

19



Octrooiraad
Nederland

11 194940

12 C OCTROOI

21 Aanvraag om octrooi: 9401414

22 Ingediend: 31.08.1994

83 Aanvraag is gebaseerd op één of meer
micro-organismen

51 Int.Cl.⁷
A61K39/12, C12N7/00

30 Voorrang:
17.09.1993 ES 0009301973

43 Ter inzage gelegd:
18.04.1995 I.E. 1995/08

44 Openbaargemaakt:
01.04.2003 I.E. 2003/04

47 Dagtekening:
04.08.2003

45 Uitgegeven:
01.10.2003 I.E. 2003/10

73 Octrooihouder(s):
Cyanamid Iberica, S.A. te Madrid, Spanje (ES).

72 Uitvinder(s):
Juan Plana Duran te Vall de Bianya (ES)

74 Gemachtigde:
Ir. A. van Westenbrugge c.s. te 2517 KZ Den
Haag.

54 Virusstam en vaccin ter voorkoming van varkensreproductie- en -respiratiesyndroom.

Vaccin ter voorkoming van varkensreproductie- en -respiratiesyndroom

Gebied van de uitvinding

- De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een vaccin dat in staat is varkensreproductie- en
 5 -respiratiesyndroom te voorkomen. In het bijzonder heeft de uitvinding betrekking op een geïnactiveerd vaccin dat het causatieve virus van de ziekte in geïnactiveerde vorm bevat.

Geschiedenis van de uitvinding

- De ziekte die bekend staat als varkensreproductie- en -respiratiesyndroom (PRRS) heeft een uitwerking op
 10 zwangere zeugen waarbij anorexia, abortussen, geboorte van dode biggen, gemummificeerde foetussen, zwakke biggen die een aantal uur of dagen na geboorte sterven, respiratieproblemen na de bevalling en voortplantingsproblemen, kunnen worden veroorzaakt (Loula, T., "Clinical Presentation of Mystery Pig Disease in the breeding herd and suckling piglets", Proceedings of the Mystery Swine Disease Committee Meeting, 6 oktober 1990, Denver, Colorado, Livestock Conservation Institute, Madison, WI, USA). Er is een
 15 aantal gevallen beschreven waarbij geïnfecteerde zeugen blauwe stippen op oren vertoonden zodat de ziekte eveneens bekend staat als blauwe abortus of blauworige varkensziekte (Veterinary Record, Vol. 130, no. 3, 18 januari 1992). Andere namen die aan de ziekte zijn gegeven zijn "Mystery Pig Disease" (MPD), Mystery Swine Disease" (MSD), "Mysterious Reproductive Syndrome" (MRS), "Swine Infertility and Respiratory Syndrome" (SIARS) of "Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome" (PEARS).
- 20 De eerste epizootie-uitbarstingen van deze ziekte verschenen in de Verenigde Staten en Canada in 1987. In Europa werd de eerste uitbarsting in 1990 in Duitsland gedetecteerd van waaruit het zich aan het eind van 1990 en in het begin van 1991 verspreidde naar Nederland en België. In Spanje werden de eerste gevallen van de ziekte midden januari 1991 gedetecteerd toen belangrijke respiratieveranderingen werden waargenomen in een lading van 300 biggen die vanuit Duitsland waren geïmporteerd (Plana et al., Med.
 25 Vet., Vol. 8, no. 11, 1991). Kort daarna werd een ziekte in twee voortplantingskudden, die zich op een afstand van 500 m van de kudde waarbij zich het oorspronkelijke probleem had voorgedaan waren gelegen gedetecteerd, welke ziekte werd gekenmerkt door een abnormaal hoog abortusaantal tijdens de laatste fase van de zwangerschap alsmede 70% sterfte bij biggen. Na analyse van de waargenomen klinische verschijnselen en met het oog op het feit dat
- 30 i) deze kudden aan een intensief vaccinatieprogramma tegen varkensparvovirus, ziekte van Aujeszky en zwijninfluenza waren onderworpen en dat
 ii) laboratoriumtesten de aanwezigheid van andere abortus veroorzakende ziekten uitsloten bleef de verdenking rusten op klinische aanwezigheid van PRRS. In monsters van deze boerderijen werd het causatieve middel van de ziekte geïsoleerd zoals verder in detail hieronder wordt beschreven.
- 35 Een aantal virussen is gecorreleerd met dit infectieuze proces onder andere encefalomyocarditis-virus, zwijninfluenza, klassieke zwijnkoorts, Afrikaanse zwijnkoorts, mucosale ziekte, ziekte van Aujeszky, brucellose, leptospirose, Q-koorts, parvovirose en chlamydiale ziekte, hoewel sommige auteurs dit in verband hebben gebracht met mycotoxinen (Loula, T., "Clinical Presentation of Mystery Pig Disease in the breeding herd and suckling piglets", Proceedings of the Mystery Swine Disease Committee Meeting, supra,
 40 Mengeling, W.L. en Lager, K.M., "Mystery Pig Disease: Evidence and considerations for its etiology", in Proceedings of the Mystery Swine Disease Committee Meeting, supra; Dea et al., "Virus isolation from farms in Quebec experiencing severe outbreaks of respiratory and reproductive problems", Proceedings of the Mystery Swine Disease Committee Meeting, supra; Van Alstine, W., "Past diagnostic approaches and findings and potential useful diagnostic strategies", in proceedings of the Mystery Swine Disease Committee
 45 Meeting, supra; Loula, T. Agri-Practice, 12(1). 23-33, 1991; Woolen, N. et al., J.Am. Vet. Assoc. 197:600-601, 1990).
- Vet. Microbiol. (1992) 33:203 beschrijft de isolatie in Spanje van een stam die PRRS veroorzaakt. Het Spaanse isolaat vertoont immunologische gelijkenis met het Lelystadvirus (LV). Er wordt geen verdere karakterisering van het virus gegeven.
- 50 Animal Pharm. (1991) 238:20 beschrijft ook de isolatie in Spanje van een virus dat verantwoordelijk is voor PRRS, zonder details te geven van de isolatiewijze of het isolaat.
- In de PCT-octrooiaanvraag die onder publicatienummer WO92/21375 op naam van Stichting Centraal Diergeneeskundig Instituut (CDI) is gepubliceerd wordt de isolatie van een virus, genaamd "Lelystad Agent" (LA) of "Lelystad Virus" (LV) beschreven dat door hen als het causatieve virus van de ziekte die toen als
 55 MSD werd aangeduid is geïdentificeerd. Het geïsoleerde LV veroorzaakt bij intranasale inoculatie bij zwangere zeugen een verlies aan eetlust en zelfs een weigering tot ingestie gedurende 4 tot 10-12 dagen na inoculatie, reproductieafwijkingen en blauwkleuring van de oren van sommige geïnfecteerde zeugen

9–10 dagen na inoculatie. Het is echter eveneens waargenomen dat bij 2 van de 8 experimenteel geïnfec-
teerde zeugen geen reproductie van de ziekte ontstaat (zie tabel 6 van de PCT-octrooiaanvraag) gezien het
feit dat in één van de zeugen het aantal biggetjes dat levend werd geboren en de eerste week overleefde
groot was (6 van de 9, zeug 1305) en een andere zeug twee doodgeboren biggetjes kreeg terwijl de overige
5 9 de eerste week overleefden (zeug 1065). Het door CDI geïsoleerde virus behoort tot de genus Arteriviri-
dae met een genoom van ten minste één gepolyadenyleerd RNA-molecuul met een lengte van 14,5 tot 15,5
kb (zoals is bepaald in een neutrale agarosegel), dat zich repliceert door middel van een groep subgenome
RNA's aan het 3'-uiteinde. De hierboven geciteerde PCT-octrooiaanvraag toont de nucleotidesequentie van
het LV-genoom met de 8 mogelijke open leesramen (opwn reading frames = ORF's), de aminozuur-
10 sequentie die van de geïdentificeerde ORF's is afgeleid en de mogelijke N-glycosyleringsplaatsen.

Daarna zijn andere PRRS veroorzakende virussen in Duitse, Franse en Spaanse boerderijen geïsoleerd.
Het in Tubingen, Duitsland geïsoleerde virus (TV) [(Virology, 193, 329–339 (1993))] vertoont van ORF's 2 tot
7 99,3% homologie met LV op nucleotide-niveau (waarbij er 24 baseparen (bp) uit een totaal van 3316
baseparen in dat gebied verschillen). De afgeleide TV-aminozuursequentie vertoont 99,2% homologie met
15 LV (waarin slechts 10 aminozuren in de afgeleide aminozuursequenties die door ORF's 2 tot 5 worden
gecodeerd verschillen, terwijl er geen verschillen zijn in de sequenties die van ORF's 6 en 7 zijn afgeleid).

Aan de andere kant is de homologie die gevonden is tussen LV en TV in vergelijking met het bij ons
laboratorium geïsoleerde virus (Spaanse stam of SV) kleiner. Tot nu zijn slechts de nucleotideen aminozuur-
sequenties die overeenkomen met ORF's 3 tot 7 vergeleken waarbij de volgende resultaten zijn verkregen:

- 20 1. Er bestaat 95,5% homologie van SV in vergelijking met LV of TV op nucleotide-niveau (met 144
verschillen op een totaal van 2599bp); en
2. er bestaat 94,9% homologie van SV t.o.v. LV of TV op aminozuurniveau (uit een totaal van 955
aminozuren wordt een totaal van 47 aminozuren gevonden die verschillen).

Deze aminozuurvariëaties kunnen zijn gekoppeld aan de hogere pathogeniciteit van een stam in
25 vergelijking met een andere stam, waardoor het in onze laboratoria geïsoleerde virus (Spaanse stam) meer
pathogeen is dan andere bekende PRRS-virussen. Van het in Frankrijk geïsoleerde virus bijvoorbeeld
(Franse stam) kan worden gezien, zoals in voorbeeld 8 van de onderhavige beschrijving wordt getoond, dat
het percentage biggen die worden geboren uit een zeug die met de Franse stam is geïnficeerd 75%
bedraagt terwijl het percentage 9,5% bedraagt wanneer zeugen met de Spaanse stam (tabellen 12 en 14)
30 zijn geïnficeerd. Bij infectie met LV bedraagt het percentage 61% wanneer de zeugen daarmee zijn
besmet (tabel 6 van PCT-octrooiaanvraag WO 92/21375) aangezien 58 biggen uit een totaal van 95 biggen
levend werden geboren.

De ziekte veroorzaakt ernstige verliezen in de varkensindustrie omdat het bij acute uitbarsting een
biggensterfte van 70% in een worp kan veroorzaken. Een middel om het hierdoor gecreëerde probleem op te
35 lossen zou liggen in het uitvoeren van een geschikt vaccinatieprogramma dat het voorkomen van de ziekte
mogelijk zou maken. Hiertoe zouden vaccins die effectieve voorkoming van PRRS kunnen bewerkstelligen
vereist zijn.

WO 93/14196 beschrijft een proces voor de industriële productie van een myxovirus type virus, virus A
genoemd, en van een togavirus, virus B genoemd. Beide virussen veroorzaken PRRS.

40 De octrooiaanvraag die onder WO 93/06211 in naam van Collins, J. E., en Benfield, D.A., is gepubliceerd
heeft betrekking op een vaccin tegen MSD dat een infectief middel bevat dat uit longen van met MSD
geïnficeerde varkens is geïsoleerd. De genoemde PCT-octrooiaanvraag beschrijft echter geen karakterisa-
tie of identificatie van het infectieve middel, evenmin als een depot daarvan bij enig geautoriseerd depot-
instituut. Hierdoor is de realisatie van de kennis die van de PCT-octrooiaanvraag kan worden afgeleid zeer
45 moeilijk omdat het product dat beschreven is in de PCT-octrooiaanvraag niet kan worden geverifieerd en de
verkregen resultaten evenmin kunnen worden vergeleken met de resultaten van de aanvragers van de
PCT-octrooiaanvraag. Evenmin worden in de genoemde octrooiaanvraag het antigeen noch het adjuvans
dat bij de formulering van het vaccin is gebruikt duidelijk beschreven, terwijl dit zoals hierna zal worden
uiteengezet een zeer belangrijke rol speelt. Evenmin worden voorbeelden beschreven die de kracht en
50 werkzaamheid van de vaccins beschrijven.

De PCT-octrooiaanvraag die onder WO 93/07898 is gepubliceerd heeft betrekking op o.a. de identificatie
van de veroorzaker virus van PRRS en op vaccins die daarvan zijn afgeleid. Het geïsoleerde virus heeft
kenmerken die vergelijkbaar zijn met LV maar verschillen van het virus dat in ons laboratorium is geïso-
leerd, dat niet in staat is op detecteerbare niveaus op ST(zwijn-testis-)cellen te groeien. Klaarblijkelijk is het
55 vaccin werkzaam geweest maar is bescherming slechts bij ongeveer 52% van de gevaccineerde dieren
bereikt, hetgeen als een betrekkelijk lage mate van bescherming kan worden beschouwd, in het bij zonder
gezien de hoge virustiter die bij de vaccindosering werd toegepast. Daarnaast verschaft de PCT-

octrooiaanvraag geen informatie over de organisatie van het virusgenoom of de -eiwitten waarvoor wordt gecodeerd, waardoor vergelijking tussen dit virus en het virus dat in onze laboratoria is verkregen niet, of slechts met een te grote mate van onderzoek, kan worden uitgevoerd.

- Derhalve blijft er een behoefte bestaan aan vaccins die in staat zijn PRRS te voorkomen. Teneinde dit probleem op te lossen verschaft de onderhavige uitvinding een vaccin dat in staat is op effectieve wijze zeugen tegen de infectieziekte te beschermen. De antigene fase van dit vaccin omvat een geïnactiveerd Spaans isolaat. De uitvinding verschaft eveneens combinaties van het geïsoleerde PRRS virale antigeen (Spaanse stam) samen met verschillende varkenspathogenen met het doel bi- of multivalente vaccins te verschaffen.

10

KORTE BESCHRIJVING VAN DE FIGUREN

Figuren 1 tot 5 tonen de cDNA-sequenties die overeenkomen met respectievelijk ORFs 3 tot 7 van het PRRS-virus (Spaanse stam) alsmede de sequentie die van aminozuren die door elk ORF worden gecodeerd is afgeleid.

- Figuren 6 tot 10 tonen de homologie en de bestaande verschillen tussen LV en het op onze laboratoria geïsoleerde virus op het niveau van aminozuursequenties die van ORFs 3 tot 7 zijn afgeleid. De aminozuren worden uitgedrukt in overeenstemming met de één-lettercode. De bovenste regel van elke twee regels komt overeen met de LV-aminozuursequentie terwijl de onderste regel overeenkomt met het bij onze laboratoria geïsoleerde virus (Spaanse stam). De homologe aminozuren worden aangegeven met twee verticale lijnen terwijl substitutie van aminozuren door andere aminozuren wordt aangegeven door twee verticale stippen bij conservatieve substituties, dat wil zeggen wanneer de substitutie van een aminozuur met een ander aminozuur dat functioneel equivalent is plaatsvindt. De afwezigheid van verticale lijnen en stippen tussen twee aminozuren geeft niet-conservatieve substituties aan.

25 Gedetailleerde beschrijving van de uitvinding

1. Monsters

1.1. Voor de isolatie van het virus gekozen dieren

Gummificeerde foetussen, doodgeboren biggen en levende maar zwakke biggen met een leeftijd van 1 tot 10 dagen, en nageslacht van veldzeugen met klinische problemen vanwege PRRS werden gekozen.

