

KIAULIŲ REPRODUKČINIO IR KVĖPAVIMO SINDROMO VIRUSO LIETUVIŠKŲ PADERMIŲ GENETINIAI SKIRTUMAI IR FILOGENETINĖ ANALIZĖ ORF5 IR ORF7 REGIONUOSE

Arūnas Stankevičius^{1,3}, Marija Stankevičienė², Juozas Pieškus¹

¹ *Imunologijos institutas, Molėtų pl. 29, LT – 2021 Vilnius; tel. 8 5 246 92 49.*

² *Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT – 3022 Kaunas; tel. 8 37 34 61 43; el. paštas: marija@lva.lt*

³ *Lietuvos veterinarijos akademijos Veterinarijos institutas, Instituto g. 2, LT–4230 Kaišiadorys; tel. 8 346 6 06 91; el. paštas: arusta@one.lt*

Santrauka. Lietuvos kiaulių reprodukcinio ir kvėpavimo sindromo viruso (KRKSv) patogeninių padermių ORF5 geno dalis ir visas ORF7 regionas buvo amplifikuotas atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandinine reakcija ir nustatytos jų nukleotidų sekos. Jos netikėtai pasirodė labai skirtingos. Skirtingiausios šių dienų europinio tipo KRKSv nukleotidų sekos buvo iš dviejų Lietuvos ūkių, kurių nukleotidų identiškas ORF5 srityje buvo vos 72,2%. Be to, skirtumas tarp lietuviškų padermių buvo toks pat didelis, kaip ir tarp kitų Europos virusinių padermių. Nors visos šiame darbe nustatytos nukleotidų sekos buvo aiškiai europinio tipo, filogenetinė analizė parodė, kad lietuviškų padermių nukleotidų sekos buvo kilusios iš prototipinių sekų, kurios panašesnės į amerikinio tipo virusines padermes nei iki tol manyta. Be to, Lietuvos KRKSv padermių nukleotidų ilgis ORF7 srityje buvo 378 nukleotidai – tarpinis ilgis tarp europinio (387 nukleotidai) ir amerikinio tipo (372 nukleotidai) ORF7 regione. Tyrimo rezultatai patvirtina hipotezę, kad europinio ir amerikinio genotipo KRKSv yra kilę iš bendro protėvio.

Raktažodžiai: KRKSv, filogenetinė analizė, nukleotidų sekos, ORF5 genas.

GENETIC DIVERSITY AND PHYLOGENETIC ANALYSES OF LITHUANIAN STRAINS OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS IN ORF5 AND ORF7 REGIONS

Summary. The fragment ORF5 gene and complete ORF7 gene of pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) field strains from Lithuanian pig population were amplified by reverse transcriptase polymerase chain reaction and their nucleotide sequences were determined. It was found that Lithuanian PRRSv sequences were exceptionally diverse. The most diverse present-day European-type PRRSv sequences were from Lithuanian two farms, and exhibited only 72.2% nucleotide identity in ORF5. Furthermore, the diversity between the Lithuanian sequences was as high as among any other European sequences. While all sequences determined in the present study were clearly of European type, phylogenetic analysis showed that the Lithuanian sequences were derived from ancestral sequences that were more US-like than previously seen in Europe. In addition, the length of the ORF7 of the Lithuanian strains was 378 nucleotides, and thus intermediate between the sizes of prototypical EU-type (387 nucleotides) and US-type (372 nucleotides) ORF7 lengths. These findings for the Lithuanian PRRSv sequences provide support for the hypothesis that the EU and US genotypes of PRRSv evolved from a common ancestor.

Keywords: PRRSv, phylogenetic analysis, nucleotide sequences, ORF5 gene.

Įvadas. Kiaulių reprodukcinio ir kvėpavimo sindromo (KRKS) virusas šiuo metu kiaulininkystei kelia globalines problemas, nes ūkiams padaro didelių ekonominių nuostolių, pasireiškiančių kiaulaičių ir paršavedžių reprodukcijos sutrikimais, o tik gimusių arba nujunkomų paršelių – kvėpavimo sistemos susirgimais, dideliu gaišimu. Apie šią ligą pirmą kartą buvo pranešta Amerikoje ir Kanadoje 1987 (Keffaber, 1989; Hill 1990), Japonijoje 1989, (Shimizu et al., 1994), Vokietijoje 1990 metais (Lindhaus W., Lindhaus B. et al., 1991). Ligą sukelia kiaulių reprodukcinio ir kvėpavimo sindromo virusas (KRKSv), kuris kartu su pelių laktatdehidrogenazės virusu (LDV), arklių arterito virusu (EAV) ir beždžionių hemoraginės karštinės virusu (SHFV) priskiriamas *Arteriviridae* šeimos *Arterivirus* genčiai (Cavanagh, 1997). KRKSv turi viengubą, teigiamą, apvalkalo apsuptą, apytikriai 15 kb RNR genomą, kuriame yra net devyni atviri nuskaitymo rėmeliai (ORF), koduojantys virusinę replikazę (ORF1a ir 1b), keturis su membranomis surištus glikoproteinus (nuo ORF2a iki 5), du membraninius proteinus (ORF2b ir

ORF6) ir nukleokapsidės proteiną N (ORF7) (Madrassi et al., 1996; Meulenberg et al., 1995; Meng et al., 1994; Wu et al., 2001).

Genomo regionų sekų analizė parodė, kad tarp prototipinių Šiaurės Amerikos (VR-2332) ir Europos (*Lelystad* virusas – LV) (Meulenberg et al., 1993; Murtaugh et al., 1995; Nelsen et al., 1999) KRKSv padermių yra ženklūs genetiniai skirtumai. Šios prototipinės padermės apibrėžė ir išskyrė du visuotinai pripažįstamus KRKSv genotipus – Amerikos (US) ir Europos (EU). Be to, abu genotipai aiškiai skiriasi antigeniškai ir pagal sekų analizes (Mengel, 2000; Dea et al., 2000). Pasaulinės KRKSv epizootijos pradžioje europinis tipas buvo nustatytas tik Europoje, kai tuo tarpu amerikinis buvo paplitęs Šiaurės ir Centrinėje Amerikoje (Andreyev et al., 1997) bei Azijoje (Shibata et al., 1996). Neseniai europinis tipas buvo aptiktas ir Kanadoje (Dewey et al., 2000), o amerikinis genotipas į Europos kiaulių bandas pateko kartu su gyva vakcina (Botner et al., 1997; Botner et al., 1999; Storgaard et al., 1999; Nielsen et al., 2001, Nielsen et al., 2002).

Nemažai publikacijų įrodo, kad genetinis kintamumas būdingas amerikinio tipo KRKS virusui (Meng et al., 1995; Kapur et al., 1996; Andreyev et al., 1997; Pirzadeh et al., 1998; Morozov et al., 1995; Gagnon, Dea, 1998). Ankstesni tyrimai parodė, kad europiniam genotipui būdingas nedidelis genetinis kintamumas (Suarez et al., 1996; Drew et al., 1997; Le Gall et al., 1998). Vėliau atlikti tyrimai Danijoje ir Italijoje pateikė kitokius, netikėtai priešingus duomenis, rodančius itin ryškius europinio tipo padermių genetinius skirtumus (Madsen et al., 1998; Oleksiewicz et al., 2000; Nielsen et al., 2000; Forsberg et al., 2001; Forsberg et al., 2002). Pastarojo meto tyrimai parodė, kad Čekijoje KRKSv izoliatai gali būti visai nepanašūs į prototipinį *Lelystad* virusą (Indik et al., 2000). Taip pat yra požymių, kad Rusijos europinio tipo KRKSv visiškai nepanašūs į paplitusius Vakarų Europoje (Andreyev et al., 1999).

