ne anksčiau nei po 24 val. Šie faktai, mūsų nuomone, vieno uždaro mėgintuvėlio lizdinę AT-PGR daro ypatingai patrauklia ir vertinga GVDV ir KKMV diagnostikoje. Būtina paminėti, kad sutrumpėja laikas KKMV identifikavimui ir sumažinama tikimybė kontaminuoti mėginius kita pašaline pestivirusine RNR arba cDNR. Visa tai lizdinę vieno mėgintuvėlio RT-PGR gali padaryti labai naudinga rutininėje diagnostikoje.

Išvados:

1. Vieno mėgintuvėlio lizdinės AT-PGR panaudojimas sumažina galimybę tyrimų metu užkrėsti mėginius pašaline pestivirusine cDNR ir gauti klaidingai teigiamus rezultatus.
2. Vieno mėgintuvėlio lizdinės RT-PGR jautrumas ir specifiškumas yra toks pat, kaip ir trijų etapų, tradicinės lizdinės AT-PGR.
3. Taikant visiems pestivirusams bendrus 5'UTR genomo regiono ir specifinius pradmenis, komplementarius KKMV E2 sričiai, vieno mėgintuvėlio lizdine AT-PGR galima diferencijuoti tiriamojame medžiagoje GVDV ir KKMV padermes.

Literatūra

1. Baker J. Bovine viral diarrhea virus: a review. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 1987. T. 190. P. 1449-1458.
2. Barlic-Maganja A., Grom J. Highly sensitive one-tube RT-PCR and microplate hybridization assay for the detection of classical swine fever virus from other pestiviruses. *Journal of Virological Methods*. 2001. T. 95. P. 101-110.
3. Becher P., König M., Paton D.J., Thiel H.J. Further characterization of Border Disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. *Virology*. 1995. T. 209. P. 200-206.
4. Bhudevi B., Weinstock D. Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Microbiology*. 2001. T. 83. P. 1-10.
5. Calaco C., Sen S., Thangavelu M., Pinder S., Roser B. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Bio/Technology*. 1992. T. 10. P. 1007-1011.
6. Canal C.W., Hotzel I., de Almeida L.L.Roehe P.M., Masuda A. Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Veterinary Microbiology*. 1996. T. 48. P. 373-379.
7. 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.
8. Deng R., Brock K.V. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analysis. *Nucleic Acids Research*. 1993. T. 21. P. 1949-1957.
9. Edwards S., Moening V., Wensvoort G. The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses. *Veterinary Microbiology*. 1991. T. 29. P. 101-108.
10. Hyndman L., Vilcek S., Conner J., Nettleton P.F. A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhea virus in fluids from aborted bovine fetuses. *Journal of Virological Methods*. 1998. T. 71. P. 69-76.
11. Katz J., Ridpath J.F., Bolin S.R., Presumptive diagnostic differentiation of hog cholera virus from bovine viral diarrhea and border disease viruses by using a cDNA nested-amplification approach. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993. T. 31. P. 565-568.
12. Letellier C., Kerkhofs P., Wellemans G., Vanopdenbosch E. Detection and genotyping of bovine diarrhea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5'untranslated region. *Veterinary Microbiology*. 1999. T. 64. P. 155-167.
13. Mayers G., Thiel H.J., Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Research*. 1996. T. 47. P. 53-118.
14. McGoldrick A., Bensaude E., Ibata G., Sharp G., Paton D.J. 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.
15. McGoldrick A., Lowings J.P., Ibata G., Sands J.J., Belak S., Paton D. J. A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (TaqMan). *Journal of Virological Methods*. 1998. T. 72. P. 125-135.
16. Mockeliūnienė V., Šalomska A., Stankevičius A., Pilinkienė A. Propagation of bovine viral diarrhoea viruses in cell culture. *Current Issues in Veterinary Medicine*. Jalgava. 2000. P. 116-119.
17. Paton D.J., Carlsson U., Lowings J.P., Sands J.J., Vilcek S., Alenius S. Identification of heard-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep. *Veterinary Microbiology*. 1995. T. 43. P. 283-294.
18. Paton D.J. Pestivirus diversity. *Journal of Comparable Pathology*. 1995. T. 112. P. 215-236.
19. Ridpath J.F., Bolin S.R., Katz J. Comparison of nucleic acid hybridization and nucleic acid amplification using conserved sequences from the 5' noncoding region for detection of bovine viral diarrhea virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993. T. 31. P. 986-989.
20. Ridpath J.F., Bolin S.R., Dubovi E.J. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology*. 1994. T. 205. P. 66-74.
21. Rossmannith W., Vilcek S., Wenzl H., Rossmannith E., Loitsch A., Durkovic B., Strojny L., Paton D.J. Improved antigen and nucleic acid detection in a bovine virus diarrhea eradication program. *Veterinary Microbiology*. 2001. T. 81. P. 207-218.
22. Sandvik T., Paton D.J. Lowings J.P. Detection and identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of 5'untranslated cDNA regions. *Journal of Virological Methods*. 1997. T. 64. P. 43-56.
23. Sullivan D.G., Akkina R.K. A nested PCR assay to differentiate pestiviruses. *Virus Research*. 1995. T. 8. P. 231-239.
24. Tajima M., Frey H.R., Yamato O., Maede Y., Moennig V., Scholz H., Greiser-Wilke I. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Research*. 2001. T. 76. P. 31-42.
25. Vilcek S., Herring A.J., Herring J.A., Nettleton P.F., Lowings J.P., Paton D.J. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Archives of Virology*. 1994. T. 136. P. 309-323.
26. Wolff C., Hornschemer D., Wolff D., Kleesiek K., Single-tube nested PCR with room temperature stable reagents. *PCR Methods Appl*. 1995. T. 4. P. 376-379.
27. Wolff D., Skourtoupolou M., Hornschemer D., Wolff C., Korner M., Korfer R., Kleesiek K. 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.
28. Wirz B., Tratschin J.D., Muller H.K., Mitchell D.B. Detection of hog cholera virus and differentiation from other pestiviruses by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. T. 31. P. 1148-1154.

2002 05 27