30 1.2. Bereiding van de monsters

Long-, milt-, lever-, nier-, hersen- en hartmonsters van de biggen werden door middel van necropsie verkregen. In één bepaald geval werden monsters bereid van de long van een doodgeboren big die door een van infectie met PRRS verdachte zeug was geworpen. Met die long werd een Salisbury (Verenigd Koninkrijk) met toegangsnummer V93070108 gedeponeerd.

35 3.2. Virale groei bij andere celsystemen

- Infecties met het geïsoleerde virus (Spaanse stam) zijn uitgevoerd in co-kweken van alveolaire macrofagen van een varkenslong en ST-cel (Swine Testis continuous cell line ATCC CRL 1745 ST) als een eerste stap voor het aanpassen van het virus voor ST-cellen. Na een aantal doorgangen in serie (5-6) bij de ST-cel- en macrofaag co-kweken en bij kweken van ST afzonderlijk bedroegen de virusinfectietiters in de orde van 10^6 TCID₅₀/ml wanneer macrofaag-ST-cel-co-kweken werden geïnfecteerd en in de orde van $10^{4,5}$ TCID₅₀/ml voor het virus dat in ST-cellen afzonderlijk werd verkregen [TCID₅₀, weefselweekinfectiedosering 50%].

- Daarnaast kunnen alveolaire macrofagen van een varkenslong eveneens onsterfelijk worden gemaakt door fusie daarvan met ST-cellen door middel van hybridisatie. Anderzijds kunnen alveolaire macrofagen van een varkenslong onsterfelijk worden gemaakt door fusie daarvan met L-14-cel lijn-B-cellen van perifeer varkensbloed (ECACC No. 91012317), of met cellijn Jag-1 (varkenstrofoblastcellijn) verstrekt door Dr. Jag Ramsoondar Ramsoondar et al., Biol. Reprod. 49; 681-694, 1993.

- De fusievoorschriften omvatten gebruikelijke technieken op dit gebied. Anderzijds kunnen virussen op ST-cellen of op andere varkenscellijnen worden gekweekt, waarin de genen die voor membraanreceptoren van alveolaire macrofagen van de varkenslong voor het PRRS virus coderen zijn opgenomen.

- De virussen die met deze celsystemen worden geproduceerd kunnen worden gebruikt bij de formulering van zowel levende als geïnactiveerde vaccins.

4. Identificatie en karakterisatie van het virus

55 4.1. Benoeming en depot van het virus

Het uit de long van een doodgeboren big geïsoleerde virus dat aangeduid is als PRRS-CY-218-JPD-P5-6-91 werd bij de European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Salisbury (Verenigd Koninkrijk) op

29 juni 1993 gedeponeerd onder toegangsnummer V93070108. In de onderhavige beschrijving wordt af en toe het virus zonder deze aanduiding beschreven als Spaans virus (SV) of Spaanse stam.

4.2. Kenmerken van het geïsoleerde virus

Dit virus (PRRS-CY-218-JPD-P5-6-91) vertoont de volgende kenmerken:

- 5 a) de productie van een gering CPE op een continue ST-cel lijn (ATCC CRL 1746 ST) (foetaal zwijntestis) met een gemiddelde titer van $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml en op alveolaire macrofagen van een varkenslong met gemiddelde titers van $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml;
- b) bij infectie van alveolaire macrofagen van een varkenslong en STC in co-kweek daarmee worden gemiddelde titers van $10^{6.3}$ TCID₅₀/ml verkregen [welke titers een logaritme-eenheid voorstellen ($1 \log_{10}$) hoger dan wanneer slechts alveolaire macrofagen van een varkenslong afzonderlijk werden geïnfecteerd];
- 10 c) cytoplasmareplicatie;
- d) productie van cytoplasmavacuolering;
- e) lipidemantel;
- f) grootte van 40–50 nm;
- 15 g) geen haemadsorptie of haemagglutinatatie werd waargenomen met cellen van de kip, marmot, varken of rode bloedcellen van humane groep O;
- h) verlies van infectiviteit bij zure pH ($\text{pH} \leq 5$);
- i) productie van microscopische (interstitiele pneumonie) en macroscopische lesies bij biggen met een leeftijd van 2 maanden;
- 20 j) productie van negatieve reproductie-effecten bij zwangere zeugen met doodgeboorte, gemummificeerde foetussen en levende maar zwakke biggen;
- k) kruisreactie met een Lelystad-referentieserum (IPMA = Immunoperoxidasemonolaagtest);
- l) kruisreactie met sera van dieren met klinische veldinfecties (IPMA), m) serum van met dit virus geïnfecteerde zeugen vertoont kruisreactie met LV;
- 25 n) polygeadenyleerd RNA-genoom met een lengte van ongeveer 15 000 bp (neutrale agarosegel);
- o) replicatie door middel van een subgenome RNA-groep die aan het 3'-uiteinde aanwezig is;
- p) nucleotidesequentie met 8 ORFs;
- q) in een gezuiverde suspensie die aan elektroforese in polyacrylamidegel wordt onderworpen en na overdracht door immunoblot door middel van een specifiek serum dat in zeugen van ons eigen laboratorium
- 30 is bereid en kruisreacties vertoont met het Lelystad-PRRS-virus werden 4 grote banden gedetecteerd die overeenkomen met eiwit met molecuulgewichten van 15 000, 23 000, 54 000 en 66 000 Daltons die niet in negatieve controles (niet geïnfecteerde macrofagen) werden gedetecteerd;
- r) wanneer ORFs 3 tot 7 van dit virus worden vergeleken met die van LV en/of TV wordt 95,5% homologie waargenomen op nucleotideniveau (waarbij 114 bp verschillen op een totaal van 2599 bp) en 94,9%
- 35 homologie op aminozuurniveau (51 aminozuren verschillen op een totaal van 955); en
- s) het virus behoort tot de genus Arterivirus.

4.3. Technieken die zijn gebruikt voor virusidentificatie

4.3.1. Experimentele reproductie van de ziekte bij zwangere zeugen

- 40 German Landrace x Large White Cross zeugen werden gebruikt die afstammen van boerderijen met systematische serologische controle tegen ziekte van Aujeszky, mond-en-klauwziekte, varkensparvovirus, klassieke zwijnkoorts, zwijninfluenza (types H1N1 en H3N2) en overdraagbare gastro-enteritis. Daarnaast werd een antilichaamtiteratietest uitgevoerd tegen het causatieve virus van PRRS. Tussen dagen 77 en 90 van de zwangerschap werden de dieren met een isolaat dat op alveolaire macrofagen van een varkenslong
- 45 werd verkregen in het ene geval intraveneus en intranasaal geïnfecteerd (IN) terwijl in een ander geval slechts infectie via de intranasale route plaatsvond (voorbeeld 2.1). Gedurende het gehele experiment werd opname van voedsel, rectale temperatuur en de klinische toestand van de dieren waargenomen. Met het doel de bovengenoemde virussen uit te sluiten werden bloedmonsters van alle zeugen vóór infectie genomen. Deze bleken seronegatief voor alle virussen te zijn. Eveneens bleken na experimentele infectie
- 50 de zeugen alle nog steeds seronegatief voor de genoemde virussen te zijn, alsmede seropositief voor PRRS (zoals geverifieerd werd met de referentie LV). De verkregen resultaten worden in tabel 1 getoond.

TABEL 1 Uitgevoerde testen

	INFE. middel	HAI (1)	HAI (2)	NPLA (3)	ELISA (4)	SN (5)	SN (6)	IPMA (7)
5	AD	ND	ND	ND	—	ND	ND	ND
	FMD	ND	ND	ND	ND	—	ND	ND
	PP	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	CSF	ND	ND	—	ND	ND	ND	ND
10	SF	ND	—	ND	ND	ND	ND	ND
	TG	ND	ND	ND	ND	ND	—	ND
	PPRS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+

Legenda

- 15 AD = ziekte van Aujeszky
 FMD = mond-en-klauwzeer
 PP = varkensparvovirosis
 CSF = klassieke zwijenkoorts
 SF = zwijninfluenza (H1N1, H2N3)
- 20 TG = overdraagbare gastro-enteritis
 PPRS = varkensreproductie- en -respiratiesyndroom
 HAI = haemagglutinatatie aan peroxidase gekoppelde test
 NPLA = neutraliserende aan peroxidase gekoppelde test
 ELISA = aan enzym gekoppelde immunosorptietest
- 25 SN = seroneutralisatie
 IPMA = immunoperoxidasemonolaagtest
 (1) = Vannier et al., Rec. Méd. Vet. 155 (2), 151–158 (1979)
 (2) = Charley B., Thesis Doctoral, Alfort (1976)
 (3) = Trepsta et al., Vet. Microb. 9, 113–120 (1984)
- 30 (4) = Elliot M., J. Rech. Porc., 20, 141–146.
 (5) = Lucam F., "Diagnostic sero-immunologique des viroses humains animaux", F. Bricout; L. Joubert; J.M. Huraux (1977)
 (6) = Jiménez et al., J. Virol., 60, 131–139 (1986)
 (7) = Wensvoort et al., Vet. QUARTERLY, Vol. 13, No. 3 (juli 1991)
- 35 (–) = negatief
 (+) = positief
 ND = niet uitgevoerd.

40 4.3.2. Experimentele reproductie van de ziekte bij biggen

Het doel van dit experiment was om te bevestigen of het causatieve virus van reproductiewijzigingen in zeugen in staat was bij biggen van 2 maanden oud respiratiesymptomen en macroscopische en microscopische lesies op longniveau te veroorzaken. Hiertoe werd een aantal biggen via de IN-route met het virus geïnfecteerd (Spaanse stam) welke biggen vervolgens op verschillende dagen na infectie (voorbeeld 2.2.)

45 werden gedood.

De meest relevante gegevens die hieruit resulteren tonen aan dat dit virus op macroscopisch niveau meervoudige consolidatiefoci alsmede op microscopisch niveau interstitiële pneumonie veroorzaakte (tabel 4). Wat de gezondheid betreft konden geen relevante klinische tekenen worden waargenomen.

4.3.3. Chloroformgevoeligheidstest

- 50 Deze test werd uitgevoerd om te bepalen of het geïsoleerde virus een lipide-mantel had. Hiertoe werd de werkwijze van Feldman, H. en Wang, S., gebruikt zoals deze beschreven is in "A manual of basic virological techniques", Prentice-Hall Inc., New Jersey, 146–148 (1978). De verkregen resultaten tonen aan dat het niet behandelde virus een titer van 105,6 TCID₅₀/ml heeft terwijl na behandeling met chloroform de titer lager is dan 10^{1.3} TCID₅₀/ml op basis waarvan gesteld kan worden dat het geïsoleerde virus een lipide-
- 55 mantel heeft.

4.3.4. Het sequencen van het virale genoom

Vijf fasen werden uitgevoerd:

- i) zuivering van het virus
- ii) zuivering van het virale RNA
- iii) cDNA-synthese
- iv) klonering en karakterisering van de cDNA-klonen
- 5 v) het sequencen en vergelijken van de sequenties met die van LV
- i) zuivering van het virus

Virus dat op alveolaire macrofagen van een varkenslong was gerepliceerd werd gezuiverd en door filtratie geconcentreerd onder toepassing van MILLIPORE-filters. Daarna werd het virus aan centrifugatie in 10 tot 50% metrizamidegradiënt (SIGMA) onderworpen. Na voltooiing van centrifugatie werd een band

10 verkregen die door centrifugatie werd geconcentreerd. Met het gezuiverde virus werd een elektroforese op polyacrylamidegel uitgevoerd en werd een immunoblot ontwikkeld met een specifiek serum dat eiwitten vertoonde waarvan de bijkbare molecuulgewichten 15, 23, 54 en 66 K Daltons bedroegen.

ii) Zuivering van het virale RNA

Een techniek voor selectie en zuivering van het RNA werd toegepast op basis van het feit dat het RNA

15 een poly(A)sequentie aan het 3'-uiteinde bevat. Hiertoe werd een in de handel verkrijgbare kit (Pharmacia) toegepast die exclusieve binding van de RNA-poly(A)keten aan een cellulose-oligo(dT)-matrix alsmede de elutie daarna mogelijk maakte.

iii) cDNA-synthese Een in de handel verkrijgbare kit werd toegepast (Boehringer Mannheim), waarbij de voorschriften van de producent werden gevolgd. In het kort werd het virale genome RNA bij aanwezigheid

20 van een oligo(dT), dATP, dCTP, dGTP, dTTP en omgekeerde transcriptase geïncubeerd.

iv) Klonering en karakterisering van de cDNA-klonen Het cDNA werd gekloneerd in een van pUC18 afgeleide vector en een reeks klonen werd verkregen die de volledige nucleotidesequentie die met ORFs 3 tot 7 overeenkomt bevatte.

v) Het sequencen en vergelijken van de sequenties met die van LV

25 v.a.) Het sequencen

Het gebied dat overeenkomt met ORFs 3-7 van het virus dat bij onze laboratoria werd geïsoleerd is volledig gesequenced. Figuren 1 tot 5 tonen de sequenties van verkregen cDNA alsmede de sequenties die van aminozuren die door elk ORF worden gecodeerd zijn afgeleid. De totale lengte van het gebied waarvan de sequentie is bepaald bedraagt ongeveer 2599 nucleotiden (nt). Zoals gezien kan worden heeft ORF 3

30 een lengte van ongeveer 789 nt en codeert het voor een eiwit van 266 aminozuurgroepen. ORF 4 heeft een lengte van ongeveer 552 nt en codeert voor een eiwit van 183 aminozuurgroepen. De aanvang van dit ORF 4 bevindt zich in het ATG-codon dat zich ongeveer 540 bp van het initiële ORF-3-ATG-codon bevindt. ORF 3 en ORF 4 delen een sequentie van ongeveer 246 nt. ORF 5 heeft een lengte van ongeveer 606 nt en codeert voor een eiwit van 200 aminozuurgroepen. Het initiële codon van deze ORF 5 overlapt praktisch het

35 eindcodon van ORF 4 (zij delen de TG nucleotiden, het ATG-codon aan het begin van ORF 5 en het ORF 4 tGA-eindcodon). Het initiële ATG-codon van ORF 5 bevindt zich ongeveer 1092 nt van het initiële ATG-codon van ORF 3. ORF 6 heeft een lengte van ongeveer 522 nt en codeert voor een eiwit van 173 aminozuurgroepen. Dit initiële ATG-codon van ORF 6 bevindt zich 8 nt stroomafwaarts van het begin van het terminatie-TAG-codon van ORF 5 (op ongeveer 1682 nt van het initiële ATG-codon van ORF 3). ORF 7

40 heeft een lengte van ongeveer 387 nt en codeert voor een eiwit van 129 aminozuurgroepen. Dit initiële ATG-codon van ORF 7 bevindt zich 5 nt stroomafwaarts van het begin van het terminatie-TAA-codon van ORF 6 (op ongeveer 2193 nt van het initiële ATG-codon van ORF 3). De eiwitten die door ORFs 3 tot 6 worden gecodeerd zijn membraaneiwwitten, terwijl het eiwit dat door ORF 7 wordt gecodeerd een nucleocapside-eiwit is.