Kadangi atsparumas heterogeniškai užsikrėsti virusinėmis europinio arba amerikinio tipo padermėmis labai menkas (Meng, 2000), KRKSv genetiniai skirtumai gali smarkiai veikti monokloninių antikūnų reaktyvumą (Rowland et al., 1999) arba polimerazės grandininės reakcijos (PGR) oligonukleotidinių pradmenų efektyvumą. Todėl būtina išsiaiškinti viruso europinio tipo genetinius skirtumus ir padermių įvairovę, nes tai turi reikšmės kuriant gyvas atenuotas vakcinas ir diagnozuojant. Moksliniu požiūriu KRKSv įdomūs dar ir tuo, kad europinis ir amerikinis genotipai pasaulyje atsirado ir buvo nustatyti beveik vienu metu skirtinguose žemynuose, gana uždaroje kiaulių populiacijose. Jų kilmei išsiaiškinti pateiktos kelios hipotezės, kurias patikrinti dažnai trūksta duomenų, ypač iš tų šalių, kurios ilgą laiką buvo izoliuotos. Lietuva – kaip tik tokia šalis, todėl tyrimų duomenys būtų naudingi ne tik praktiniu, bet ir moksliniu požiūriu.

Siekiant išsiaiškinti galimą KRKSv genetinę įvairovę Lietuvos kiaulių populiacijoje ir papildyti kitų šalių mokslininkų informaciją apie kai kurių viruso genomo regionų sekų skirtumus, **darbo tikslas** buvo ištirti Lietuvoje paplitusių KRKSv padermių ORF5 ir ORF7 genomo regionus, nustatyti nukleotidų sekas, atlikti filogenetinę analizę, palyginti su kitomis Europoje paplitusiomis padermėmis, palyginti vietinių padermių nukleotidų sekų numatomą ORF5 baltymo antigeniškumą su vakcininių padermių antigeniškumu.

Medžiagos ir metodai. RNR išskyrimas. Tyrimams naudota KRKSv RNR buvo išskirta iš kiaulių kraujo serumo mėginių. Šiam tikslui paimtas išskyrimo rinkinys „Total RNA Prep Plus“, kurio veikimas paremtas modifikuotu Chomczynskio metodu (Chomczynski, Sacchi, 1987). Visa RNR izoliavimo procedūra buvo atliekama pagal gamintojų (A&A Biotechnology, Gdyne, Lenkija) aprašymą. 250 μl tiriamo serumo buvo trumpai, veikiami 800 μl fenozolu, kuris sukelia visišką ląstelių lizę. Inkubuojama 50°C temperatūroje 5 min. ir užpilama 200 μl chloroformo, intensyviai kratoma (kratykle „MS1 Minishaker“) 15 sek., tada 3 min. laikoma kambario temperatūroje ir 10 min. centrifuguojama (10 tūkst. aps./min.). Paviršinė frakcija perkeliama į naują mėgintuvėlį, užpilama 250 μl izopropanolio, sumaišoma ir perkeliama į kitą mėgintuvėlį su specialia membrana,

imobilizuojančia RNR, centrifuguojama (10 tūkst. aps./min., 1 min.). Virusinės RNR molekulės, prisitvirtinusios membranos struktūroje, tris kartus praplaunamos specialiu tirpalu, kurio sudėtyje yra 96⁰ etanolio. 700 μl plaunamojo tirpalo užpilama ant membranos su RNR ir vėl 2 min. centrifuguojama 10 tūkst. aps./min. Nusausinus RNR centrifugavimu (2 min. 10 tūkst. aps./min.), ant membraną užpilama 100 μl vandens, kuris neturi R-nazių ir kitų inhibitorinių medžiagų (DEPC vanduo). Bendra ekstrahuota RNR panaudota kaip matrica vieno mėgintuvėlio atvirkštinės transkripcijos lizdinėje polimerazės grandininėje reakcijoje (AT-PGR).

AT-PGR. Vieno mėgintuvėlio lizdinėje AT-PGR pirmiausia buvo ruošiami reagentai antram, t.y. lizdinės PGR etapui. Šiam tikslui paruošiamas reakcijos mišinys, kuriame yra 5 μl 22% trehalozės („Sigma“), naudojamas kitiems reakcijos komponentams išlaikyti, 20 pmol/μl kiekvieno iš vidinių nukleotidų pradmenų ORF5F (5'ATGAGATGTTCTCACAAATTGGGGCG3') ir ORF5R (5'CTAGGCCTCCCATTGCTCAGCCGAAGT 3') (Suarez et al., 1996), 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 Eppendorfo mėgintuvėlio dangtelį tokio lizdinės PGR mišinio išpilstoma po 8,25 μl ir paliekama 2 val. kambario temperatūroje džiūti. Taip išdžiovinti reagentai tinka naudoti 6 mėnesius.

Kitame etape buvo panaudoti tie patys 0,2 ml Eppendorfo mėgintuvėliai, kurių kamšteliuose buvo trehalozėje išdžiovinti lizdinės PGR komponentai. Atvirkštinė transkripcija (AT) ir PGR-I buvo atliekama 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 EUORF5B (5' CAATGAGGTGGGCIACAACC 3') ir EUORF5C (5'TATGTIATGCTAAAGGCTAGC 3'), 1μl 10% tritonX-100 („Sigma“), 0,5 μl (2,5 U) Taq DNA polimerazės („Fermentas“), 0,2 μl (10 U) RNasin („Fermentas“), 0,5 μl (100U) MMLV reversinės transkriptazės („Fermentas“) ir 29,25 μl DEPC vandens. AT-PGR mišiniui mėgintuvėlio dugne atskirti 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-PGR-I, atvirkštinė transkripcija buvo atliekama termocikleryje 42⁰ C temperatūroje 30 min. AT fermentai inaktyvuojami kaitinant 95⁰ C temperatūroje 5 min. ir iš karto pradama 30 ciklų amplifikacijos reakcija: cDNR denatūravimas – 94⁰ C temperatūroje 1 min., hibridinimas su specifiniais pradmenimis – 55⁰ C temperatūroje 1 min., cDNR elongacija (prailginimas) – 72⁰ C temperatūroje 1,5 min. Pasibaigus pirmajam amplifikacijos etapui, mėgintuvėliai buvo apverčiami keletą kartų, kad susimaišytų ir ištirptų lizdinės PGR komponentai mėgintuvėlio dangtelyje su PGR-I produktais, esančiais dugne. Vėliau mėgintuvėliai buvo trumpai centrifuguojami ir atliekama lizdinė PGR taikant

35 amplifikavimo ciklus: 94⁰ C temperatūroje 1 min., 55⁰ C temperatūroje 1 min., 72⁰ C temperatūroje 1,5 min. Amplifikavimui baigti buvo naudojama ilginimo procedūra 72⁰ C temperatūroje 10 min. Tokiu būdu gautas AT-PGR produktas 606 bp.

AT-PGR amplifikacijos produktai buvo analizuojami 2% agarozės gelyje (Top Vision™ GQ Agarose, Fermentas), dažytame etidžio bromidu (koncentracija 1 µg/ml). 10 µl PGR produkto buvo atliekama elektroforezė 1xTBE buferyje (90mM Tris, 90mM boro rūgšties, 2 mM EDTA) 45 min. leidžiant 120 V srovę. PGR rezultatai buvo matomi UV lempos spinduliuose esant specifiniam DNR juostelių švytėjimui 606 bp molekulinį žymeklį GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus („Fermentas“) atitinkančioje pozicijoje.

ORF7 regionui amplifikuoti atrinkti mėginiai, kuriuose buvo nustatyta KRKSv RNR. 5 µl RNR buvo maišoma su 8,25 µl vandens, 4 µl 5x MMLV AT buferio (Fermentas), 1 µl dNTPs (10 mM kiekvieno), 0,5 µl MMLV (Fermentas), 0,25 RNasin („Fermentas“), 1 µl atsitiktinio heksanukleotido (100 ng) („Pharmacia“), o ant viršaus užpilama mineralinio aliejaus. Atliekant atvirkštinę transkripciją, mišinys buvo inkubuojamas 37⁰ C temperatūroje 90 min. ir 10 min. kaitinamas 95⁰ C temperatūroje. Amplifikuojant ORF7 genomo regioną, PGR buvo panaudoti 5 µl cDNR ir 45 µl reakcijos mišinio (28,8 µl vandens, 10 µl 5x Taq polimerazės reakcijos buferio, 5 µl 25 mM MgCl₂, 4 µl dNTPs (10 mM), 1 U Taq DNR polimerazės (Fermentas), 20 pmol kiekvieno pradmenis: 5' GCCCCTGCCCAICACG 3' ir 5' TCGCCCTAATTGAATAGGTGA 3' (Oleksiewicz et al., 1998). 50 µl mišinys buvo amplifikuojamas PGR atliekant 35 ciklus: 94⁰ C temperatūroje 15 sek., 52⁰ C temperatūroje 30 sek., 72⁰ C temperatūroje 30 sek. Galutinis PGR produktų išplėtimas buvo atliekamas 72⁰ C temperatūroje 10 min. Tokiu būdu gautas AT-PGR 637 bp produktas, atitinkantis ORF7 genomo sritį.

