

## 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 Stankevičius<sup>1</sup>, Algirdas Šalomska<sup>1</sup>, Marija Stankevičienė<sup>2</sup>, Juozas Pieškus<sup>3</sup>

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

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

<sup>3</sup> 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 uždarame 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 uždarame 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 uždarame 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, diferencijavimas.