45 v.b.) Vergelijking met LV

Bij vergelijking van de cDNA-sequenties van ORFs 3-7 van LV met die van het virus dat in onze laboratoria is geïsoleerd kan worden waargenomen dat:

- i) op nucleotide-niveau 114 van de 2599 nucleotiden verschillen vertonen, hetgeen overeenkomt met ongeveer 95,5% homologie,
- 50 ii) op aminozuurniveau 47 aminozuren van de 955 aminozuren die zijn vergeleken verschillen, hetgeen ongeveer 94,9% homologie voorstelt,
- iii) van de 47 aminozuren die verschillen worden 35 beschouwd als niet-conservatieve substituties waarvan 12 zich in het product van het ORF 3-gen bevinden (figuur 6); 9 zich in het product van het ORF 4-gen bevinden (figuur 7); 10 zich in het product van het ORF 5-gen (figuur 8) bevinden, hoewel opgemerkt moet
- 55 worden dat het product van het LV-ORF 5-gen 1 aminozuur meer bevat dan het product van het Spaanse virus-ORF 5, specifiek ontbreekt aminozuur 35 (Asn) van het LV-ORF 5-product in het product dat door het Spaanse virus tot expressie wordt gebracht; 4 zich in het product van het ORF 6-gen bevinden (figuur 9);

terwijl het product van het ORF 7-gen geen enkele niet-conservatieve substitutie bevat (figuur 10), iv) gedeeltelijke homologie van elk product dat door de verschillende ORFs van het Spaanse virus en LV tot expressie wordt gebracht bedraagt 93,6% voor de producten van ORF 3 en ORF 5, 94,0% voor het product van ORF 4, 96,6% voor het product van ORF 6 en 99,2% voor het product van ORF 7.

- 5 Zoals hierboven is aangegeven kunnen de veranderingen in de aminozuren samenhangen met de hogere pathogeniciteit van de ene stam in vergelijking met de andere, aangezien het virus dat in onze laboratoria (Spaanse stam) meer pathogeen is dan andere bekende PRRS-virussen, zoals bijvoorbeeld het virus dat in Frankrijk is geïsoleerd (voorbeeld 8) en LV (tabel 6 van PCT-octrooiaanvraag WO 92/21375).

10 5. Vaccins

De uitvinding verschaft een vaccin dat varkensreproductie- en -respiratiesyndroom (PRRS) kan voorkomen. Het vaccin is werkzaam gebleken bij het voorkomen van reproductiewijzigingen bij zeugen zoals doodgebo-
ren biggen, gemummificeerde biggen of levende doch zwakke biggen, "return to service" (herhaling van oestrus) en soortgelijke problemen die door het causatieve virus van PRRS worden veroorzaakt. Op

- 15 soortgelijke wijze is bevestigd dat het vaccin cellulaire immuniteit bij gevaccineerde dieren induceert.

Het vaccin bevat een geschikte hoeveelheid geïnactiveerd Spaanse stam PRRS viraal antigeen, alsmede een adjuvans en een conserveermiddel. Testen die met deze vaccins zijn uitgevoerd hebben de werkzaam-
heid van het vaccin, zoals door voorbeelden 7 en 8, wordt getoond. Daarnaast is aangetoond dat, het vaccin werkzaam is bij het voorkomen van "return to service", (herhaling van oestrus) wat voorkomt bij

- 20 geïnfecteerde zeugen. Inderdaad konden de zeugen die met de vaccins resulterend uit de onderhavige uitvinding waren gevaccineerd en met het causatieve virus van PRRS waren geïnfecteerd paren en werden zij bij de eerste post-partum ovulatie en het zogen van de biggen zwanger.

5.1. Bestanddelen

25 5.1.a) Antigene fase

Als werkzaam bestanddeel bevat het vaccin geïnactiveerd Spaanse stam PRRS viraal antigeen bij een concentratie hoger of gelijk aan $10^{5.5}$ TCID₅₀ per vaccindosis. De inactivering kan geschieden door middel van chemische middelen die behandeling met β -propiolacton of andere conventionele inactiveringsmiddelen zoals ethyleenimine of formaldehyde, omvatten of door fysische middelen.

30 5.1.b) Adjuvantia

Hoewel het mogelijk is adjuvantia van het aluminiumhydroxidetype, Quil A of mengsels daarvan alsmede olieachtige adjuvantia voor het formuleren van het vaccin te gebruiken is bevestiging mogelijk geweest van het feit dat de beste resultaten worden verkregen bij toepassing van een olieachtig adjuvans (voorbeeld 4). In het bijzonder is bevestigd dat een olieachtig adjuvans dat gevormd wordt door een mengsel van Marcol
35 52, Simulson 5100 en Montanide 888 zeer goede resultaten verschaft. Marcol 52 is een anorganische olie met een lage dichtheid die door ESSO ESPAÑOLA, S.A. wordt geproduceerd; Simulsol 5100 is een polyethoxyoleaatether die door SEPIC in de handel wordt gebracht en Montanide 888 is een watervrije mannitoletheroctadecanoaat met hoge zuiverheid die door SEPIC in de handel wordt gebracht.

Bevestiging van het feit dat het adjuvans een essentiële rol speelt bij de werkzaamheid van het vaccin is

- 40 mogelijk geweest. Aldus is een uitdagingstest (voorbeeld 6) onder toepassing van zeugen die met twee verschillende vaccins zijn gevaccineerd waarbij één zeug met het olieachtige adjuvans dat boven is aangegeven (ref. 1) en de andere zeug onder toepassing van het adjuvans Munokynin® (ref. 2) is gevaccineerd uitgevoerd. Hoewel beide vaccins seroconversie produceren werd bij een experimentele infectietest aangetoond dat de zeugen die met vaccin ref. 1 werden gevaccineerd beschermd waren tegen
45 experimentele infectie met PRRS-virus terwijl de andere zeugen die waren gevaccineerd met vaccin ref. 2 niet beschermd waren, niettegenstaande het feit dat ten tijde van de uitdaging zij antilichamen tegen het virus bezaten. Dit geeft aan dat een geschikt adjuvans een zeer belangrijke rol kan spelen in samenhang met de modulatie en stimulatie van immuunrespons met name op het niveau van cellulaire immuniteit. Daarnaast is dit aspect bevestigd door middel van de uitdagingstest die is uitgevoerd onder toepassing van
50 de Spaanse stam van het PRRS-virus, aangezien de zeugen die met ref. 1 vaccin waren gevaccineerd en opnieuw waren gevaccineerd geen serologische respons ten tijde van infectie toonden maar, niettegenstaande, beschermd waren (voorbeeld 7, tabel 8).

Het is echter eveneens mogelijk dat ref. 2 vaccin (m-et Munokynin®) cellulaire immuniteit kan veroorzaken. Hiertoe zal het nodig zijn middelen toe te voegen die celrespons versterken (CRP), dat wil zeggen

- 55 middelen toe te voegen die helper-T-cel-subpopulaties (Th₁ en Th₂) versterken zoals IL-1 (interleukine-1), IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, γ -IFN (gamma interferon), cellulaire necrofactor en soortgelijke stoffen. Het moge duidelijk zijn dat het mogelijk is deze CRP-stoffen aan vaccins met olieachtig adjuvans toe te voegen in welk

geval hun celimmuunefect versterkt zal worden. Andere types adjuvantia die celrespons moduleren en immunostimuleren, zoals MDP (muramyl-dipeptide), ISCOM (Immuno Stimulant Complex) of liposomen kunnen eveneens worden gebruikt.

5.1.c) Conserveermiddelen

- 5 Elk van de conserveermiddelen die gebruikelijk worden toegepast bij de formulering van vaccins kan worden toegepast. Eén hiervan is thimerosal [natriumzout van (2-carboxyfenylthio)ethyl-kwik] (ALDRICH).

5.2. Werkwijze voor de bereiding van het vaccin

- 10 De vaccins resulterend uit deze uitvinding kunnen worden verkregen door een antigene fase die het geïnactiveerde virale antigeen en een andere fase, zoals adjuvans dat al of niet olieachtig kan zijn, afhankelijk van het gekozen adjuvans, te mengen. Eventueel kunnen CRP-stoffen aan één van de twee fasen worden toegevoegd. Wanneer het adjuvans olieachtig is kan een emulsie worden gevormd dat in een bijzondere en voorkeursuitvoeringsvorm (wanneer het adjuvans een mengsel van Marcol 52, Simulsol 5100 en Montanide 888 is) een dubbele w/o/w(water/olie/water-) emulsie is.

5.3. Vaccincontroletesten

- 15 Naast de gebruikelijke testen die het vaccin moet halen voor toediening daarvan qua (i) zuiverheid (met het oog op bacteriën, schimmels en vreemde virussen), (ii) identificatie, (iii) veiligheid, (iv) kracht en (v) fysisch-chemische controles zijn een aantal veldproeven op een totaal van vijf boerderijen (voorbeeld 5b) met betrekking tot de veiligheid en werkzaamheid van het vaccin uitgevoerd. Hierbij werden 508 zeugen gevaccineerd en opnieuw gevaccineerd met één van de vaccins van de onderhavige uitvinding, terwijl de
20 resterende 472 zeugen niet werden gevaccineerd en als controlezeugen werden gehouden, waarbij waargenomen werd dat het vaccin veilig en tegelijkertijd effectief is aangezien op sommige van de boerderijen de natuurlijke PRRS-ziekte in niet-gevaccineerde dieren werd waargenomen nadat vaccinatie had plaatsgevonden.

5.4. Posologie en instructies voor toediening van het vaccin

- 25 Het is bevestigd dat één dosis van 2 ml olieachtig vaccin met een concentratie van geïnactiveerd viraal antigeen gelijk aan of hoger dan $10^{5.5}$ TCID₅₀, dat door middel van diepe-intramusculaire-route wordt toegediend een zeer hoog percentage gevaccineerde dieren tegen PRRS kan beschermen. Het volgende vaccinatieprogramma wordt aangeraden:

* 1e vaccinatie:

- 30 Vaccineer alle fokdieren (zeugen en beren) en vaccineer opnieuw na 21 dagen. Dien vervolgens 1 dosis gedurende elke lactatie (zeugen), en elke 6 maanden (beren) toe.

* Post-vaccinaties:

- Bij dieren die bestemd zijn voor reproductie dient de eerste vaccinatie op de leeftijd van 6 maanden plaats te vinden met hervaccinatie na 21 dagen.
35 – Het is aan te raden gedurende de lactatieperiode te vaccineren, indien mogelijk 15 dagen vóór dekking.
– Beren: vaccineer 2 maal per jaar (iedere 6 maanden).

Anderzijds, wanneer geen CRP-stof in het vaccin is opgenomen kunnen deze stoffen tegelijkertijd op een plaats verschillend aan de inoculatieplaats worden geïnjecteerd.

6. Polyvalente vaccins

- 40 Teneinde een additioneel doel met de onderhavige uitvinding te bereiken worden combinaties verschaft van verschillende varkenspathogenen, die naast het geïnactiveerde viraal PRRS antigeen (Spaanse stam) één of meer van de hieronder genoemde pathogenen bevatten teneinde de bereiding van bi- of multivalente vaccins mogelijk te maken. Op deze manier kunnen bi- of multivalente vaccins worden bereid die geïnactiveerd viraal PRRS-antigeen en één of meer van de volgende pathogenen: *Actinobacillus pleuropneumoniae*,
45 *Haemophilus parasuis*, *Varkensparvovirus*, *Leptospira*, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Varkensrespiratie-coronavirus*, *Rotavirus* of iets tegen de pathogenen die de ziekte van Aujeszky, zwijninfluenza of overdraagbare gastro-enteritis veroorzaken, bevatten.

50 VOORBEELDEN

VOORBEELD 1

Isolatie van het virus

- 55 1.A. Bereiding van de monsters

Uit de long van een doodgeboren big, nageslacht van een zeug met de klassieke PRRS-symptomen [waarbij de zeug vrij was van antilichamen tegen de ziekte van Aujeszky, varkensparvovirose, mond-en-

klauwziekte, klassieke zwijnkoorts, zwijninfluenza (types H1N1 en H3N2) en overdraagbare gastro-enteritis werd een 10%’s suspensie in DMEM-kweekmedium gemaakt dat was aangevuld met een oplossing van antibiotica (PEG) die bestond uit 1000 IU/ml penicilline, 1 mg/ml streptomycine en 0,5 mg/ml gentamicine, in een verhouding long:DMEM oplossing van 1:10 (gew./vol.). De geproduceerde suspensie werd gehomogeniseerd en gedurende 1 uur bij kamertemperatuur (20–22°C) gelaten. Het homogenaat werd gevroren en 2 maal ontdooid, gecentrifugeerd en het verkregen supernatant werd bij –70°C bewaard om te worden gebruikt bij de infectie van alveolaire macrofagen van een varkenslong. Op soortgelijke wijze werden monsters bereid van de long van een big die levend werd geboren maar binnen een paar uur stierf. Daarnaast werd bloed verwijderd en met en zonder antistollingsmiddel gemengd en toegepast voor isolatie van het virus (uit bloedplasma) en ter verkrijging van serum.

1.B. Verrijking van alveolaire macrofagen van een varkenslong

Alveolaire macrofagen werden verkregen uit de longen van varkens die seronegatief waren voor de ziekte van Aujeszki, varkensparvovirose, mond-en-klauwziekte, klassieke zwijnkoorts, zwijninfluenza (types H1N1 en H3N2) en overdraagbare gastroenteritis. De leeftijd van de varkens die werden gebruikt bedroeg tussen 7 en 8 weken. Voor extractie van de longen werden de dieren aan anesthesie met natriumfenolbarbitaal onderworpen en vervolgens gedood. Onmiddellijk werden de longen samen met de trachea verwijderd na ligatie onder de epiglottis. De verwijderde long werd extern met fysiologische zoutoplossing gewassen en in achtereenvolgende spoelstappen werd 50 ml PBS die met 2% PEG-oplossing van antibiotica is aangevuld opgenomen tot in totaal 500 ml PBS was opgenomen. De cellen die verkregen zijn uit deze wasstappen werden gedurende 10 minuten bij 300 g gecentrifugeerd. Deze wasstap door centrifugatie werd 2 maal herhaald. De verkregen cellen werden met PBS en een PEG-oplossing van antibiotica gewassen en in DMEM-medium [DMEM, dat aangevuld was met niet-essentiële aminozuren (GIBCO), 1% natriumpyruvaat 1 mM en 1% glutamine 2 mM], 10% foetaal kalfsserum (FCS) en PEG-oplossing van antibiotica bij 1% geresuspendeerd. Het tellen van de cellen werd uitgevoerd in Neubauer-kamers en hiertoe werd een 1/10 verdunning van de macrofaagsuspensie bereid door toevoeging van 0,4 ml DMEM en 0,5 ml trypaan blauw oplossing aan 0,1 ml macrofaagsuspensie. Een celatant tussen 1 en 1,2 x 10⁶ werd verkregen.