Sekų nustatymas. Prieš nustatant pasirinktų regionų nukleotidų sekas, PGR produktai, atlikus elektroforezė 1,5% agarozės gelyje, buvo plaunami nuo pašalinių druskų. Specifinės molekulinės masės PGR produktų juostelės išpjaunamos ir juose esanti DNR surenkama 0,45 µl Ultrafree-MC specialiais filtriniais mėgintuvėliais (Millipore). Gelyje išvalytų, tačiau neklonuotų PGR produktų nukleotidų sekos buvo nustatytos naudojant BigDye Terminator Cycle Sequencing rinkinį (v2,0, Applied Biosystems) ir ABI310 genetinį analizatorių (Applied Biosystems), esantį Danijos veterinarijos institute. ORF5 PGR produktų abiejų nukleotidų grandinių sekos buvo nustatytos su tais pačiais pradmenimis, kaip ir lizdinė PGR. ORF7 regiono sekos nustatytos naudojant pradmenis R133 (5' TCGCCCTAATTGAATAGGTGACTC 3') ir F132 (5' GTGCTGGGCGGCAAACGAGCTGGT 3') (Drew et al., 1997). Gautos sekos toliau buvo tvarkomos kompiuterine programa „SeqMan“ („Lasergene“ paketo programa, DNASTAR Inc.). AT lizdinė PGR ir pateiktas sekų nustatymo metodas padėjo nustatyti dalinę ORF5 regiono nukleotidų seką (432 nukleotidai, kurie atitiko 97-528 ORF5 poziciją) ir visiškai pasibaigusią ORF7 srities nukleotidų seką.

Statistinė duomenų analizė. CLUSTAL X programa buvo naudota sekų analizei ir palyginimui (Thomson et al., 1994), o moduliacijos pereinamajam santykiui išaiškinti (transition/transversion ration) taikyta statistinė kompiuterinė programa TREEPUZZLE 5.0 (Strimmer, von Haeseler, 1996). Šis santykis buvo taikomas DNADIST programoje iš PHYLIP programinio paketo (Felsenstein, 1989), kad tarp dviejų nukleotidų sekų būtų galima nustatyti genetinį atstumą. Pagal genetinio atstumo matricą filogenetiniai medžiai buvo sukonstruoti Fich-Margolisch metodu FITCH programa iš PHYLIP paketo. ORF5 baltymo antigeninės determinantės buvo išaiškintos pagal nukleotidų sekas, koduojančias šį baltymą, pasitelkus kompiuterinę programą PROTEAN („Lasergene“ programinis paketas). Programa taiko Jamesono ir Wolfo algoritimą, kuris įvertina nukleotidų grandinės lankstumą, hidrofiliškumą, antrinę struktūrą ir keletą kitų parametrų (Jameson, Wolf, 1988).

Tyrimų rezultatai. Lizdine vieno mėgintuvėlio AT-PGR buvo amplifikuoti KRKSv genomo fragmentai, kurie koduoja glikoproteiną GP5 (ORF5) ir nukleokapsidės proteiną N (ORF7). Iš viso sekoms nustatyti buvo atrinkti keturių ūkių, kurie geriausiai geografiškai atitiko Lietuvos vaizdą, kiaulių kraujo serumo mėginiai, turėję KRKSv virionus. Atlikus sekų analizę, filogenetiškai įvertinti buvo pasirinkti keturi mėginiai. ORF5 ir ORF7 regionų nukleotidų sekos buvo pateiktos pasaulinei duomenų bazei GenBank. Lietuviškos KRKSv padermės buvo filogenetiškai palygintos kartu su gerai žinomomis Europos ir Amerikos etaloninėmis padermėmis, taip pat ir su dviejų komercinių atenuotų vakcinų nukleotidų sekomis. Visi filogenetinio medžio konstravimui panaudoti KRKSv padermių duomenys ir genų duomenų banko numeriai pateikti lentelėje. Europinio tipo KRKS viruso ORF5 geno sekų filogenetinis medis (1 pav.) buvo sukonstruotas pagal keturias naujas Lietuvos ir 54 anksčiau publikuotas skirtingų Europos šalių sekas, kurios naujai parodė Lietuvos ir kitų Europos šalių KRKSv padermių genetinę įvairovę.

Kadangi Ispanijos, Danijos, Italijos ir Čekijos KRKSv padermės jau anksčiau turėjo didžiausią sekų skirtumą Europoje (Suarez et al., 1996; Indik et al., 2000; Forsberg et al., 2001; Forsberg et al., 2002), rezultatai buvo palyginti su Lietuvoje paplitusių šio viruso padermių nukleotidų sekomis. Pačiais paprasčiausiais sekų nagrinėjimo metodais, t.y. nukleotidų identiškumo procentinį palyginimą, buvo nustatytos keturios labiausiai šiuo metu Europoje skirtingos KRKSv padermės – visos iš Lietuvos kiaulių populiacijos. (LT 1–4, 1 pav.). Kitos genetiškai skirtingos padermės ORF5 regiono srityje buvo iš geografiškai labai artimų Lenkijos ūkių. Palyginus labiausiai skirtingas LT1 ir lenkišką PL9 KRKSv padermes nustatyta, kad nukleotidų identiškumas tarp jų buvo tik 71,5% (detaliai neparodyta, bet matyti 1 pav.). Pašalinus lietuviškų ir lenkiškų KRKSv sekas iš duomenų bazės paaiškėjo, kad labiausiai skirtingas europinių padermių sekas turėjo Italijos (2156, IT1) ir Ispanijos (Olot91, IS1) izoliatai, kurių nukleotidų identiškumas nustatytas tik 82,4%. Taigi šie duomenys rodo, kad

Lietuvos ir kai kurios Lenkijos KRKSv padermės ORF5 geno srityje turėjo didžiausią iki šiol žinomą europinio genotipo KRKSv skirtumą. Būtina paminėti, kad filogenetiniame medyje (1 pav.) labiausiai nutolusios lietuviška (AB „Aušruvos agrofirma“, Biržų r. 2000) ir lenkiška (Nie, 1997) padermės laiko ir geografiniu požiūriu buvo labai skirtingos. Kai sekų analizė buvo susiaurinta ir atliekama tik su 2000 m. padermėmis, labiausiai skyrėsi AB „Sidabra“ Joniškio r. (Lietuva) ir KRZ (Lenkija) (LT2 ir LK13, 1 pav.), kurių nukleotidai buvo tik 72,2% identiški (detaliai neparodyta, bet matyti 1 pav.). Vis dėlto Lietuvos KRKSv padermių sekos pasirodė labiau skirtingos nei visos kitos anksčiau analizuotos (1 pav. LT1-LT4). Be to, ir tarp lietuviškų sekų skirtumai pasirodė didesni už bet kurias kitas Europos KRKSv nukleotidų sekas (detaliai neparodyta, bet matyti 1 pav.).

Norint nustatyti, kokią vietą išimtinai skirtingos Lietuvos padermių sekos užima Europos ir Amerikos KRKSv genealogijoje, panaudojant labiausiai skirtingų Amerikos ir Azijos KRKSv sekas iš to paties geno regiono buvo sukonstruotas filogenetinis medis (lentelė). Rezultatai parodė, kad visos skirtingų Europos šalių sekos iš ORF5 geno regiono, įskaitant ir lietuviškas, nuolat buvo mažiau nei 64% identiškos amerikinio KRKSv genotipo sekų nukleotidams ir mažiau nei 70% identiškos aminorūgštims. Tai atitiko bendrus europinio ir amerikinio KRKSv genotipų skirtumus tiek nukleotidų, tiek ir aminorūgščių lygiu, o lietuviškos sekos aiškiai priklausė europiniam genotipui (2 pav.). Pagal nukleotidų sekų analizę sukonstruotas filogenetinis europinis ir amerikinis ORF5 medis parodė, kad išimtinai skirtingos Lietuvos virusų populiacijos yra susijungusios prie labai ilgos Amerikos ir Europos medžio šakos. Šis iššakojęs medelis turi aiškų plėtros pagrindą (2A pav.). Norint patikrinti gautus rezultatus, dviem (LT1 ir LT2) labiausiai ORF5 geno srityje nutolusioms Lietuvos KRKSv padermėms buvo galutinai nustatytos labai konservatyvios, nukleokapsidės proteiną koduojančios ORF7 srities nukleotidų sekos. Lietuvos KRKSv padermių ilgis ORF7 srityje buvo 378 nukleotidai. Tai tarpinis ilgis tarp europinio (387 nukleotidai) ir amerikinio tipo (372 nukleotidai) KRKSv ORF7 regione.