1.C. Isolatie van het virus

Een kweekfles met een oppervlakte van 25 cm² die een kweek van alveolaire macrofagen van een varkenslong die eerder was bereid (3 x 10⁶ cellen/ml) in DMEM-medium en 10%’s FCS bevatte werd met 1 ml van het homogenaat van een monster dat afkomstig was uit de long van een doodgeboren big geïnfecteerd (voorbeeld 1.A.). Het homogenaat bleef gedurende 1 uur bij 37°C in contact met de macrofaagkweek werd gebufferd met CO₂ bij pH 7,0–7,4 en gedurende een aantal dagen bij 37°C geïncubeerd en tijdens deze periode werd het door het virus op de macrofagen geproduceerde CPE waargenomen. Na 3–4 dpi werd een CPE waargenomen van 70–80% waarna de kweken bij –80°C werden bevroren. Tegelijkertijd werd een kweek van alveolaire macrofagen van niet-geïnfecteerde varkenslong bereid en als negatieve controle gebruikt. Subkweken met het geïsoleerde virus werden uitgevoerd waarbij werd waargenomen dat het CPE, uitgaande van de tweede DPI 100% was. Het virus werd bij –80°C bevroren voor identificatie achteraf en karakterisatie. Na de vierde doorgang in macrofagen werden de overeenkomstige titraties in microtiterplaten met 96 putjes uitgevoerd waarbij een gemiddelde titer van 10^{5,6} TCID₅₀/ml in overeenstemming met de Reed & Muench werkwijze [Am. J. Hyg., 27: 493–497 (1938)] werd verkregen. Een monster van geïsoleerd virus (Spaanse stam) dat aangeduid is met PRRS-CY-218-JPD-P5-6-91 dat uit de long van een doodgeboren big werd geïsoleerd is in staat tot experimentele reproductie van de ziekte en werd gedeponneerd bij de ECACC op 29 juni 1993 onder toegangsnummer V93070108. Op soortgelijke wijze werd het virus geïsoleerd uit levende en doodgeboren biggen, het nageslacht van zeugen die experimenteel waren geïnfecteerd.

VOORBEELD 2

Identificatie en karakterisatie van het virus

50 Voorbeeld 2.1. Experimentele reproductie van de ziekte bij zwangere zeugen

Twaalf zeugen, German Landrace x Large White Cross die afstammen van boerderijen met een systematische serologische controle tegen de virussen van ziekte van Aujeszki, mond-en-klauwziekte, varkensparvovirose, klassieke zwijnkoorts, zwijninfluenza (types H1N1 en H3N2) en overdraagbare gastro-enteritis werden toegepast. Daarnaast werd de antilichaam-evaluatietest tegen het causatieve virus van PRRS uitgevoerd.

De zeugen werden 1 week vóór infectie naar de veilige stallen van het onderzoekscentrum verplaatst en in afzonderlijke stallen geplaatst. Tussen dagen 77 en 90 van de zwangerschap werden zeugen met

nummers 53, 76, 8, 62, 91, 93 en 19, met 5 ml via de intraveneuze route (IV) en met 5 ml via de intranasale route (IN) geïnfecteerd met PRRS-virus, Spaanse stam, dat uit de alveolaire macrofagen van de varkenslong, dat als PRRS-CY-218 JPD-P5-6-91 uit een vierde doorgang van macrofagen, door een 200 nm filter gefiltreerd en met een titer van $10^{5.6}$ TCID₅₀/ml was geïsoleerd. De 5 resterende zeugen (nummers 5 14, 40, 13, 30 en 85) werden tussen dagen 65 en 85 van de zwangerschap geïnfecteerd met 5 ml van het virus via slechts IN. Gedurende het experiment werden dagelijks voedselopname, rectale temperatuur en de klinische toestand van de dieren waargenomen alsmede de reproductiewijzigingen (premature geboortes, vertraagde geboortes, levende maar zwakke biggen, doodgeboren biggen, gemummificeerde en gezonde biggen).

10 Teneinde de bovengenoemde pathogenen verder te kunnen uitsluiten werden bloedmonsters van de zeugen vóór en na infectie genomen met als resultaat dat de dieren vóór en na infectie seronegatief waren voor de pathogenen en na infectie seropositief waren voor PRRS (zie tabel 1, 4.3.1.).

De reproductieresultaten verschijnen in tabellen 2 en 3. Zoals in tabel 2 wordt getoond waren 15 van de 93 biggen die geboren werden gemummificeerd, 35 doodgeboren, 22 levend geboren maar stierven zij op 15 de derde dag en overleefden 21 biggen 7 levensdagen.

Sommige zeugen vertoonden gebrek aan eetlust gedurende 2 à 4 dagen, op dagen 6 en 8 na infectie, terwijl andere zeugen gebrek aan eetlust op de 2e dag na infectie vertoonden. Hyperthermie werd in geen enkel geval waargenomen. Bij 4 zeugen vond de bevalling 1 tot 6 dagen te vroeg plaats (no. 8, 62, 92 en 93), terwijl bij de andere 3 zeugen bevalling 1 à 2 dagen werd vertraagd. Van de biggen die levend werden 20 geboren vertoonde 1 of 2 per nest oedeem van de ogen. De zwakke biggen vertoonden incoördinatie, parese van de achterpoten, rechtopstaand haar en myoclonie. Bij de necropsie die op sommige van de doodgeboren en zwakke biggen werd uitgevoerd werd een overvloed heldere vloeistof in de thoraxholte geconstateerd. Gezonde biggen die geboren werden uit geïnfecteerde moeders en na 8 tot 12 dagen werden gedood vertoonden grijze consolidatiefoci in de longen. Bij microscopische waarneming was de 25 meest significante verandering een geringe multifoci interstitiële pneumonie met vergroting van alveolaire septi vanwege de infiltratie van mononucleaire cellen. Deze lesies verschenen bij alle dieren die in het experiment zijn geanalyseerd.

Zoals in tabel 3 waargenomen kan worden zijn van de 65 biggen die zijn bevallen 36 doodgeboren, 26 levend maar zwak geboren, waarbij sterfte op de tweede levensdag plaatsvindt en waarbij 3 de eerste 30 levensweek overleefden. Eén zeug beviel 12 dagen te vroeg (nr. 4) terwijl de andere 1 à 2 dagen te vroeg bevielen. De klinische tekenen van de biggen die zwak zijn geboren zijn vergelijkbaar met die verkregen via IN + IV. Interstitiële pneumonie werd eveneens waargenomen. De geïnfecteerde zeugen vertoonden geen gebrek aan eetlust of hyperthermie.

Het meest relevante verschil tussen de twee systemen van infectie is dat via IN + IV gemummificeerde 35 biggen werden waargenomen en dat één of twee van de biggen die levend werden geboren in elk nest oedeem rond de ogen vertoonden. Met het oog op de verkregen resultaten kan worden geconcludeerd dat het model voor experimentele infectie bij zeugen bij ongeveer 80 dagen zwangerschap via beide infectieroutes (IN en IV) met het uit dieren die langs natuurlijke weg zijn geïnfecteerd geïsoleerde virus (Spaanse stam) de ziekte PRRS in zwangere zeugen reproduceert en een hoog gehalte aan gemummificeerde 40 foetussen, doodgeboren biggen en levende doch zwakke biggen veroorzaakt in een verhouding vergelijkbaar met die welke bij acute natuurlijke infectieuitbarstingen plaatsvindt. Het is raadzaam kunstmatig via de IN-route te infecteren omdat dit de natuurlijke infectieroute in het veld is en derhalve de meest geschikte wijze is om de werkzaamheid van het vaccin te evalueren. Door middel van dit experiment is het mogelijk geweest een model op te zetten voor experimentele infectie bij zwangere zeugen om de werkzaamheid van 45 het vaccin te testen.

TABEL 2

IN + IV

50								H		I
	A	B	C	D	E	F	G	h1	h2	
	53	77	115	9	3	2	0	—	4	4/4
	8	77	110	12	2	4	1	—	5	5/5
55	62	80	113	16	—	3	6	4	3	3/3
	91	0	109	14	—	1	8	1	4	NT

TABEL 2 (vervolg)

IN + IV

	A	B	C	D	E	F	G	H h1	h2	I
5	93	88	110	17	4	2	11	—	—	NT
	19	88	116	14	4	1	8	—	1	NT
10				93	15	17	35	5	21	

TABEL 3

IN

	A	B	C	D	E	F	G	H h1	h2	I
15	14	65	111	15	—	—	12	—	3	
	40	82	102	12	—	—	12	—	—	NT
	13	80	113	12	—	10	2	—	—	NT
20	30	80	113	15	—	12	3	—	—	NT
	85	85	112	11	—	4	7	—	—	NT
				65	—	26	36	—	3	

- 25 A: Zeug
 B: Tijdstip van infectie (dagen zwangerschap)
 C: Bevalling (dagen zwangerschap)
 D: Biggen totaal
 E: Gemummificeerde biggen
 30 F: Zwakke biggen, dood na 48 uur
 G: Doodgeboren biggen
 H: Biggen met klaarblijkelijk goede gezondheid
 h1: dood tussen 2 en 7 dagen
 h2: levend na 1 week
 35 I: Interstitiële pneumonie
 NT: Niet getest.

Voorbeeld 2.2. Experimentele reproductie van de ziekte bij biggen

40 Dit experiment werd ontwikkeld ter bevestiging van het feit dat het geïsoleerde virus (Spaanse stam) dat reproductiewijzigingen bij zeugen veroorzaakt in staat is klinische tekenen alsmede macroscopische en microscopische lesies in de longen van 2 maand oude biggen te produceren. Hiertoe werden 10 biggen via IN-route met 5 ml Spaanse stam virus met een titer van $10^{5.6}$ TCID₅₀ ml geïnfecteerd en werden 6 andere biggen als controles gebruikt waarbij alle biggen afstamden van twee nesten. De dieren werden op dagen 3, 7, 8, 9 en 11 na infectie gedood. De verkregen resultaten worden in tabel 4 getoond.

TABEL 4

	Nr.	I/C	DPI	Antilichamen	I.P.	V.I.
50	2	I	3	—	2+	NT
	12	I	3	—	2+	NT
	11	C	3	—	NL	NT
	1	I	7	1:80	4+	+
	14	I	7	1:80	2+	+
55	13	C	7	—	NL	—
	10	I	8	1:160	4+	+

TABEL 4 (vervolg)

	Nr.	I/C	DPI	Antilichamen	I.P.	V.I.
5	15	I	8	1:160	2+	+
	8	C	8	—	NL	—
	17	C	8	—	NL	—
	4	I	9	1:160	4+	+
	5	C	9	—	NL	—
10	20	I	11	1:160	4+	+
	18	I	11	1:320	3+	+
	9	I	11	1:320	3+	—
	6	C	11	—	NL	—

- 15 Nr.: varkensnummer
 I/C: geïnfecteerd (I) of controle (C)
 DPI: dagen na infectie
 I.P.: interstitiële pneumonie
 V.I.: virusisolatie
- 20 2+: enige interstitiële pneumonie
 3+: intermediaire interstitiële pneumonie
 4+: ernstige interstitiële pneumonie
 NT: niet getest
 NL: geen lesies.
- 25

Gedurende de 11 dagen van het experiment werden geen klinische respiratie-tekenen of hyperthermie waargenomen hoewel er gewichtsverlies bij de geïnfecteerde dieren optrad in vergelijking met de niet geïnfecteerde dieren. Onder microscopische waarnemingen was het meest relevante aspect de aanwezigheid van meervoudige consolidatiefoci in de longen, gecongesteerde lymfeklieren in de kaak en enige intestinale bloedingen. Op microscopisch niveau werd interstitiële pneumonie waargenomen.

Er werd virus geïsoleerd uit de oplossingen die uit het wassen van longen van geïnfecteerde dieren op een verse macrofaagkweek waren verkregen, maar er werd geen virus geïsoleerd uit de controledieren waarin geen seroconversie werd waargenomen noch werden macroscopische of microscopische lesies op longniveau's waargenomen. Wanneer celtellingen werden uitgevoerd op het wasproduct van de longen van geïnfecteerde dieren werd 30% dode cellen (macrofagen) waargenomen hetgeen een factor van belang kan vormen bij secundaire infecties vanwege vernietiging van een sleutelimmuundefensie-element (macrofagen). De afwezigheid van respiratie-tekenen kan te wijten zijn aan het feit dat de experimentele infecties in stallen met continue disinfectiebehandeling werden uitgevoerd waardoor de bacteriële concentratie veel kleiner was in vergelijking met die, welke bestaat bij een kudde onder veldomstandigheden.

Voorbeeld 2.3. Chloroformgevoeligheidstest

De werkwijze van Feldman, H. en Wang, S. (4.3.3.) werd toegepast, hetgeen de kennis leverde dat het geïsoleerde virus een lipide-mantel heeft, aangezien een titerverval van 4 log₁₀ bij de controlekweken in vergelijking met de kweken die met chloroform zijn behandeld, plaatsvindt.

45 Voorbeeld 2.4. Sequenzen van het virale genoom

i) Zuivering van het virus

Het virus dat op alveolaire macrofagen van een varkenslong repliceerde werd gezuiverd door filtratie en centrifugatie in 10 tot 50% metrizamide-gradiënt (SIGMA) hetgeen resulteerde in een band die nogmaals werd gecentrifugeerd zoals genoemd is in 4.3.4. Met het gezuiverde virus werd een elektroforese in polyacrylamidegel uitgevoerd en werd een immunoblot ontwikkeld met een specifiek serum dat eiwitten vertoonde met een klaarblijkelijk molecuulgewicht van 15, 23, 54 en 66 K Daltons.

ii) Zuivering van het virale RNA

Het virale RNA werd gezuiverd onder toepassing van een in de handel verkrijgbare kit (PHARMACIA) dat de binding van de RNA-poly-(A)-staart aan een cellulose-oligo-(dT)-matrix en daarop volgende elutie mogelijk maakt.

iii) cDNA-synthese

Een in de handel verkrijgbare kit werd toegepast (Boehringer Mannheim) (zie 4.3.4. iii).

iv) Klonering en karakterisatie van de cDNA-klonen

Het cDNA werd in een vector gekloneerd dat was afgeleid van pUC18 en een reeks klonen werd verkregen die de volledige nucleotidesequentie die met ORFs 3-7 overeenkomt, bevat.

v) Het sequencen en vergelijken van de sequenties met die van LV

- 5 De resultaten van het sequencen van het cDNA van het virus dat in onze laboratoria is geïsoleerd (ORFs 3-7), alsmede de vergelijking tussen die sequentie en de LV-sequentie wordt in 4.3.4.v genoemd waar gezien kan worden dat op aminozuurniveau ongeveer 94,9% homologie bestaat met in totaal 47 verschillen in aminozuren, waarvan 35 overeenkomen met niet conservatieve substituties. Deze verschillen op aminozuurniveau kunnen verantwoordelijk zijn voor de verschillen in pathogeniciteit die bestaan tussen de
- 10 diverse geïsoleerde PRRS-virusstammen.

VOORBEELD 3

Formulering van een vaccin

- Een vaccin dat bescherming tegen PRRS kan bieden wordt bereid in emulsievorm volgens de werkwijze die
- 15 hieronder wordt uiteengezet. Een kweek van alveolaire macrofagen van een varkenslong wordt geïnfecteerd met MOI (multiplicity order infection) van 0,001 en wordt gedurende 24 uur bij 37°C geïncubeerd waarbij aan het eind het kweekmedium wordt vervangen door infectiemedium (DMEM dat is aangevuld met 2% FCS). De kweek wordt gedurende 4 dagen bij 37°C geïncubeerd tot 70-80% CPE wordt waargenomen. Wanneer deze periode eenmaal voltooid is wordt een IPMA-test uitgevoerd teneinde identificatie te
- 20 bevestigen. Het virus wordt door vacuümaspiratie verzameld en bij -80°C bevroren. De virale suspensie die bestemd is voor vaccin moet $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml minimum-titer hebben, voorafgaande aan inactivering daarvan en dient niet te zijn besmet met bacteriën, schimmels, mycoplasma's of andere virussen. Wanneer de titer lager is dient deze te worden bijgesteld door het antigeen te concentreren. Voor de inactivatie van de virale suspensie wordt 2% β -propiolacton-oplossing toegevoegd en gedurende 1 nacht bij 4°C geroerd waarbij de
- 25 pH op 7,4 wordt gehouden door toevoeging van 0,5 N NaOH. Wanneer de inactivatieperiode eenmaal is voltooid wordt de virale suspensie gedurende 1 uur op 37°C gehouden. Het volgende wordt daarna bereid:
- a) een antigene fase van het virale antigeen dat geïnactiveerd is met een minimale concentratie van $10^{5.5}$ TCID₅₀/dosering en het conserveermiddel; en
 - b) een olieachtige fase die bestaat uit Marcol 52, Simulsol 1500 en Montanide 888.
- 30 De waterige fase, die continu wordt geroerd, wordt langzaam aan de reactor toegevoegd die de olieachtige fase welke ook wordt geroerd bevat. Wanneer de waterige fase helemaal is toegevoegd wordt roeren gedurende 10 minuten voortgezet. In een bijzondere voorkeursuitvoeringsvorm zijn vaccins bereid die in staat zijn PRRS te voorkomen die per dosis van 2 ml:
- a) 53% van een antigene fase, die
- 35 i) Spaanse stam PRRS viraal antigeen in DMEM-kweekmedium, die met β -propiolacton is geïnactiveerd met een minimum concentratie van $10^{5.5}$ TCID₅₀, en
 - ii) thimerosal 0,01% bevat; en
 - b) 47% van een olieachtige fase die
 - i) Marcol 52 790,0 mg

40 ii) Simulsol 5100 ... 70,0 mg

 - iii) Montanide 888 .. 80,0 mg bevat, omvat.

- De verhouding van olieachtige fase/waterige fase is een gewicht/volume (gew./vol.) verhouding. Dit vaccin wordt aangeduid als MSD ref. 1. Het verkregen vaccin wordt onderworpen aan de overeenkomstige controletesten, voorafgaand aan gebruik. Een ander vaccin werd op soortgelijke wijze bereid onder
- 45 toepassing van Munokynin® (aluminiumhydroxide en Quil A, zoals verschaft door American Cyanamid) als adjuvans waarbij dezelfde hoeveelheid geïnactiveerd virus werd gebruikt. Dit vaccin is MSD ref. 2 genoemd.

VOORBEELD 4

Evaluatie van het adjuvans

- 50 Een veldproef werd uitgevoerd met een totaal van 128 zeugen waarvan 49 werden gevaccineerd met 1 dosis van het vaccin dat aangeduid is met MSD Ref. 1 en 50 zeugen werden met 1 dosis van het vaccin dat aangeduid is met MSD ref. 2 (Munokynin®) gevaccineerd, terwijl de resterende 29 niet werden gevaccineerd en als controles werden gehouden. Na 22 dagen werden de zeugen opnieuw met 1 dosis van het overeenkomstige vaccin gevaccineerd. De volgende parameters werden onderzocht.
- 55 1. Serologisch respons door middel van IPMA-bepaling op de volgende tijdstippen:
- T₀: vaccinatie en bloedafname
- T₂₂: vaccinatie opnieuw en bloedafname

T₅₁: bloedafname 50 dagen na vaccinatie

2. Algemene type reacties (eetlust voor voedsel, hyperthermie enz.) De resultaten die werden verkregen worden getoond in tabellen 5 en 6, welke de percentages aangeven van zeugen met positieve serologische reactie (tabel 5) en het rekenkundige gemiddelde van de serologische titers die bereikt is (tabel 6).

5

TABEL 5
% dieren met serologische reactie (+)

	T ₀	T ₂₂	T ₅₁
10 MSD Ref. 1	—	59%	100%
MSD Ref. 2	—	40%	87%
Controle	—	—	—

15

TABEL 6
Rekenkundig gemiddelde van de serologische titers

	T ₀	T ₂₂	T ₅₁
20 MSD ref. 1	—	58	200
MSD ref. 2	—	37	133
controle	—	—	—

25 Er werden geen significante lokale of algemene type reacties waargenomen. Het kan worden bevestigd op basis van de verkregen resultaten dat positieve seroconversie met beide vaccins kan worden bereikt, hoewel deze enigszins hoger zijn met het vaccin MSD ref. 1 (olieachtige adjuvans). Bij revaccinatie wordt een hoger seroconversiepercentage waargenomen en is het rekenkundige gemiddelde van de verkregen titers bij dieren die met MSD ref. 1 zijn gevaccineerd hoger.

30

VOORBEELD 5

Veiligheid bij zeugen

Voorbeeld 5.A. Op laboratoriumniveau

35 Voorbeeld 5.A.1. — Voor de eerste maal barend zeugen

Achtien voor de eerste maal barend zeugen (German Landrace x Large White Cross) uit een varkensproductieboerderij werden gekozen en werden over twee stallen verdeeld met 9 zeugen per stal, zodat zeugen die met hetzelfde vaccin werden gevaccineerd (MSD ref. 1 of MSD ref. 2) die in voorbeeld 3 hierboven zijn verkregen, in dezelfde stal werden gehuisvest. Negen zeugen werden via diepe-IM-route gevaccineerd met 40 1 dosis vaccin MSD ref. 1 van 2 ml dat 10^{5.5} TCID₅₀/dosis geïnactiveerd virustiter bevatte en werden 20 dagen later met een andere dosis van hetzelfde titer opnieuw gevaccineerd. De andere negen zeugen werden met het vaccin MSD ref 2 (2 ml dosis 10^{5.5} TCID₅₀/dosis geïnactiveerde virustiter) gevaccineerd en op dezelfde dagen opnieuw gevaccineerd. Gedurende de eerste 5 dagen na inoculatie werden de volgende waarnemingen verricht:

45 a) Lokale reactie

Deze bestaat uit macroscopische waarneming van de inoculatieplaats en betasting daarvan, waarbij de mate van ontsteking in vergelijking met objecten van bekende grootte wordt waargenomen,

b) Algemene reactie

Deze bestaat uit macroscopische waarneming van de dieren en verificatie van hun eetlust. In het 50 negatieve geval wordt rectale temperatuur elke 12 uur gecontroleerd tot hyperthermie of andere ongunstige tekenen zijn verdwenen. De verkregen resultaten geven aan dat er een enigszins inflammatoire reactie bij sommige zeugen plaatsvindt, welke duidelijk is bij de inoculatieplaats en in elk geval binnen een paar dagen verdwijnt; er werden geen etterende formaties waargenomen. Slechts één van de zeugen weigerde al het eten in de eerste voeding na inoculatie op te nemen, maar de voedselopname was bij de volgende voeding 55 normaal zodat rectale temperatuurmeting onnodig was. Er waren geen substantiële verschillen in respons op de verschillende geteste vaccins op basis waarvan bevestigd kan worden dat beide vaccins veilig zijn.

Voorbeeld 5.A.2. — Zwangere zeugen

Zeven zwangere zeugen (German Landrace x Large White Cross) van een varkensproductieboerderij werden willekeurig gekozen : 6 voor het eerst bevallende zeugen van ongeveer 9 maanden en 1 zeug die reeds vaker was bevallen, met een leeftijd van 3 jaar en 7 maanden.

Het vaccin, dat aangeduid wordt als MSD ref. 1 werd als enige toegepast. De zeugen werden via de
5 diepe-IM-route gevaccineerd met een vaccindosis van 2 ml dat geïnactiveerde virustiter van $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml bevatte en na 15 dagen werden zij opnieuw met 1 dosis van hetzelfde titer gevaccineerd. Gedurende de eerste 5 dagen na inoculatie werden de volgende waarnemingen verricht:

a) lokale reacties

die bestaan uit het doen van macroscopische waarnemingen van de grootte van inoculatie en het betasten
10 daarvan waarbij de mate van ontsteking in vergelijking met objecten met een algemeen bekende grootte wordt genoteerd.

b) Ontbreken van eetlust

welke bestaat uit het macroscopisch waarnemen van de dieren en het controleren op verlies aan eetlust.

c) Rectale temperatuur

15 Het meten van de rectale temperatuur 24 uur na vaccinatie en 24 uur na hervaccinatie. De verkregen resultaten tonen dat er een enigszins lokale reactie bij twee van de dieren plaatsvond die niet ernstig was blijkens de kleine grootte en het na een paar dagen verdwijnen daarvan. Ontbreken van eetlust of hyperthermie werd in geen enkel geval waargenomen. Op basis hiervan kan worden bevestigd dat het vaccin veilig is.

20 Voorbeeld 5.b. Veiligheid en werkzaamheid in een veldproef

Dit experiment werd uitgevoerd op de 5 boerderijen die hieronder zijn aangegeven. Een variabel aantal zeugen van elke boerderij werd gevaccineerd via diepe-IM met 1 dosis van 2 ml van het vaccin MSD ref. 1 dat een titer van $10^{5.5}$ TCID₅₀/dosis geïnactiveerd virus bevat en werd 21 dagen later opnieuw gevaccineerd met een andere dosis van hetzelfde titer waarbij de andere zeugen niet werden gevaccineerd en als

25 controles werden toegepast:

	Boerderij	Gevaccineerd	Controle	Totaal
30	I	19	11	30
	II	46	34	80
	III	153	147	300
	IV	127	123	250
	V	163	157	320
35	TL	508	472	980

TL = totaal

I : Boerderij "Ramon del Quinta" (Banyoles)
II : Boerderij "Cal Sabater" (Orriols)
40 III : Boerderij "E. Canela" (Preixana)
IV : Boerderij "R. Cunillera" (L ' Albi)
V : Boerderij "Inversors Picber" (Bellpuig)

45 Er is na waarneming van algemene en lokale reacties bevestigd dat het vaccin veilig is. Lokale reacties werden slechts in 1% van de dieren waargenomen. In samenhang met de productieparameters die in de bovengenoemde boerderijen zijn waargenomen konden geen variaties worden waargenomen in vergelijking met hun klinische geschiedenis. Met betrekking tot serologisch respons vertonen sommige boerderijen seroconversie naar het vaccin, terwijl in andere het respons negatief was. Dit duidt echter niet op een lage
50 mate van bescherming, aangezien bij de experimentele infectietest in het laboratorium seronegatieve dieren experimentele infectie konden tegengaan (voorbeelden 7 en 8). In samenhang met de overdracht van moederimmunitet van gevaccineerde dieren naar hun nageslacht wordt er een grote val in antilichaamtiter bij een leeftijd van 1 maand waargenomen. Bij gevaccineerde en opnieuw gevaccineerde zeugen die serologisch positief zijn vindt een grote afname in antilichaamtiter plaats 2 maanden na hervaccinatie.

VOORBEELD 6

Verificatie van celimmunitet

- Vijf zwangere zeugen (German Landrace x Large White Cross) van een varkensproductieboerderij werden toegepast. De dieren werden verplaatst naar de veilige stallen van het onderzoekscentrum. Twee zeugen werden naar willekeur gekozen en werden met het vaccin dat als MFD ref. 1 wordt aangeduid gevaccineerd. Een andere zeug werd gevaccineerd met het vaccin dat is aangeduid met MSD ref. 2. De twee resterende zeugen werden niet gevaccineerd. De zeugen werden gevaccineerd via de diep-IM-route met 1 dosis van 2 ml vaccin MSD ref. 1 of vaccin MSD ref. 2 dat geïnactiveerde virustiter van $10^{5.5}$ TCID₅₀ bevatte en 20 dagen later werden de zeugen met nog een dosis van hetzelfde titer gevaccineerd. Daarna werden via de IN-route alle zeugen tussen dagen 77 en 90 van de zwangerschap geïnfecteerd met 5 ml van het virus PRRS-CY-218-JPD-P5-6-91 met een titer van $10^{5.8}$ TCID₅₀/ml. Ten tijde van de infectie werd geverifieerd dat alle gevaccineerde zeugen antilichaam tegen het causatieve virus van PRRS vertoonden (positieve serologie). Tabel 7 toont de reproductieresultaten die als geheel werden verkregen:

TABEL 7

	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)
20	2	MSD ref. 1	23	20	—	20	3
	1	MSD ref. 2	12	—	6	—	6
	2	—	24	—	7	—	17

- (A) : aantal zeugen
 (B) : gebruikt vaccin
 (C) : totaal aantal biggen
 (D) : aantal biggen die levend en in goede gezondheid werden geboren
 (E) : aantal biggen die levend maar zwak werden geboren
 (F) : aantal biggen die na de eerste week leefden
 (G) : aantal doodgeboren biggen

- De verkregen resultaten demonstreren dat de zeugen die met vaccin MSD ref. 1 (olieachtig adjuvans) zijn gevaccineerd beter bestand zijn tegen infectie dan de zeugen die met vaccin MSD ref. 2 (waterig adjuvans) zijn gevaccineerd, hetgeen kan betekenen dat het adjuvans een belangrijke rol speelt bij het vestigen van celimmunitet.

VOORBEELD 7

40 Werkzaamheid bij zwangere zeugen

Elf fokzeugen werden toegepast (German Landrace x Large White Cross) afkomstig van een varkensproductieboerderij. De dieren werden verplaatst naar de veilige stallen van het onderzoekscentrum.

- Drie zeugen werden naar willekeur gekozen (zeugen nrs. 57, 63 en 74) en werden met het vaccin dat als MSD ref. 1 wordt aangeduid gevaccineerd. Drie zeugen (nrs. 15, 18 en 23) werden met het vaccin dat als MSD ref. 2 wordt aangeduid gevaccineerd en de resterende vijf zeugen (nrs. 14, 40, 13, 30 en 85) werden niet gevaccineerd.

- De zeugen werden via de diep-IM-route gevaccineerd met 1 dosis van 2 ml van het vaccin dat als MSD ref. 1 of het vaccin MSD ref. 2 wordt aangeduid dat geïnactiveerd virus met een titer van $10^{5.5}$ TCID₅₀/dosis en werden 20 dagen later opnieuw gevaccineerd met een andere dosis met hetzelfde titer. Lokale en algemene reacties werden waargenomen. Serologisch respons bij de dieren werd geverifieerd door middel van de IPMA-test in overeenstemming met het volgende programma:

- T₀ : bloedafname en vaccinatie
 T₂₀ : bloedafname en revaccinatie
 T₄₂ : bloedafname
 T₇₈ : bloedafname en experimentele infectie

T₈ : bloedafname na experimentele infectie
 T₂₅ : bloedafname na experimentele infectie
 T₅₀ : bloedafname na experimentele infectie

5

Experimentele infectie werd uitgevoerd in de veilige stallen van het onderzoekscentrum. Alle dieren werden geïnfecteerd met 5 ml PPRS-CY-218-JPD-P5-6-91 virulent virus met een titer van 10^{5.5} TCID₅₀/ml door middel van de IN route. Serologisch respons werd genoteerd, evenals het aantal biggen die levend en dood aan elke zeug werden geboren. Pre- en postcolostrum-bloedafname werd bij de biggen uitgevoerd en long- en hersenmonsters werden van de doodgeboren biggen en de gedode biggen genomen op verschillende dagen ter isolatie van het virus en voor histologische preparaten. De verkregen resultaten worden in tabellen 8-10 hieronder getoond.