Filogenetiniame medžiui konstruoti panaudota ir KRKSv europinio prototipinio viruso *Lelystad* ORF7 seka (O1.1). Filogenetinės analizės rezultatai pateikti 2B pav. ORF7 sekų filogenetinis medis patvirtino ankstesnįjį ORF5 geneologinio medžio šakojimosi šabloną. Kai kurie šakojimosi profiliai, pastebimi abejose ORF5 ir ORF7 genealogijose, aiškiai paneigia nuomonę, kad unikali Lietuvos padermių padėtis atsirado dėl paveldėtos europinio ir amerikinio KRKSv tipo rekombinacijos. Unikali ORF5 ir ORF7 sekų filogenetinis šakojimasis (2A ir 2B pav.) rodo, kad dabartinės europinės nukleotidų sekos kilusios iš paprasčiausiai paveldėtų sekų, kurios pasirodė daug artimesnės filogenetiškai amerikiniam genotipui, nei iki šiol buvo žinoma.

Lietuvoje paplitusių KRKSv padermių išimtinai skirtingi ORF5 sekų duomenys, koduojantys ORF5 proteiną, paskatino palyginti numatomus antigeninius

profilų skirtumus tarp šiuo metu turimos gyvos KRKSv europinio tipo vakcinos ir atrinktų dabartinių viruso skirtingų lauko padermių sekų (3 pav). Nukleotidų regiono atkarpa tarp 89 ir 109 turėjo didžiausius numatomus antigeninius skirtumus iš visų KRKSv padermių sekų. Ši nukleotidų atkarpa buvo daug aukštesnio numatomo antigeniškumo nei vakcininės VAC3 arba VAC4 padermės.

Aptarimas ir išvados. Staiga pasireikšusi KRKS infekcija įvairių šalių kiaulių populiacijoje vis dar yra pagrindinė didelių ekonominių nuostolių kiaulininkystėje priežastis. Šiaurės Amerikoje neseniai pasireikšęs gana atipiškas, labai ūmus KRKS leido manyti, kad epizootija kilo dėl to, jog atsirado naujos KRKSv padermės, nuo kurių vakcinos negalėjo kiaulių apsaugoti (Meng, 2000). Panašios įvykių eigos galima tikėtis ir Lietuvoje arba kitose Europos šalyse, todėl žinios apie genetinius europinio tipo KRKSv skirtumus gali patobulinti panašių įvykių apskaičiavimo metodus. Jau žinoma, kad Rusijos ir Čekijos KRKSv padermės labai skyrėsi nuo virusinių padermių, paplitusių Vakarų Europoje (Andreyev et al., 1999; Indik et al., 2000). Be to, čekiškių KRKSv sekų filogenetinė analizė atlikta su labai nedideliu Europoje paplitusių padermių skaičiumi, o Rusijos KRKSv sekos net nebuvo pateiktos viešosioms duomenų bazėms. Taigi mūsų atlikti tyrimai pasitarnavo tam, kad būtų galima toliau tirti viruso genetinius skirtumus Europoje, papildyti jau turimus duomenis iš šalies, kurioje KRKSv infekcija pasireiškė gana vėlai, tik 1997 m. pradžioje. Būtina paminėti, kad liga pagal būdingus klinikinius simptomus ir antikūnus diagnozuota imunofermentinės analizės (IFA) būdu (Stankevičienė, Stankevičius, 2002; Janutėnaitė et al., 2000).

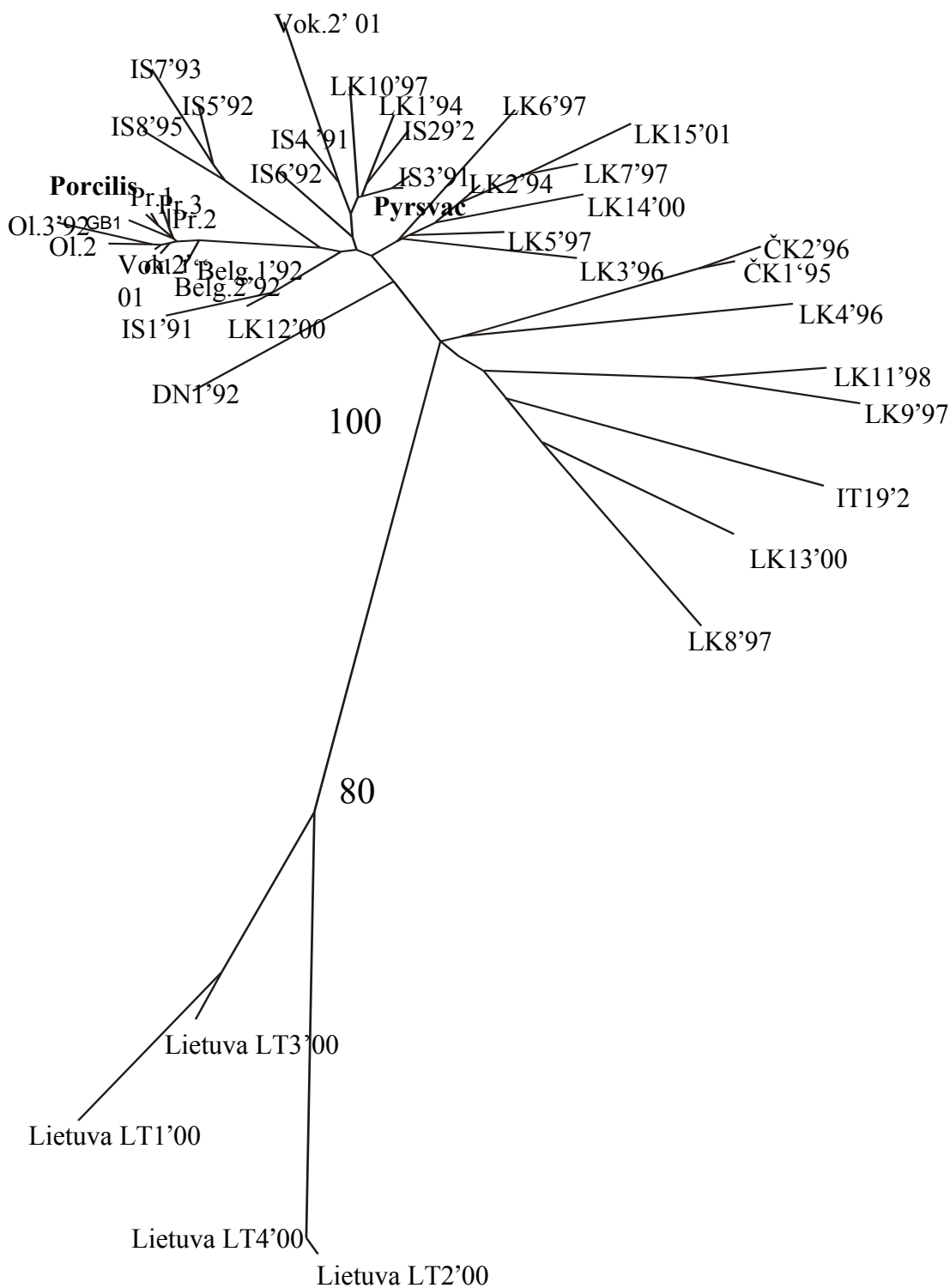
Mūsų atlikti tyrimai parodė, kad Lietuvos kiaulių populiacijoje paplitusios ypač skirtingos KRKSv padermės palyginti su kitais europietiško genotipo virusais. Būtina paminėti, kad visos keturios KRKSv padermės buvo amplifikuotos iš kiaulių serumo mėginių. Galima manyti, kad AT-PGR produktų sekos ORF5 arba ORF7 geno srityse buvo gautos ne iš laštelėse esančios greitai pažeidžiamos virusinės RNR, bet iš kiaulių aplinkoje cirkuliuojančių visiškai baigtų virionų. Svarbu, kad virusinės sekos nustatytos tiesiogiai sekvenuojant abi neklonuoto AT-PGR produkto nukleotidų grandines. Taip buvo stengiamasi sumažinti Taq polimerazės indukuojamus artefaktus. Kadangi tyrimų rezultatai buvo gana netikėti ir moksliniu požiūriu labai įdomūs, norėdami įsitikinti, ar jie patikimi, atlikome papildomus AT-PGR ir sekvenavimo tyrimus. Pirmiausia buvo pakartota AT-PGR ir gautų produktų sekvenavimas su tais pačiais kraujo serumo mėginiais, kuriuose jau buvo nustatytas KRKSv. Gautos tokios pačios DNR fragmentų sekos. Be to, lietuviškų KRKSv padermių filogenetinė analizė su ORF5 ir ORF7 nukleotidų sekomis parodė toki patį filogenetinį grupavimąsi (2A, B pav.). Lietuviškų KRKSv sekos buvo panašiai skirtingos kaip ir Rusijos KRKSv, kurios skyrėsi ORF7 geno srityje net 16% nuo prototipinio *Lelystad* viruso (Andreyev et al., 1999). Mūsų nuomone, visi šie duomenys neleidžia abejoti, kad unikali lietuviškos KRKSv sekos gautos dėl kokių nors

Lentelė. Filogenetiniams tyrimams panaudotos KRKSv padermės ir duomenų bazės (GenBank) registracijos numeriai

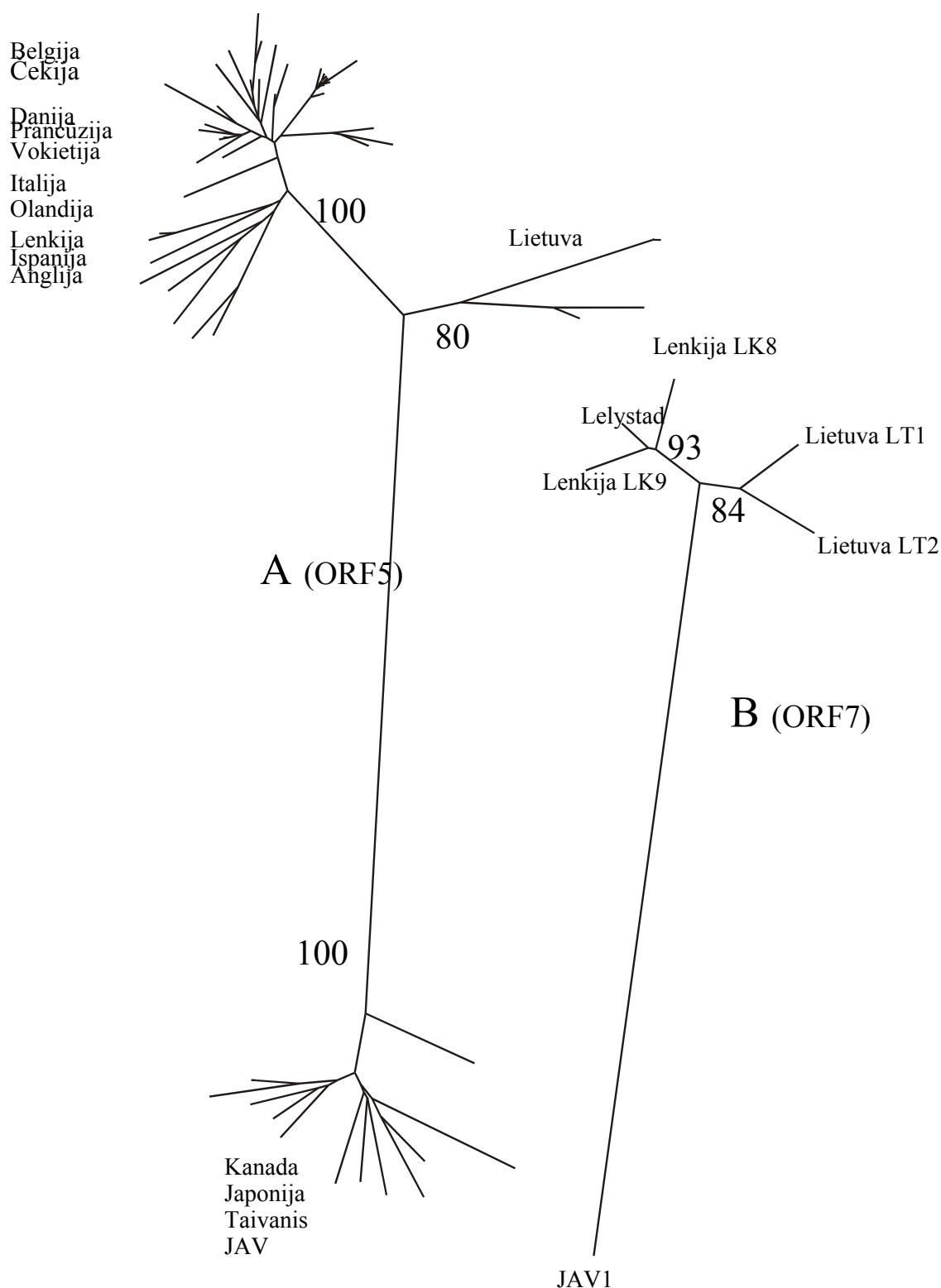
| KRKSv padermė | Genotipas | Trumpinys | Šalis | Metai | Numeris duomenų bazėje |
|---------------|-----------|-----------------|-----------------|-------|------------------------|
| Auš. | EU | LT1 | Lietuva | 2000 | AF378800*AF438362** |
| Sid. | EU | LT2 | Lietuva | 2000 | AF378801*AF438363** |
| Dai. | EU | LT3 | Lietuva | 2000 | AF378802* |
| Auk. | EU | LT4 | Lietuva | 2000 | AF378803* |
| Lek | EU | LK1 | Lenkija | 1994 | AF378804 |
| Bie94 | EU | LK 2 | Lenkija | 1994 | AF378805 |
| Kwi | EU | LK 3 | Lenkija | 1996 | AF378806 |
| Kon | EU | LK 4 | Lenkija | 1996 | AF378807 |
| Zbr | EU | LK 5 | Lenkija | 1997 | AF378808 |
| Pol | EU | LK 6 | Lenkija | 1997 | AF378809 |
| Bie97 | EU | LK 7 | Lenkija | 1997 | AF378810 |
| Rak | EU | LK 8 | Lenkija | 1997 | AF378811, AF438360 |
| Nie | EU | LK 9 | Lenkija | 1997 | AF378812, AF438361 |
| Sma | EU | LK 10 | Lenkija | 1997 | AF378813 |
| Jed | EU | LK 11 | Lenkija | 1998 | AF37881 |
| Gra | EU | LK 12 | Lenkija | 2000 | AF378815 |
| Krz | EU | LK 13 | Lenkija | 2000 | AF378817 |
| Gro | EU | LK 14 | Lenkija | 2000 | AF378816 |
| 92V058 | EU | Belg. 1 | Belgija | | U40701 |
| AV30 | EU | Belg. 2 | Belgija | 1992 | U40700 |
| IAF-BAJ | US | | Kanada | 1991 | U64929 |
| 47324-2 | US | | Kanada | 1993 | U66387 |
| V503 | EU | ČK 1 | Čekija | 1995 | AF253537 |
| V501 | EU | ČK 2 | Čekija | 1996 | AF253531 |
| DK111-92 | EU | DN1 | Danija | 1992 | AJ223078 |
| 5A | EU | Pr. 1 | Prancūzija | | U40697 |
| 6A | EU | Pr. 2 | Prancūzija | | U40698 |
| 8D | EU | Pr. 3 | Prancūzija | | U40699 |
| Arnsberg | EU | Vok. 1 | Vokietija | | AF378797 |
| AS1 | EU | Vok. 2 | Vokietija | 2001 | AF378798 |
| 2156 | EU | IT1 | Italija | 1992 | U40696 |
| EDRD-1 | US | | Japonija | 1992 | D45852 |
| Kitasato 93-1 | US | | Japonija | | AB023782 |
| Olot/91 | EU | IS1 | Ispanija | 1991 | X92942 |
| 5999 | EU | IS2 | Ispanija | 1991 | U40691 |
| 5710-9 | EU | IS 3 | Ispanija | 1991 | U40687 |
| 4606 | EU | IS 4 | Ispanija | 1991 | U40690 |
| 2228 | EU | IS 5 | Ispanija | 1992 | U40688 |
| 3211 | EU | IS 6 | Ispanija | 1992 | U40689 |
| 705 | EU | IS 7 | Ispanija | 1993 | U40692 |
| P035 | EU | IS 8 | Ispanija | 1995 | U40694 |
| MD-001 | US | | Taivanas | | AF121131 |
| Lelystad | EU | Ol. 1 | Olandija | | M96262 |
| Boxmeer 10 | EU | Ol. 2 | Olandija | | L04927 |
| NL-3.1 | EU | Ol. 3 | Olandija | 1992 | U40695 |
| VR-2332 | US | US1 | US | | U87392 |
| 1205 | US | | US | 1992 | U66397 |
| 22805 | US | | US | 1992 | U66389 |
| 30093 | US | | US | 1992 | U66395 |
| 32983 | US | | US | 1993 | U66384 |
| RespPRRS | US | | US vakcina | | AF066183 |
| PrimePac PRRS | US | | US vakcina | | AF066384 |
| Porcilis | EU | VAC3 (Porcilis) | Olandiška vakc. | | AF378819 |
| Pyrsvac | EU | VAC4 (Pyrsvac) | Ispaniška vakc. | | AF378820 |