10

TABEL 8
 Serologische resultaten

15

No.	T ₀	T ₂₀	T ₄₂	T ₇₈	T ₈	T ₂₅	T ₅₀
15	—	—	1/160	1/160	1/640	1/1280	NT
20 18	—	—	1/80	1/80	1/320	1/640	1/320
23	—	1/160	1/160	NP	NP	NP	NP
57	—	1/160	1/160	1/320	1/320	1/1280	1/60
63	—	1/80	1/80	1/160	1/640	1/1280	1/160
74	—	1/80	NT	1/160	1/640	1/2560	NT
25 C14	—	—	—	—	1/1280	1/2560	NT
C40	—	—	—	—	NT	1/1280	NT
C13	—	—	—	—	NT	1/320	NT
C30	—	—	—	—	NT	1/320	NT
C85	—	—	—	—	NT	1/320	NT

30

NT: niet getest
 NP: niet zwanger

TABEL 9
 Resultaten van het baren

35

No.	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)	(H)	(I)	(J)
15*	83	112	13	—	—	—	—	—	—	—
40 18	78	111	—	11	8	—	3	—	—	2
23 ^a										
57	63	108	—	13	7	—	6	—	—	—
63	79	114	—	13	8	1	2	2	—	2
74*	83	112	6	—	—	—	—	—	—	—
45 c14	65	111	—	15	—	—	3	12	—	—
c40	82	102	—	12	—	—	—	12	—	—
c13	80	113	—	12	—	10	—	2	—	—
c30	80	113	—	15	—	12	—	3	—	11
c85	85	113	—	11	—	4	—	7	—	4

50

a : niet zwanger
 * : deze zeugen stierven vanwege uitzonderlijk hoge omgevingstemperatuur. Een keizersnede werd na 112 dagen zwangerschap uitgevoerd.

(A) : datum van infectie (dagen zwangerschap)

55

(B) : het baren (dagen zwangerschap)

(C) : totaal aantal biggen (keizersnede)

- (D) : totaal aantal biggen (geboren)
 (E) : biggen die met gewone gezondheid zijn geboren
 (F) : biggen die zwak zijn geboren
 5 (G) : biggen die levend zijn geboren met naar buiten gedraaide poten
 (H) : doodgeboren biggen (dood)
 (I) : doodgeboren biggen (gemummificeerd)
 (J) : biggen die binnen de eerste week dood waren.

10

TABEL 10 – Serologie van de biggen
 A. Gevaccineerde zeugen

	1	2	3	4	5
15	15 ^{a)}		NT	NT	NT
				3 dagen	10 dagen
	18	1	–	NT	NT
		2	–	NT	NT
		7	NT	1/640	1/160
20		8	NT	1/2560	1/320
		9	NT	1/1280	1/640
		10	NT	1/1280	1/320
		11	NT	1/1280–1/2560	1/640
		12	NT	1/2560	1/640
25		13	NT	≥1/2560	1/160
		14	NT	1/1280	1/160
		15	NT	1/2560	1/160
	23	NP	NP	NP	
				4 dagen	8 dagen
30	57	1	–	1/320–1/640	1/320
		2	–	1/320–1/640	1/160–1/320
		3	–	1/640	NT
		4	–	1/320–1/640	NT
		5	–	1/640	NT
35				1 dag	8 dagen
	63	1	NT	≥1/2560	1/640
		2	NT	≥1/2560	1/320
		3	NT	1/2560	1/320–1/640
		4	NT	1/2560	1/640–1/1280
40		5	–	1/1280	1/320
		6	–	1/2560	1/640
		7	NT	1/640–1/1280	1/320
		8	NT	1/1280	NT
	74 ^{a)}			NT	–

45

(TABEL 10)
 B. Controle biggen (niet gevaccineerd)

	1	2	3	4	5
50					
				12 H. 38 H.	5 dagen 9 dagen
	C14	1	NT	≥1/2560 >1/2560	1/1280 1/640
		2	–	≥1/2560 ≥1/2560	1/1280 1/1280
		3	≥1/2560	≥1/2560 1/1280	1/1280 1/1280
55	C40		–	NT	
				9 dagen	

(TABEL 10) (vervolg)
B. Controle biggen (niet gevaccineerd)

	1	2	3	4	5
5					
	C13	1	—	1/160	+
		2	—	1/160	—
		3	—	1/320	—
		4	—	1/320	—
10	C30		—	NT	NT
	C85		NT	NT	NT

Legenda:

- a) : Deze zeugen stierven vanwege uitzonderlijk hoge omgevingstemperatuur. Na 112 dagen zwangerschap werd een keizersnede uitgevoerd.
- 1 : Getal dat aan elk dier werd toegewezen
- 2 : Biggen (het getal dat aan elke big is toegewezen komt overeen met de geboortevolgorde)
- 3 : Pre-colostrum serologie
- 4 : Post-colostrum serologie
- 20 5 : Isolatie van het virus
- NT : Niet getest
- : Negatief
- : Positief
- H : Uren
- 25 NP : Niet zwanger.

Het is duidelijk uit de resultaten die zijn verkregen dat er positieve seroconversie ontstaat tegen het causatieve virus van PRRS. Daarnaast vindt bevredigend gedrag tegen experimentele infectie plaats in vergelijking met de controledieren, waarbij sterfte bij de meerderheid van de foetussen werd geproduceerd. Dientengevolge kan worden bevestigd dat deze vaccinatie een werkzame maatregel is ter voorkoming van PRRS.

VOORBEELD 8

35 Werkzaamheid van het vaccin tegen experimentele infecties met een ander virus dat PRRS veroorzaakt (kruislingse bescherming)

Dit experiment werd ontwikkeld met het oog op verificatie van de werkzaamheid van het vaccin dat aangeduid is als MSD Ref. 1 in een experimentele infectietest onder toepassing van 2 pathogene stammen van het causatieve virus van PRRS. De toegepaste pathogene PRRS-stammen waren:

- 40 i) Spaanse stam, PRRS-CY-218-JPD-P5-6-91; en
ii) Franse stam, SDRP II 8B, die door Dr. E. Albina van "Laboratoire Central de Recherches Avicole et Porcine", Ploefragnan, Frankrijk werd verschaft.

Het gebruikte vaccin was het vaccin dat aangeduid is als MSD ref. 1 waarvan de formule in voorbeeld 5 is gegeven. Dertig zeugen die sero-negatief waren voor de causatieve virussen van PRRS werden

45 toegepast in een reproductiecyclus die niet gelegen was tussen 10 dagen vóór of 10 dagen na dekking, noch 10 dagen vóór noch 10 dagen na het baren. Vier groepen dieren werden gevormd:

A: 10 zeugen die via de IM-route waren gevaccineerd en opnieuw waren gevaccineerd en via de IN-route waren geïnfecteerd met Spaanse stam PRRS-CY-218-JPD-P5-6-91 van het virus

B: 5 zeugen die niet aan enige vaccinatie waren onderworpen en via de IN-route met Spaanse stam

50 PRRS-CY-JPD-P5-6-91 zijn geïnfecteerd

C: 10 zeugen die gevaccineerd zijn en opnieuw zijn gevaccineerd via de IM-route en via de IM-route zijn geïnfecteerd met Franse stam SDRP II 8b

D: 5 zeugen die niet aan enige vaccinatie waren onderworpen en via de IN-route met Franse stam SDRP II 8b zijn geïnfecteerd.

55 Uitgevoerd experiment

Twintig zeugen van de groep A en C die hierboven zijn genoemd werden met 1 dosis van 2 ml van het vaccin dat als MSD ref 1 is aangeduid via de diep-IM-route gevaccineerd en 21 dagen later opnieuw met

dezelfde dosis vaccin gevaccineerd. Daarna werden tussen dagen 17 en 80 van de zwangerschap alle zeugen experimenteel geïnfecteerd met:

Groepen A en B: 5 ml virus PRRS-CY-218-JPD-P5-6-91 met een titer van $10^{5.8}$ TCID₅₀/ml via de IN-route; en

5 Groepen C en D: 5 ml virus SDRP II 8B met een titer van $10^{5.8}$ TCID₅₀/ml via de IN-route.

De reproductieparameterresultaten worden getoond in tabellen 11–12 (uitdaging met PRRS-CY-218-JPD-P5-6-91) en 13–14 (uitdaging met SDRP II 8b).

TABEL 11 (gevaccineerde zeugen)
Uitdaging met PRRS-CY-218-JPD-P5-6-91

10

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
37 ^{a)}	14						
15 39	6	6	—	—	—	5	
68	12	8	2	1	1	7	
45	10	7	1	—	2	6	
19	10	9	1	—	—	8	
38	9	8	—	—	1	8	
20 41	7	5	—	—	2	5	
71	11	6	1	—	4	6	
36	10	6	1	1	2	6	
26 ^{b)}							
25 TL	75	55	6	2	12	51	

TL = totaal

% levende biggen: 68% (75 geboren/51 die overleven)

30 68% bescherming wordt waargenomen bij vergelijking van de biggen die levend zijn geboren met de biggen die 7 dagen hebben overleefd. Het feit dat experimentele infectie veel krachtiger is dan natuurlijke infectie in het veld, naast de bovengenoemde resultaten doet vermoeden dat de vooruitzichten voor bescherming nog veel beter zijn.

TABEL 12 (niet gevaccineerde zeugen)
Uitdaging met PRRS-CY-218-JPD-P5-6-91

35

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
40 63	9	—	—	1	8	—	
88	6	—	3	—	3	—	
79	8	—	3	—	5	—	
22	12	2	—	—	10	1	
28	7	3	—	—	4	3	
45 TL	42	5	6	1	30	4	

TL = totaal

50 % levende biggen: 9, 5% (42 geboren/4 die overleven)

De Spaanse stam die voor infectie is gebruikt heeft een extreem hoge pathogene kracht (90,5%) aangezien slechts 4 biggen van de 42 die geboren werden de eerste week overleefden.

TABEL 13 (gevaccineerde zeugen)
Uitdaging met SDRP II 8B

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
5	51	13	10	2	—	1	10
	27	14	12	1	—	1	11
	16	9	8	—	—	1	7
	17	15	13	—	—	2	12
10	1	7	—	—	—	—	7
	8	15	13	—	—	2	13
	57	10	9	—	—	1	8
	61	12	8	1	—	3	8
	78	10	10	—	—	—	10
15	52 ^{c)}						
	TL	105	83	4	—	11	86

TL = totaal

20

% levende biggen: 82% (105 geboren/86 die overleven) ongeveer 82% bescherming wordt waargenomen.

TABEL 14 (niet gevaccineerde zeugen)

25 Uitdaging met SDRP II 8B

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
	62	12	7	1	4	—	9
	81	15	13	—	—	2	13
30	4	12	12	—	—	—	11
	94	14	9	1	—	4	9
	1	13	8	1	4	—	8
	TL	66	49	3	8	6	50

35

tl = totaal

% levende biggen: 75,7% (66 geboren/50 die overleven)

40 Ongeveer 24,3% sterfte wordt waargenomen. De pathogeniciteit van de Franse stam is zeer zwak (24,3%) in vergelijking met de resultaten die verkregen werden met de uitdaging met Spaanse stam (sterfte 90,5%). De resultaten die zijn toegepast voor de evaluatie van de werkzaamheid bij het vergelijken van gevaccineerde en niet gevaccineerde zeugen zijn in het geval van de Franse stam niet zeer significant. De pathogeniciteit in de gevaccineerde dieren wordt echter wel tot 17,8% verlaagd.

45

Legenda voor Tabellen 11–14

- a) : Een andere ziekte (niet PRRS) (de biggen worden niet gebruikt)
- b) : Ziek, stierf vóór infectie
- c) : Stierf vanwege een andere oorzaak
- 50 (1) : Zeugreferentie
- (2) : Totaal aantal biggen
- (3) : Aantal gezonde biggen die geboren zijn
- (4) : Aantal zwakke biggen die geboren zijn
- (5) : Aantal levende biggen met naar buiten gedraaide poten
- 55 (6) : Aantal doodgeboren biggen
- (7) : Aantal biggen die na de eerste week leefden

Conclusies

1. Virus dat varkensreproductie en respiratoirsyndroom (PRRS) Spaanse stam veroorzaakt aangeduid als PRRS-CY-218-JPD-P5-6-91 dat bij ECACC met toegangsnummer V93070108 is gedeponeerd.
- 5 2. Virus volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het een DNA sequentie omvat volgens één van de sequenties uit figuren 1-5, welke DNA-sequentie codeert voor een product met de activiteit van één van de open leesramen van figuren 1-5.
3. Vaccin voor bescherming tegen varkensreproductie- en respiratie-syndroom (PRRS), met het kenmerk, dat het een geschikte hoeveelheid PRRS viraal antigeen of virus van de Spaanse stam volgens conclusie 1
- 10 dat geïnactiveerd is alsmede een geschikt adjuvans en eventueel een conserveermiddel omvat.
4. Vaccin volgens conclusie 3, met het kenmerk, dat het een hoeveelheid geïnactiveerd virus van ten minste $10^{5.5}$ TCID₅₀/dosis bevat.
5. Vaccin volgens conclusie 3 of 4, met het kenmerk, dat een olieachtige adjuvans wordt gevormd door een mengsel van Marcol 52, Simulsol 5100 en Montanide 888.
- 15 6. Vaccin volgens de conclusies 3-5, met het kenmerk, dat het een emulsie is van (i) 53 vol.% van een waterige antigene fase die het geïnactiveerde virus bevat en (ii) 47 gew.vol.% van een olieachtige fase die het adjuvans bevat.
7. Vaccin volgens conclusies 3-6, met het kenmerk, dat het daarnaast een of meer celrespons versterkende stoffen (CRP) bevat die het celimmuuneffect versterken en die zijn gekozen uit: IL-1, IL-2, IL-4, IL-5,
- 20 IL-6, IL-12, g-IFN, celnecrosefactor.
8. Vaccin volgens één van de conclusies 3-7, met het kenmerk, dat het adjuvans een adjuvans is dat celrespons kan moduleren en immuno-stimuleren gekozen wordt uit MDP, ISCOM of liposomen.
9. Een bi- of multivalent vaccin dat in staat is varkensreproductie en respiratoir syndroom en één of meer andere varkensinfecties te voorkomen, dat een geschikte hoeveelheid PRRS viraal antigeen of virus van de
- 25 Spaanse stam volgens conclusie 1 of 2 dat geïnactiveerd is eventueel inclusief bestanddelen volgens één van de conclusies 3-8 omvat, met het kenmerk, dat het tevens een of meer varkenspathogenen omvat, geselecteerd uit: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *varkensparvovirus*, *Leptospira*, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *varkens-respiratiecoronavirus*, *Rotavirus*, of veroorzakers van de ziekte van Aujeszky zwijninfluenza of overdraag-
- 30 bare gastro-enteritis.
10. Werkwijze voor de bereiding van een vaccin volgens één van de conclusies 3-9, met het kenmerk, dat deze werkwijze de volgende stappen omvat:
 - 1) het kweken van het causatieve virus van PRRS, Spaanse stam volgens conclusie 1 of 2 in een geschikt celsysteem,
 - 35 2) het verzamelen van het virus uit het celsysteem na bereiken van een minimale titer van $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml,
 - 3) inactivatie van het virus door middel van fysische of chemische werkwijzen en
 - 4) het mengen van het geïnactiveerde virus met het adjuvans en het conserveermiddel.
11. Werkwijze volgens conclusie 10, met het kenmerk, dat het virus is gekweekt op
 - 40 i. kweek van alveolaire macrofagen van een varkenslong of op
 - ii. een co-kweek van alveolaire macrofagen van een varkenslong en ST-cellen (ATCCCRL 1746 ST) of op
 - iii. ST-celkweek (ATCCCRL 1746 ST), of op
 - iv. hybridecellen van alveolaire macrofagen van een varkenslong gefuseerd met ST-cellen (ATCC CRL
 - 45 1746 ST) of op
 - v. hybridecellen van alveolaire macrofagen van een varkenslong die met L-14-cellijn (ECACC no. 910123 17) of met cellijn Jag-1 zijn gefuseerd of op
 - vi. enige andere varkenscellijn met membraanreceptoren tegen het PRRS-virus van alveolaire macrofagen van de varkenslong.