* Lietuviškų KRKSv padermių ORF5 nukleotidų sekos

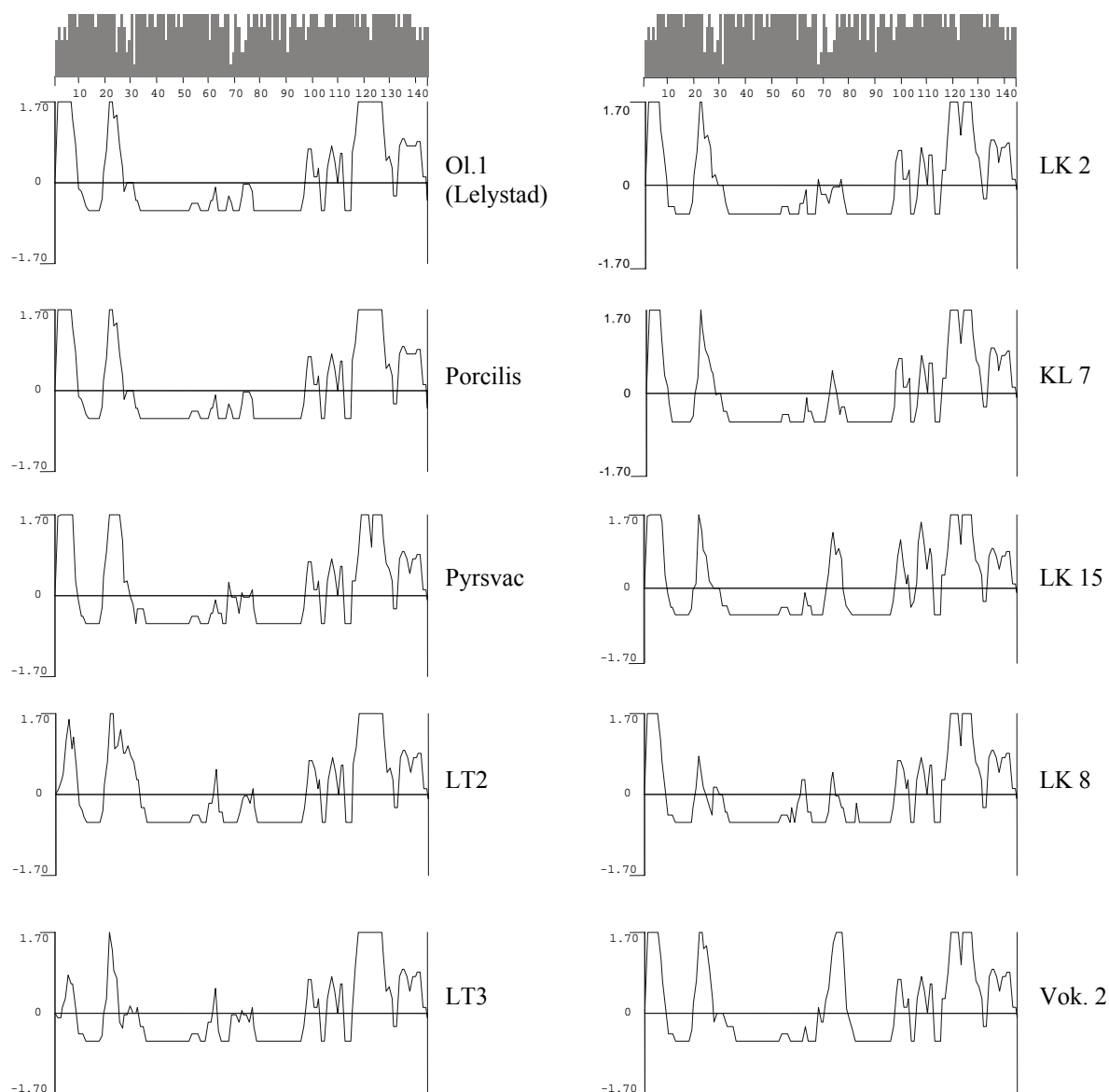
** Lietuviškų KRKSv padermių ORF7 nukleotidų sekos



1 pav. Europinio genotipo KRKSv ORF5 sekų filogenetinis medis, sudarytas FITCH kompiuterine programa iš PHYLIP programinio paketo



2 pav. Europinio ir amerikinio genotipų KRKSv filogenetinis medis, sudarytas pagal skirtingiausių padermių nukleotidų sekas. Didysis A medis pateikia filogenetinį ORF5 srities nukleotidų giminingumą, o mažasis B sudarytas pagal kelias KRKSv ORF7 regiono sekas



3 pav. Jamesono ir Woflo numatomo antigeniškumo diagramos atrinktiems europinio genotipo KRKSv padermėms. Aukštos kreivės rodo ORF5 sričių aukštą antigeniškumą. Viršutiniame grafike esantys pakilimai ir nusileidimai rodo KRKSv ORF5 aminorūgščių didelio ir mažo panašumo sritis

metodinių artefaktų. Sekų analizė parodė ir labai netikėtą, neįprastą šakojimąsi europietišku ir amerikietišku sekų filogenezėje, kai mūsų ištirtos padermės filogenetiniame medyje išsidėstė daug arčiau amerikinio genotipo virusų, nei iki šiol buvo žinomos kitos europinio tipo KRKSv padermės.

Lietuviškų ir lenkiškų padermių ORF5 regiono sekų analizė parodė, kad kai kurie Rytų Europoje paplitę KRKSv nukleotidai yra mažiau nei 71,5% tapatūs (1 pav. LT1 ir LK9). Kitiems RNR turintiems virusams, pavyzdžiui, pestivirusams, E2 glikoproteino geno srityje sekų skirtumai iki 18,8% leidžia juos priskirti izoliatų kategorijai, nuo 17,4% iki 33,8% pogrupo ir 34,3-66,1% rūšies kategorijoms (Becher et al., 1999). Lietuviškų KRKSv 71,5% nukleotidų tapatumas, nustatytas ORF5

glikoproteino geno srityje, visiškai pateisina pogrupo sąvoką ir juos galima būtų priskirti pereinamajai pogrupo rūšiai. Apie tai spėsti būtų galima tik tuo atveju, jei mokslinėje literatūroje būtų paskelbta daug daugiau tyrimų rezultatų iš geografiniu požiūriu artimų Latvijos, Estijos, Baltarusijos ir Rusijos kiaulių populiacijų.

Visapusiai europinio tipo KRKSv padermių genetinių skirtumų tyrimai turėtų apimti kuo daugiau Europos šalių virusų izoliatų nuo 1991 metų, pirmą kartą izolavus KRKSv padermę *Lelystad*, iki šiol. Toks idealus tyrimas sunkiai įgyvendinamas dėl organizacinių ir finansinių priežasčių. Greičiausiai KRKSv sekų skirtumai bus tyrinėjami paskirai. Mūsų tyrimų duomenys papildo ankstesnių autorių darbus apie Europos KRKSv genetinius skirtumus (Suarez et al., 1996; Oleksiewicz et

al., 2000; Indik et al., 2000; Forsberg et al., 2001. Forsberg et al., 2002). Skirtingų KRKSv padermių paplitimas daugelyje Europos šalių galėtų būti ne išimtis, kaip Lietuvos atveju, bet dėsningumas, kurį iš dalies galėtų patvirtinti ir filogenetinis medis (2 pav.), jeigu pašalintume KRKSv padermes iš Olandijos, Belgijos, Prancūzijos ir Anglijos. Šių šalių virusų sekos labai artimos prototipiniam *Lelystad* virusui. KRKSv sekų giminingumą iš dalies galima paaiškinti ir glaudžiais prekybos ryšiais. Kad ir kaip būtų, reikia nuosekliai išsiaiškinti, kuri iš minėtų hipotezių yra teisinga.

Kadangi europiniam KRKSv izoliuoti reikia specifinių sąlygų ir daug alveolarinių makrofagų, mes neatlikome lietuviškų padermių izoliatų funkcinių tyrimų. Unikalių nukleotidų ORF5 sekų virusams būtų labai įdomu atlikti kryžminę virusų neutralizacijos reakciją su kitomis europinio tipo KRKSv padermėmis ir nustatyti, kuris iš ORF7 baltymų reaguotų su diagnostikos tikslais naudojamais europinio ir amerikinio tipo monokloniniais antikūnais. Atsizvelgę į teoriškai numatomą antigenišką pagal nukleotidų sekas, mes išaiškinome, kad Lietuvoje paplitusių KRKSv padermių ORF5 baltymas labai skiriasi nuo šiuo metu turimų gyvų atenuotų vakcinų baltymų (3 pav.). Žinoma, kad ORF5 baltymo N galo dalis dalyvauja virusų neutralizacijos procesuose (Dea et al., 2000; Snijder, Meulenberg, 1998). Pastarųjų metų tyrimai rodo, kad ORF5 baltymo dalis šiame procese gali ir nedalyvauti. Šiuo metu nėra žinoma, ar pagal nukleotidų sekas numatomi vakcininių ir laukinių padermių baltymų skirtumai turi įtakos kryžminiam virusų neutralizavimui. Balasuriya ir kiti mokslininkai nustatė (1997), kad ORF5 baltymas yra pagrindinis taikynys specifiniams antikūnams prieš pelių LDV ir beždžionių EAV virusus, bet apie kiaulių imuninį atsaką į KRKSv ORF5 baltymą duomenų yra labai mažai arba jie prieštaringi. Įrodyta, kad ORF5 KRKSv baltymas yra pagrindinis priešvirusinių antikūnų taikynys (Dea et al., 2000; Rodriguez ir kt. 2001; Oleksiewicz et al., 2002). Būtina paminėti, kad nukleotidų sekų, koduojančių KRKSv baltymus, skirtumai tiesiogiai koreliuoja su kiaulių humoralinio imuninio atsako stiprumu (Oleksiewicz et al., 2000; Oleksiewicz et al., 2001). Todėl mūsų nustatyti antigeniškumo skirtumai pagal nukleotidų sekų analizę įdomūs ne tik moksliniu, bet ir praktiniu požiūriu. Lietuviškų padermių analizė parodė, kad ORF5 regione nukleotidų skirtumai labai dideli palyginti su šiuo metu turimų vakcininių padermių sekomis. Taigi galima manyti, kad gyvų atenuotų vakcinų efektyvumas Lietuvos kiaulių populiacijoje būtų labai menkas. 3 pav. grafiškai pavaizduoti visi vakcininių ir lietuviškų KRKSv padermių antigeniškumo skirtumai. Galutinei išvadai patikslinti būtini papildomi tyrimai, pavyzdžiui, ORF7 baltymą koduojančioje srityje. Reikėtų atlikti ir tiesioginius virusinių baltymų tyrimus. Lietuviškų KRKSv padermių RNR buvo ekstrahuota iš tokių kraujo serumo mėginių, kuriuose IFA metodu buvo nustatyti specifiniai KRKSv antikūnai (HerdChek PRRS ELISA, IDEXX Laboratories Inc., US). Vadinas, imunologinėms reakcijoms didžiuliai baltymus koduojančių nukleotidų sekų skirtumai nebuvo tokie dideli, kad specifinius

antikūnus nustatyti referentiniais metodais būtų neįmanoma. Be to, Lietuvos kiaulių populiacijoje pastebėti klinikiniai KRKS simptomai nesiskyrė nuo anksčiau aprašytų ligos požymių.

C.J. Nelsen ir kiti mokslininkai 1999 m. iškėlė hipotezę, kurioje europinio ir amerikinio KRKSv genotipų kilmė aiškinama skirtinga giminingų virusų evoliucija atskiruose kontinentuose. Labai tolimoje praeityje jie turėjo bendrą protėvį (prototipinį virusą). Staigus, beveik vienu metu paplitęs europinio ir amerikinio genotipo virusas ir pasireiškimas infekcija skirtinguose žemynuose – sunkiai paaiškinamas ir paslaptingas reiškinys. Mūsų gauti duomenys atskleidė dar įdomesnę KRKSv paplitimo versiją, kai europinio tipo genetiškai labai skirtingos viruso padermės staiga atsirado įvairiose Europos šalyse. Taip atsitiko su lietuviškomis (LT1-4), lenkiškomis (LK1-2), ispaniškoms, daniškoms ir olandiškoms padermėmis. Genetiškai labai skirtingų europinio tipo KRKSv padermių atsiradimo beveik tuo pačiu metu skirtinguose geografiniuose regionuose priežastys nežinomos. Manoma, kad tai galėtų būti pokyčiai ūkininkavimo sistemoje, pakeistos gamybos technologijos stambiuose kiaulininkystės ūkiuose ir panašūs veiksniai, nors šiai nuomonei argumentų nepakanka (Nelsen et al., 1999). Tik išsiaiškinus, kad europinio ir amerikinio tipo KRKSv atsirado iš prototipinio viruso, būtų galima nurodyti priežastis ir aplinkybes. Mūsų atlikti tyrimai parodė, kad Lietuvos padermių genetiniai tyrimai dėl labai unikalių rezultatų gali patikslinti ne tik filogenetinį moduliavimą, bet ir padėti geriau suprasti KRKSv kilmę.

Išvados.

1. Lietuvos kiaulių populiacijoje nustatytos keturios labiausiai šiuo metu Europoje skirtingos KRKSv padermės, kurių nukleotidų sekų tapatumas ORF5 geno srityje su kitais Europos KRKSv buvo tik 71,5–72,2%.

2. Lietuviškų padermių nukleotidų sekos aiškiai atitiko europinio genotipo KRKSv ORF5 ir ORF7 regionuose, tačiau filogenetiniame medyje jos išsidėstė daug arčiau amerikinio genotipo virusų, nei kitų europinio tipo padermių.

3. Lietuvos KRKSv padermių ilgis ORF7 srityje buvo 378 nukleotidai. Tai tarpinis ilgis tarp europinio (387 nukleotidai) ir amerikinio tipo (372 nukleotidai) KRKSv ORF7 regione. Lietuvos KRKSv padermių sekų tyrimo rezultatai patvirtina hipotezę, kad europinio ir amerikinio genotipo KRKSv kilę iš bendro protėvio.

4. Lietuvoje paplitusių KRKSv padermių ORF5 baltymų numatomas pagal nukleotidų sekas antigeniškumas buvo daug aukštesnis, nei šiuo metu turimų gyvų atenuotų vakcinų baltymų.

Literatūra

1. Andreyev V. G., Scherbakov A. G., Pylnov V. A., Gusev, A. A. Genetic heterogeneity of PRRSV in Russia. In Proceedings of the Third International Symposium on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS). 1999. P. 211-212.
2. Andreyev V. G., Wesley R. D., Mengeling W. L., Vorwald A. C., Lager K. M. Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. Archives of Virology. 1997. T. 142. P. 993-1001.