Hierbij 11 bladen tekening

ORF3

ATG	GCT	CAT	CAG	TGT	GCA	CGC	TTC	CAT	TTT	TTC	CTC	TGT	AGC	TTC	ATC	48
Met	Ala	His	Gln	Cys	Ala	Arg	Phe	His	Phe	Phe	Leu	Cys	Ser	Phe	Ile	
1				5						10				15		
TGT	TAC	CTT	GTT	CAT	AGT	GCT	TTG	GCT	TCG	AAT	TCC	AAT	TCT	ACG	CTA	96
Cys	Tyr	Leu	Val	His	Ser	Ala	Leu	Ala	Ser	Asn	Ser	Asn	Ser	Thr	Leu	
			20					25					30			
TGT	TTT	TGG	TTT	CCA	TTG	GCC	CAC	GGC	AAC	ACA	TCA	TTC	GAG	CTA	ACC	144
Cys	Phe	Trp	Phe	Pro	Leu	Ala	His	Gly	Asn	Thr	Ser	Phe	Glu	Leu	Thr	
		35					40					45				
ATC	AAC	TAC	ACC	ATA	TGT	ATG	CCC	TGC	TCT	ACC	AGT	CAA	GCG	GCT	CAC	192
Ile	Asn	Tyr	Thr	Ile	Cys	Met	Pro	Cys	Ser	Thr	Ser	Gln	Ala	Ala	His	
	50					55					60					
CAA	AGA	CTC	GAG	CCC	GGT	CGT	AAC	ATG	TGG	TGC	AGA	ATA	GGG	CAC	GAC	240
Gln	Arg	Leu	Glu	Pro	Gly	Arg	Asn	Met	Trp	Cys	Arg	Ile	Gly	His	Asp	
65					70					75					80	
AGG	TGT	GAG	GAA	CGT	GAC	CAT	GAT	GAG	TTG	TCA	ATG	TCC	ATT	CCG	TCT	288
Arg	Cys	Glu	Glu	Arg	Asp	His	Asp	Glu	Leu	Ser	Met	Ser	Ile	Pro	Ser	
				85					90					95		
GGG	TAC	GAT	AAC	CTC	AAA	CTT	GAG	GGT	TAT	TAT	GCT	TGG	CTG	GCC	TTT	336
Gly	Tyr	Asp	Asn	Leu	Lys	Leu	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Trp	Leu	Ala	Phe	
			100					105					110			
TTG	TCC	TTT	TCC	TAC	GCG	GCC	CAA	TTC	CAT	CCG	GAG	TTG	TTC	GGA	ATA	384
Leu	Ser	Phe	Ser	Tyr	Ala	Ala	Gln	Phe	His	Phe	Glu	Leu	Phe	Gly	Ile	
		115					120					125				
GGA	AAC	GTG	TCG	CGC	GTC	TTC	GTG	GAC	AAG	CAA	CAC	CAG	TTC	ATT	TGC	432
Gly	Asn	Val	Ser	Arg	Val	Phe	Val	Asp	Lys	Gln	His	Gln	Phe	Ile	Cys	
	130					135					140					
GCC	GAG	CAT	GAT	GGA	CGA	AAT	TCA	ACC	ATA	TCT	ACC	GAA	TAT	AAC	ATC	480
Ala	Glu	His	Asp	Gly	Arg	Asn	Ser	Thr	Ile	Ser	Thr	Glu	Tyr	Asn	Ile	
145					150					155					160	
TCC	GCA	TTA	TAT	GCG	TCG	TAC	TAC	CAT	CAC	CAA	ATA	GAC	GGG	GGC	AAC	528
Ser	Ala	Leu	Tyr	Ala	Ser	Tyr	Tyr	His	His	Gln	Ile	Asp	Gly	Gly	Asn	
				165					170					175		
TGG	TTC	CAT	TTG	GTG	CTC	AAC	ATT	TCA	GAA	TGG	CTG	CGG	CCA	TTC	TTT	576
Trp	Phe	His	Leu	Glu	Trp	Leu	Arg	Pro	Phe	Phe	Ser	Ser	Trp	Leu	Val	
			180					185					190			
TCC	TCC	TGG	CTG	TGG	TTT	CTG	AGG	CGT	TCG	CCT	GTA	AGC	CCT	GTT	TCT	624
Leu	Asn	Ile	Ser	Trp	Phe	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Val	Ser	Pro	Val	Ser	
		195					200					205				

FIGURE 1

CGA	CGC	ATC	TAT	CAG	ATA	TTA	AGA	CCA	ACA	CGA	CCG	CGG	CTG	CCG	GTT	672
Arg	Arg	Ile	Tyr	Gln	Ile	Leu	Arg	Pro	Thr	Arg	Pro	Arg	Leu	Pro	Val	
210						215					220					
TCA	TGG	TCC	TTC	AGA	ACA	TCA	ATT	GTC	TCC	GAC	CTC	ACG	GGG	TCT	CAA	720
Ser	Trp	Ser	Phe	Arg	Thr	Ser	Ile	Val	Ser	Asp	Leu	Thr	Gly	Ser	Gln	
225					230					235					240	
CAG	CGC	AAG	AGA	ACA	TTT	CCT	TCG	GGA	AGC	CGT	CTC	AAT	GTG	GTG	AAG	768
Gln	Arg	Lys	Arg	Thr	Phe	Pro	Ser	Gly	Ser	Arg	Leu	Asn	Val	Val	Lys	
-				245					250					225		
CCG	TCG	GTA	TTC	CCC	AGT	ACA	TTA	CGA	TAA							798
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Ser	Thr	Leu	Arg	End							
			260					265								

FIGURE 1 (Veav.)

ORF 4

ATG	GCT	GCG	GCC	ATT	CTT	TTC	CTC	CTG	GCT	GGT	GCT	CAA	CAT	TTC	ATG	48
Met	Ala	Ala	Ala	Ile	Leu	Phe	Leu	Leu	Ala	Gly	Ala	Gln	His	Phe	Met	
1				5				10						15		
GTT	TCT	GAG	GCG	TTC	GCC	TGT	AAG	CCC	TGT	TTC	TCG	ACG	TAT	CTA	TCA	96
Val	Ser	Glu	Ala	Phe	Ala	Cys	Lys	Pro	Cys	Phe	Ser	Thr	His	Leu	Ser	
		20						25					30			
GAT	ATT	AAG	ACC	AAC	ACG	ACC	GCG	GCT	GCC	GGT	TTC	ATG	GTC	CTT	CAG	144
Asp	Ile	Lys	Thr	Asn	Thr	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Phe	Met	Val	Leu	Gln	
		35					40					45				
AAC	ATC	AAT	TGT	CTC	CGA	CCT	CAC	GGG	GTC	TCA	ACA	GCG	CAA	GAG	AAC	192
Asn	Ile	Asn	Cys	Leu	Arg	Pro	His	Gly	Val	Ser	Thr	Ala	Gln	Glu	Asn	
	50					55				60						
ATT	TCC	TTC	GGG	AAG	CCG	TCT	CAA	TGT	CGT	GAA	GCC	GTC	GGT	ATT	CCC	240
Ile	Ser	Phe	Gly	Lys	Pro	Ser	Gln	Cys	Arg	Glu	Ala	Val	Gly	Ile	Pro	
65					70					75					80	
CAG	TAC	ATT	ACG	ATA	ACG	GCT	AAT	GTG	ACC	GAT	GAA	TCG	TAT	TTG	TAC	288
Gln	Tyr	Ile	Thr	Ile	Thr	Ala	Asn	Val	Thr	Asp	Glu	Ser	Tyr	Leu	Tyr	
			85					90						95		
AAC	GCG	GAC	TTG	CTG	ATG	CTT	TCT	GCG	TGC	CTT	TTC	TAC	GCT	TCA	GAA	336
Asn	Ala	Asp	Leu	Leu	Met	Leu	Ser	Ala	Cys	Leu	Phe	Tyr	Ala	Ser	Glu	
			100					105					110			
ATG	AGC	GAA	AAA	GGC	TTC	AAA	GTT	ATC	TTT	GGG	AAC	GTC	TCT	GGC	GTT	384
Met	Ser	Glu	Lys	Gly	Phe	Lys	Val	Ile	Phe	Gly	Asn	Val	Ser	Gly	Val	
		115					120					125				
GTT	TCT	GCT	TGT	GTC	AAT	TTT	ACA	GAT	TAT	GTG	GCC	CAT	GTG	ACC	CAA	432
Val	Ser	Ala	Cys	Val	Asn	Phe	Thr	Asp	Tyr	Val	Ala	His	Val	Thr	Gln	
	130					135				140						
CAT	ACC	CAG	CAG	CAT	CAT	CTG	GTA	ATT	GAT	CAC	ATT	CGG	TTG	CTG	CAT	480
His	Thr	Gln	Gln	His	His	Leu	Val	Ile	Asp	His	Ile	Arg	Leu	Leu	His	
145					150					155					160	
TTC	TTG	ACA	CCA	TCT	ACA	ATG	AGG	TGG	GCT	ACA	ACC	ATT	GCT	TGT	TTG	528
Phe	Leu	Thr	Pro	Ser	Thr	Met	Arg	Trp	Ala	Thr	Thr	Ile	Ala	Cys	Leu	
			165					170						175		
TTC	GCC	ATT	CTC	TTG	GCG	ATA	TGA									552
Phe	Ala	Ile	Leu	Leu	Ala	Ile	End									
			180													

FIGURE 2

ORF 5

ATG	AGA	TGT	TCT	CAC	AAA	TTG	GGG	CGT	TTC	TTG	ACT	CCT	CAC	TCT	TGC	48
Met	Arg	Cys	Ser	His	Lys	Leu	Gly	Arg	Phe	Leu	Thr	Pro	His	Ser	Cys	
1				5					10					15		
TTC	TGG	TGG	CTT	TTT	TTG	CTG	TGT	ACC	GGC	TTG	TCC	TGG	TCC	TTT	GTC	96
Phe	Trp	Trp	Leu	Phe	Leu	Leu	Cys	Thr	Gly	Leu	Ser	Trp	Ser	Phe	Val	
			20					25					30			
GCT	GGC	GGC	AGC	AGC	TCG	ACA	TAC	CAA	TAC	ATA	TAT	AAC	TTA	ACG	ATA	144
Ala	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Thr	Tyr	Gln	Tyr	Ile	Tyr	Asn	Leu	Thr	Ile	
		35					40					45				
TGC	GAG	CTG	AAT	GGG	ACC	GAC	TGG	TTG	TCC	AAC	CAT	TTT	GAT	TGG	GCA	192
Cys	Glu	Leu	Asn	Gly	Thr	Asp	Trp	Leu	Ser	Asn	His	Phe	Asp	Trp	Ala	
	50					55					60					
GTC	GAG	ACC	TTT	GTG	CTT	TAC	CCG	GTT	GCC	ACT	CAT	ATC	CTC	TCA	CTG	240
Val	Glu	Thr	Phe	Val	Leu	Tyr	Pro	Val	Ala	Thr	His	Ile	Leu	Ser	Leu	
	65				70					75					80	
GGT	TTT	CTC	ACA	ACA	AGC	CAT	TTT	TTT	GAC	GCG	CTC	GGT	CTC	GGC	GCT	288
Gly	Phe	Leu	Thr	Thr	Ser	His	Phe	Phe	Asp	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Ala	
				85					90					95		
GTG	TCC	ACT	ATA	GGA	TTT	GTT	GGC	GGG	CGG	TAT	GTA	CTC	AGC	AGC	GTG	336
Val	Ser	Thr	Ile	Gly	Phe	Val	Gly	Gly	Arg	Tyr	Val	Leu	Ser	Ser	Val	
			100				105						110			
TAC	GGC	GCT	TGT	GCT	TTC	GCA	GCG	TTC	GTA	TGT	TTT	GTC	ATC	CGT	GCT	384
Tyr	Gly	Ala	Cys	Ala	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Cys	Phe	Val	Ile	Arg	Ala	
		115					120					125				
GTT	AAA	AAT	TGC	ATG	GCT	TGC	CGC	TAT	GCC	CAC	ACC	CGG	TTT	ACC	AAC	432
Val	Lys	Asn	Cys	Met	Ala	Cys	Arg	Tyr	Ala	His	Thr	Arg	Phe	Thr	Asn	
	130					135					140					
TTC	ATT	GTG	GAC	GAC	CGG	GGG	AGA	ATC	CAT	CGG	TGG	AAG	TCT	CCA	ATA	480
Phe	Ile	Val	Asp	Asp	Arg	Gly	Arg	Ile	His	Arg	Trp	Lys	Ser	Pro	Ile	
	145				150					155					160	
GTG	GTA	GAG	AAA	TTG	GGC	AAA	GCT	GAA	GTC	GGT	GGC	GAC	CTT	GTC	ACC	528
Val	Val	Glu	Lys	Leu	Gly	Lys	Ala	Glu	Val	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Thr	
				165					170					175		
ATC	AAA	CAT	GTC	GTC	CTC	GAA	GGG	GTT	AAA	GCT	CAA	CCC	TTG	ACG	AGG	576
Ile	Lys	His	Val	Val	Leu	Glu	Gly	Val	Lys	Ala	Gln	Pro	Leu	Thr	Arg	
			180					185					190			
ACT	TCG	GCT	GAG	CAA	TGG	GAA	GCC	TAG								603
Thr	Ser	Ala	Glu	Gln	Trp	Glu	Ala	End								
		195					200									

FIGURE 3

ORF 6

ATG	GGA	AGC	CTA	GAC	GAT	TTT	TGC	AAT	GAT	TCT	ACC	GCC	GCA	CAA	AAG	48
Met	Gly	Ser	Leu	Asp	Asp	Phe	Cys	Asn	Asp	Ser	Thr	Ala	Ala	Gln	Lys	
1				5					10					15		
CTT	GTG	CTA	GCC	TTT	AGC	ATT	ACA	TAT	ACA	CCT	ATA	ATG	ATA	TAC	GCC	96
Leu	Val	Leu	Ala	Phe	Ser	Ile	Thr	Tyr	Thr	Pro	Ile	Met	Ile	Tyr	Ala	
			20					25					30			
CTT	AAG	GTG	TCA	CGC	GGC	CGA	CTC	CTG	GGG	CTG	TTG	CAC	ATC	CTA	ATA	144
Leu	Lys	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	His	Ile	Leu	Ile	
		35					40					45				
TTC	CTG	AAT	TGT	TCT	TTC	ACA	TTC	GGA	TAC	ATG	ACA	TAT	GTG	CGT	TTT	192
Phe	Leu	Asn	Cys	Ser	Phe	Thr	Phe	Gly	Tyr	Met	Thr	Tyr	Val	Arg	Phe	
	50					55					60					
CAA	TCC	ACC	AAC	CGT	GTC	GCA	CTT	ACT	CTG	GGG	GCT	GTT	GTC	GCC	CTT	240
Gln	Ser	Thr	Asn	Arg	Val	Ala	Leu	Thr	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Leu	
	65				70					75					80	
CTG	TGG	GGT	GTT	TAC	AGC	TTC	ACA	GAG	TCA	TGG	AAG	TTT	GTT	ACT	TCC	288
Leu	Trp	Gly	Val	Tyr	Ser	Phe	Thr	Glu	Ser	Trp	Lys	Phe	Val	Thr	Ser	
				85					90					95		
AGA	TGC	AGA	TTG	TGT	TGC	CTA	GGC	CGG	CGA	TAC	ATT	CTG	GCC	CCT	GCC	336
Arg	Cys	Arg	Leu	Cys	Cys	Leu	Gly	Arg	Arg	Tyr	Ile	Leu	Ala	Pro	Ala	
			100					105					110			
CAT	CAC	GTA	GAA	AGT	GCT	GCA	GGT	CTC	CAT	TCA	ATC	CCA	GCG	TCT	GGT	384
His	His	Val	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	His	Ser	Ile	Pro	Ala	Ser	Gly	
		115					120					125				
AAC	CGA	GCA	TAC	GCT	GTG	AGA	AAG	CCC	GGA	CTA	ACA	TCA	GTG	AAC	GGC	432
Asn	Arg	Ala	Tyr	Ala	Val	Arg	Lys	Pro	Gly	Leu	Thr	Ser	Val	Asn	Gly	
	130					135					140					
ACT	CTA	GTT	CCA	GGA	CTT	CGG	AGC	CTC	GTG	CTG	GGC	GGC	AAA	CGA	GCT	480
Thr	Leu	Val	Pro	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Val	Leu	Gly	Gly	Lys	Arg	Ala	
	145				150					155					160	
GTT	AAA	CGA	GGA	GTG	GTT	AAC	CTC	GTC	AAG	TAT	GGC	CGG	TAA			522
Val	Lys	Arg	Gly	Val	Val	Asn	Leu	Val	Lys	Tyr	Gly	Arg	End			

165

170

FIGURE 4

ORF 7

ATG	GCC	GGT	AAA	AAC	CAG	AGC	CAG	AAG	AAA	AAG	AAA	AGT	GCA	GCT	CCG	48
Met	Ala	Gly	Lys	Asn	Gln	Ser	Gln	Lys	Lys	Lys	Lys	Ser	Ala	Ala	Pro	
1				5				10						15		
ATG	GGG	AAT	GGC	CAG	CCA	GTC	AAT	CAA	CTG	TGC	CAG	TTG	CTG	GGT	GCA	96
Met	Gly	Asn	Gly	Gln	Pro	Val	Asn	Gln	Leu	Cys	Gln	Leu	Leu	Gly	Ala	
			20					25					30			
ATG	ATA	AAG	TCC	CAG	CGC	CAG	CAA	CCT	AGG	GGA	GGA	CAG	GCC	AAA	AAG	144
Met	Ile	Lys	Ser	Gln	Arg	Gln	Gln	Pro	Arg	Gly	Gly	Gln	Ala	Lys	Lys	
		35					40					45				
AAA	AAG	CCT	GAG	AAG	CCA	CAT	TTT	CCC	TTA	GCT	GCT	GAA	GAT	GAC	ATC	192
Lys	Lys	Pro	Glu	Lys	Pro	His	Phe	Pro	Leu	Ala	Ala	Glu	Asp	Asp	Ile	
	50					55					60					
CGG	CAC	CAC	CTC	ACC	CAG	ACC	GAA	CGT	TCC	CTC	TGC	TTG	CAA	TCG	ATC	240
Arg	His	His	Leu	Thr	Gln	Thr	Glu	Arg	Ser	Leu	Cys	Leu	Gln	Ser	Ile	
	65				70				75						80	
CAG	ACG	GCT	TTT	AAT	CAA	GGC	GCA	GGA	ACT	GCG	TCG	CTT	TCA	TCC	AGC	288
Gln	Thr	Ala	Phe	Asn	Gln	Gly	Ala	Gly	Thr	Ala	Ser	Leu	Ser	Ser	Ser	
				85				90						95		
GGG	AAG	GTC	AGT	TTT	CAG	GTT	GAG	TTC	ATG	CTG	CCG	GTT	GCT	CAT	ACG	336
Gly	Lys	Val	Ser	Phe	Gln	Val	Glu	Phe	Met	Leu	Pro	Val	Ala	His	Thr	
			100				105					110				
GTG	CGC	CTG	ATT	CGC	GTG	ACT	TCT	ACA	TCC	GCC	AGT	CAG	GGT	GCA	AGC	384
Val	Arg	Leu	Ile	Arg	Val	Thr	Ser	Thr	Ser	Ala	Ser	Gln	Gly	Ala	Ser	
		115					120					125				
TAA																387
End																

FIGUUR 5

lelorf3
spdorf3

1	M	A	H	Q	C	A	R	F	H	F	F	L	C	G	F	I	C	Y	L	V
1	M	A	H	Q	C	A	R	F	H	F	F	L	C	S	F	I	C	Y	L	V
21	H	S	A	L	A	S	N	S	S	S	T	L	C	F	W	F	P	L	A	H
21	H	S	A	L	A	S	N	S	N	S	T	L	C	F	W	F	P	L	A	H
41	G	N	T	S	F	E	L	T	I	N	Y	T	I	C	M	P	C	S	T	S
41	G	N	T	S	F	E	L	T	I	N	Y	T	I	C	M	P	C	S	T	S
61	Q	A	A	R	Q	R	L	E	P	G	R	N	M	W	C	K	I	G	H	D
61	Q	A	A	H	Q	R	L	E	P	G	R	N	M	W	C	R	I	G	H	D
81	R	C	E	E	R	D	H	D	E	L	L	M	S	I	P	S	G	Y	D	N
81	R	C	E	E	R	D	H	D	E	L	S	M	S	I	P	S	G	Y	D	N
101	L	K	L	E	G	Y	Y	A	W	L	A	F	L	S	F	S	Y	A	A	Q
101	L	K	L	E	G	Y	Y	A	W	L	A	F	L	S	F	S	Y	A	A	Q
121	F	H	P	E	L	F	G	I	G	N	V	S	R	V	F	V	D	K	R	H
121	F	H	P	E	L	F	G	I	G	N	V	S	R	V	F	V	D	K	Q	H
141	Q	F	I	C	A	E	H	D	G	H	N	S	T	V	S	T	G	H	N	I
141	Q	F	I	C	A	E	H	D	G	R	N	S	T	I	S	T	E	Y	N	I
161	S	A	L	Y	A	A	Y	Y	H	H	Q	I	D	G	G	N	W	F	H	L
161	S	A	L	Y	A	S	Y	Y	H	H	Q	I	D	G	G	N	W	F	H	L
181	E	W	L	R	P	L	F	S	S	W	L	V	L	N	I	S	W	F	L	S
181	E	W	L	R	P	F	F	S	S	W	L	V	L	N	I	S	W	F	L	S
201	R	S	P	V	S	P	V	S	R	R	I	Y	Q	I	L	R	P	T	R	P
201	R	S	P	V	S	P	V	S	R	R	I	Y	Q	I	L	R	P	T	R	P
221	R	L	P	V	S	W	S	F	R	T	S	I	V	S	D	L	T	G	S	Q
221	R	L	P	V	S	W	S	F	R	T	S	I	V	S	D	L	T	G	S	Q
241	Q	R	K	R	K	F	P	S	E	S	R	P	N	V	V	K	P	S	V	L
241	Q	R	K	R	T	F	P	S	G	S	R	L	N	V	V	K	P	S	V	F
261	P	S	T	S	R	U														
261	P	S	T	L	R	U														

FIGURE 6

lelorf4
mpdorff4

1	M	A	A	A	T	L	F	F	L	A	G	A	Q	H	I	M	V	S	E	A
1	M	A	A	A	I	L	F	L	L	A	G	A	Q	H	F	M	V	S	E	A
21	F	A	C	K	P	C	F	S	T	H	L	S	D	I	E	T	N	T	T	A
21	F	A	C	K	P	C	F	S	T	H	L	S	D	I	K	T	N	T	T	A
41	A	A	G	F	M	V	L	Q	D	I	N	C	F	R	P	H	G	V	S	A
41	A	A	G	F	M	V	L	Q	N	I	N	C	L	R	P	H	G	V	S	T
61	A	Q	E	K	I	S	F	G	K	S	S	Q	C	R	E	A	V	G	T	P
61	A	Q	E	N	I	S	F	G	K	P	S	Q	C	R	E	A	V	G	I	P
81	Q	Y	I	T	I	T	A	N	V	T	D	E	S	Y	L	Y	N	A	D	L
81	Q	Y	I	T	I	T	A	N	V	T	D	E	S	Y	L	Y	N	A	D	L
101	L	M	L	S	A	C	L	F	Y	A	S	E	M	S	E	K	G	F	K	V
101	L	M	L	S	A	C	L	F	Y	A	S	E	M	S	E	K	G	F	K	V
121	I	F	G	N	V	S	G	V	V	S	A	C	V	N	F	T	D	Y	V	A
121	I	F	G	N	V	S	G	V	V	S	A	C	V	N	F	T	D	Y	V	A
141	H	V	T	Q	H	T	Q	Q	H	H	L	V	I	D	H	I	R	L	L	H
141	H	V	T	Q	H	T	Q	Q	H	H	L	V	I	D	H	I	R	L	L	H
161	F	L	T	P	S	A	M	R	W	A	T	T	I	A	C	L	F	A	I	L
161	F	L	T	P	S	T	M	R	W	A	T	T	I	A	C	L	F	A	I	L
181	L	A	I	U																
181	L	A	I	U																

FIGURE 7

lelorf5
mpdorif5

1	M	R	C	S	H	K	L	G	R	F	L	T	P	H	S	C	F	W	W	L
1	M	R	C	S	H	K	L	G	R	F	L	T	P	H	S	C	F	W	W	L
21	F	L	L	C	T	G	L	S	W	S	F	A	D	G	N	G	D	S	S	T
21	F	L	L	C	T	G	L	S	W	S	F	V	A	G		G	S	S	S	T
41	Y	Q	Y	I	Y	N	L	T	I	C	E	L	N	G	T	D	W	L	S	S
40	Y	Q	Y	I	Y	N	L	T	I	C	E	L	N	G	T	D	W	L	S	N
61	H	F	G	W	A	V	E	T	F	V	L	Y	P	V	A	T	H	I	L	S
60	H	F	D	W	A	V	E	T	F	V	L	Y	P	V	A	T	H	I	L	S
81	L	G	F	L	T	T	S	H	F	F	D	A	L	G	L	G	A	V	S	T
80	L	G	F	L	T	T	S	H	F	F	D	A	L	G	L	G	A	V	S	T
101	A	G	F	V	G	G	R	Y	V	L	C	S	V	Y	G	A	C	A	F	A
100	I	G	F	V	G	G	R	Y	V	L	S	S	V	Y	G	A	C	A	F	A
121	A	F	V	C	F	V	I	R	A	A	K	N	C	M	A	C	R	Y	A	R
120	A	F	V	C	F	V	I	R	A	V	K	N	C	M	A	C	R	Y	A	H
141	T	R	F	T	N	F	I	V	D	D	R	G	R	V	H	R	W	K	S	P
140	T	R	F	T	N	F	I	V	D	D	R	G	R	I	H	R	W	K	S	P
161	I	V	V	E	K	L	G	K	A	E	V	D	G	N	L	V	T	I	K	H
160	I	V	V	E	K	L	G	K	A	E	V	G	G	D	L	V	T	I	K	H
181	V	V	L	E	G	V	K	A	Q	P	L	T	R	T	S	A	E	Q	W	E
180	V	V	L	E	G	V	K	A	Q	P	L	T	R	T	S	A	E	Q	W	E
201	A	U																		
200	A	U																		

FIGURE 8

lelorf6
mpdor6

1	M	G	G	L	D	D	F	C	N	D	P	I	A	A	Q	K	L	V	L	A
1	M	G	S	L	D	D	F	C	N	D	S	T	A	A	Q	K	L	V	L	A
21	F	S	I	T	Y	T	P	I	M	I	Y	A	L	K	V	S	R	G	R	L
21	F	S	I	T	Y	T	P	I	M	I	Y	A	L	K	V	S	R	G	R	L
41	L	G	L	L	H	I	L	I	F	L	N	C	S	F	T	F	G	Y	M	T
41	L	G	L	L	H	I	L	I	F	L	N	C	S	F	T	F	G	Y	M	T
61	Y	V	H	F	Q	S	T	N	R	V	A	L	T	L	G	A	V	V	A	L
61	Y	V	R	F	Q	S	T	N	R	V	A	L	T	L	G	A	V	V	A	L
81	L	W	G	V	Y	S	F	T	E	S	W	K	F	I	T	S	R	C	R	L
81	L	W	G	V	Y	S	F	T	E	S	W	K	F	V	T	S	R	C	R	L
101	C	C	L	G	R	R	Y	I	L	A	P	A	H	H	V	E	S	A	A	G
101	C	C	L	G	R	R	Y	I	L	A	P	A	H	H	V	E	S	A	A	G
121	L	H	S	I	S	A	S	G	N	R	A	Y	A	V	R	K	P	G	L	T
121	L	H	S	I	P	A	S	G	N	R	A	Y	A	V	R	K	P	G	L	T
141	S	V	N	G	T	L	V	P	G	L	R	S	L	V	L	G	G	K	R	A
141	S	V	N	G	T	L	V	P	G	L	R	S	L	V	L	G	G	K	R	A
161	V	K	R	G	V	V	N	L	V	E	Y	G	R	U						
161	V	K	R	G	V	V	N	L	V	E	Y	G	R	U						

FIGURE 9

ielorf7
mpdorf7

1	M	A	G	K	N	Q	S	Q	K	K	K	K	S	T	A	P	M	G	N	G	
1	M	A	G	K	N	Q	S	Q	K	K	K	K	S	A	A	P	M	G	N	G	
21	Q	P	V	N	Q	L	C	Q	L	L	G	A	M	I	K	S	Q	R	Q	Q	
21	Q	P	V	N	Q	L	C	Q	L	L	G	A	M	I	K	S	Q	R	Q	Q	
41	P	R	G	G	Q	A	K	K	K	K	P	E	K	P	H	F	P	L	A	A	
41	P	R	G	G	Q	A	K	K	K	K	P	E	K	P	H	F	P	L	A	A	
61	E	D	D	I	R	H	H	L	T	Q	T	E	R	S	L	C	L	Q	S	I	
61	E	D	D	I	R	H	H	L	T	Q	T	E	R	S	L	C	L	Q	S	I	
81	Q	T	A	F	N	Q	G	A	G	T	A	S	L	S	S	S	S	G	K	V	S
81	Q	T	A	F	N	Q	G	A	G	T	A	S	L	S	S	S	S	G	K	V	S
101	F	Q	V	E	F	M	L	P	V	A	H	T	V	R	L	I	R	V	T	S	
101	F	Q	V	E	F	M	L	P	V	A	H	T	V	R	L	I	R	V	T	S	
121	T	S	A	S	Q	G	A	S	U												
121	T	S	A	S	Q	G	A	S	U												

FIGURE 10