3. Becher P., Orlich M., Kosmidou A., Konig M., Baroth M. Thiel H.J. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*. 1999. T. 262. P. 64-71.
4. Botner A., Nielsen J., Oleksiewicz M.B., Storgaard T. Heterologous challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) vaccine virus: no evidence of reactivation of previous European-type PRRS virus infection. *Veterinary Microbiology* 1999. T. 68. P. 187-195.
5. Botner A., Strandbygaard B., Sorensen K. J., Have P., Madsen K. G., Madsen E. S., Alexandersen S. Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Veterinary Record*. 1997. T. 141. P. 497-499.
6. Cavanagh D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Archives of Virology*. 1997. T. 142. P. 629-633.
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. Dea S., Gagnon C. A., Mardassi H., Pirzadeh B., Rogan D. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Archives of Virology*. 2000. T. 145. P. 659-688.
9. Dewey C., Charbonneau G., Carman S., Hamel A., Nayar G., Friendship R., Eernisse K., Swenson S. Lelystad-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) identified in Canadian swine. *Canadian Veterinary Journal*. 2000. T. 41. P. 493-494.
10. Drew T. W., Lowings J. P., Yapp F. Variation in open reading frames 3, 4 and 7 among porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the UK. *Veterinary Microbiology*. 1997. T. 55. P. 209-221.
11. Felsenstein J. PHYLIP - Phylogeny inference package (Version 3.2). *Cladistics* 5. 1989. P. 164-166.
12. Forsberg R., Oleksiewicz M. B., Krabbe Petersen A. M., Hein J., Botner A., Storgaard T. A molecular clock dates the common ancestor of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus at more than 10 years before onset of the current epidemic. *Virology*. 2001. T. 289. P. 174-179.
13. Forsberg R., Storgaard T., Nielsen H. S., Oleksiewicz M. B., Cordioli P., Sala G., Hein J., Botner, A. The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of North American type but is geographically skewed within Europe. *Virology*. 2002. T. 290. P. 184-189.
14. Gagnon C. A. Dea S. Differentiation between porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates by restriction fragment length polymorphism of their ORF's 6 and 7 genes. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1998. T. 62. P. 110-116.
15. Hill H. Overview and history of mysterious swine disease (swine infertility respiratory syndrome). In: *Proc Mystery Swine Disease Committee Meeting*, Denver. Livestock Conservation Institute, Madison. 1990. P. 37-40.
16. Indik S., Valicek L., Klein D., Klanova J. Variations in the major envelope glycoprotein GP5 of Czech strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*. 2000. T. 81. P. 2497-2502.
17. Jameson B. A. Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Computer Applications in the Biosciences*. 1988. T. 4. P. 181-186.
18. 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.
19. Kapur V., Elam M. R., Pawlovich T. M., Murtaugh M. P. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the Midwestern United States. *Journal of General Virology*. 1996. T. 77. P. 1271-1276.
20. Keffaber K. K. Reproductive failure of unknown etiology. *American Association of Swine Practitioners Newsletter*. 1989. T. 1. P. 1-10.
21. LeGall A., Legeay O., Bourhy H., Arnauld C., Albina E., Jestin A. Molecular variation in the nucleoprotein gene (ORF7) of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Research*. 1998. T. 54. P. 9-21.
22. Lindhaus W. Lindhaus B. Ratselhafte Schweinekrankheit. *Practische Tierärztliche*. 1991. T. 5. S. 423-425.
23. Lole K. S., Bollinger R. C., Paranjape R. S., Gadkari D., Kulkarni S. S., Novak N. G., Ingersoll R., Sheppard H. W., Ray S. C. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C- infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *Journal of Virology*. 1999. T. 73. P. 152-160.
24. Madsen K. G., Hansen C. M., Madsen E. S., Strandbygaard B., Botner A., Sorensen K. J. Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds. *Archives of Virology*. 1998. T. 143. P. 1683-1700.
25. Mardassi H., Massie B., Dea S. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*. 1996. T. 221. P. 98-112.
26. Meng X. J. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Veterinary Microbiology*. 2000. T. 74. P. 309-329.
27. Meng X. J., Paul P. S., Halbur P. G. 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.
28. Meng X. J., Paul P. S., Halbur P. G., Lum M. A. Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Archives of Virology*. 1995. T. 140. P. 745-755.
29. Meulenbergh J. J. M., Petersen-den Besten A., De Kluyver E. P., Moormann R. J. M., Schaaper W. M. M., Wensvoort G. Characterization of proteins encoded by ORF's 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology*. 1995. T. 206. P. 155-163.
30. Meulenbergh J. M., Hulst M. M., de Meijer P., Moonen J. M., den Besten A., de Kluyver E. P., Wensvoort G., Moorman R. J. M. Lelystad virus, the causative agent of Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology*. 1993. T. 192. P. 62-74.
31. Morozov I., Meng X. J., Paul P. S. Sequence analysis of open reading frames (ORFs) 2 to 4 of a U.S. isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Archives of Virology*. 1995. T. 140. P. 1313-1319.
32. Murtaugh M. P., Elam M. R., Kakach L. T. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Archives of Virology*. 1995. T. 140. P. 1451-1460.
33. Nelsen C. J., Murtaugh M. P., Faaberg K. S. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: Divergent evolution on two continents. *Journal of Virology*. 1999. T. 73. P. 270-280.
34. Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*. 1997. T. 10. P. 1-6.
35. Nielsen H. S., Storgaard T., & Oleksiewicz M. B. Analysis of ORF 1 in European porcine reproductive and respiratory syndrome virus by long RT-PCR and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. *Veterinary Microbiology*. 2000. T. 76. P. 221-228.
36. Nielsen H. S., Oleksiewicz M. B., Forsberg R., Stadjek T., Botner A., Storgaard T. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *Journal of General Virology*. 2001. T. 82. P. 1263-1272.
37. Nielsen J., Botner A., Bille-Hansen V., Oleksiewicz M. B., Storgaard T. Experimental infection of late-term pregnant sows with a field isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine-derived virus. *Veterinary Microbiology*. 2002. T. 84. P. 1-13.
38. Oleksiewicz M. B., Botner A., Madsen K. G., 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.
39. Oleksiewicz M. B., Botner A., Toft P., Grubbe T., Nielsen J., Kamstrup S., Storgaard T. Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus deletion mutants: correlation with the porcine antibody response to a hypervariable site in the ORF3 structural glycoprotein. *Virology*. 2000. T. 267. P. 135-140.
40. Pirzadeh B., Gagnon C. A., Dea S. Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP(5) glycoprotein. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1998. T. 62. P. 170-177.

41. Rowland R. R., Steffen M., Ackerman T., Benfield D. A. The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. *Virology*. 1999. T. 259. P. 262-266.

42. Shibata I., Uruno K., Mori M. Serological property and replication in cell cultures of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1996. T. 58. P. 805-807.

43. Shimizu M., Yamada S., Murakami Y., Morozumi T., Kobayashi H., Mitani K., Ito N., Kubo M., Kimura K., Kobayashi M., Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from Heko-Heko disease of pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1994. T. 56. P. 389-391.

44. Snijder E. J. Meulenberg J. J. M. The molecular biology of arteriviruses. *Journal of General Virology*. 1998. T. 79. P. 961-979.

45. Stankevičienė M., Stankevičius A. Kiaulių reprodukcijos ir kvėpavimo sindromo viruso (KRSV) seroepizootiniai tyrimai Lietuvos kiaulininkystės ūkiuose. *Veterinarija ir zootechnika*. 2002. Priimta publikuoti.

46. Storgaard T., Oleksiewicz M. B., Botner A. Examination of the selective pressures on a live PRRS vaccine virus. *Archives of Virology*. 1999. T. 144. P. 2389-2401.

47. Strimmer K. von Haeseler A. Quartet puzzling: A quartet maximum likelihood method for reconstruction tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* 1996. T. 13. P. 964-969.

48. Suarez P., Zardoy R., Martin M. J., Prieto C., Dopazo J., Solana A., Castro J. M. Phylogenetic relationships of European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Research*. 1996. T. 42. P. 159-165.

49. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 1994. T. 22. P. 4673-4680.

50. Wu W. H., Fang Y., Farwell R., Steffen-Bien M., Rowland R. R., Christopher-Hennings J., Nelson E. A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology*. 2001. T. 287. P. 183-191.

2002 12 02