



(45) 공고일자 2023년 11월 15일
(11) 등록번호 10-2602018
(24) 등록일자 2023년 11월 09일

- 1 -

현시키고, 그리고 이때 이러한 바이러스로부터 준비된 백신은 안전하고, 효과적이며, 그리고 출생후 1일과 같이 일반적으로 조기에 돼지의 젖떼기전 단일 투여량의 백신접종을 허용한다.

(52) CPC특허분류

A61K 2039/5254 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

A61K 2039/552 (2013.01)

C12N 2770/10034 (2013.01)

C12N 2770/10052 (2013.01)

C12N 2770/10064 (2013.01)

(72) 발명자

포트, 마리아

미국 07054 뉴저지주 파시파니 실반 웨이 10 조에
티스 서비스즈 엘엘씨 내

피어스, 더글라스, 에스.

미국 49007 미시간주 캘러머주 포티지 스트리트
333 조에티스 서비스즈 엘엘씨 내

키스, 마샤, 엘.

미국 49007 미시간주 캘러머주 포티지 스트리트
333 조에티스 서비스즈 엘엘씨 내

명세서

청구범위

청구항 1

돼지 동물을 돼지 생식 및 호흡기 증후군(PRRS) 바이러스에 의한 감염으로부터 보호하기 위한 백신이며, 상기 백신은

(a) 서열 번호: 5의 폴리뉴클레오티드 분자 또는 서열 번호: 5에 대하여 최소한 95% 동일한 폴리뉴클레오티드 분자에 의해 인코딩되는 유럽 PRRS 바이러스이며, 여기서 상기 바이러스는 돼지 동물에 이 백신을 투여하기 전, 돼지 세포, 또는 돼지 CD163 수용체를 발현하는 비-돼지 포유류 세포에서 자라도록 적응된 것인 바이러스; (b) 상기 인코딩 폴리뉴클레오티드 분자; (c) 플라스미드 형태의 상기 폴리뉴클레오티드 분자; 또는 (d) 상기 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 바이러스 벡터

를 상기 감염에 대항하여 면역보호를 만드는데 효과적인 양으로, 그리고 수의학적 용도로 적합한 운반체를 포함하고,

새끼 돼지가 1일령 또는 그 미만일 때 안전한 백신접종을 제공하고, 최대 6개월의 면역 지속을 제공하며,

폴리뉴클레오티드 분자는,

ORF1a 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 19에서 S 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 24에서 Y 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 156에서 A 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 157에서 Y 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 268에서 D 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 294에서 H 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 416에서 Y 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 742에서 S 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 884에서 L 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 908에서 P 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 916에서 K 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 977에서 K 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 1138에서 S 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 1160에서 F 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 1500에서 S 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 2094에서 R 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 2254에서 P 또는 이의 보존적 치환; 및 아미노산 위치 2290에서 L 또는 이의 보존적 치환;

ORF1b 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 567에서 S 또는 이의 보존적 치환; 및 아미노산 위치 912에서 H 또는 이의 보존적 치환;

ORF2a 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 22에서 L 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 88에서 F 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 94에서 M 또는 이의 보존적 치환; 및 아미노산 위치 95에서 F 또는 이의 보존적 치환;

ORF2b 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 47에서 L 또는 이의 보존적 치환;

ORF3 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 52에서 S 또는 이의 보존적 치환;

ORF4 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 151에서 T 또는 이의 보존적 치환;

ORF5 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 20에서 F 또는 이의 보존적 치환; 및 아미노산 위치 37에서 D 또는 이의 보존적 치환; 및

ORF5a 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 18에서 V 또는 이의 보존적 치환; 및 아미노산 위치 35에서 R 또는 이의 보존적 치환

을 포함하는 유럽 PRRS를 인코딩하는 것인,

백신.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 8-12 시령(hours old)의 새끼 돼지에게 투여될 때 감염에 대한 보호를 제공하는 백신.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 백신접종 후 2주 시점에 면역 개시가 제공되는 백신.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 백신접종 후 24-28일 시점에 면역 개시가 제공되는 백신.

청구항 5

유럽 돼지 생식 및 호흡기 증후군(PRRS) 바이러스에 의한 감염에 대해 돼지 동물에게 백신접종하는 방법이며, 상기 방법은 출생 12시간 후와 3주령 사이에 상기 동물이 젖떼기 전에 상기 백신을 투여하는 것을 포함하고, 상기 백신은,

(a) 서열 번호: 5의 폴리뉴클레오티드 분자 또는 서열 번호: 5에 대하여 최소한 95% 동일한 폴리뉴클레오티드 분자에 의해 인코딩되는 유럽 PRRS 바이러스를 인코딩하는 감염성 RNA 분자를 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자;

(b) (a)에 따른 유럽 PRRS 바이러스를 인코딩하는 감염성 RNA 분자;

(c) 플라스미드 형태의 상기 폴리뉴클레오티드 분자(a);

(d) 감염성 RNA 분자(b)를 포함하는 바이러스 벡터; 또는

(e) 서열 번호: 5의 폴리뉴클레오티드 분자 또는 서열 번호: 5에 대하여 최소한 95% 동일한 폴리뉴클레오티드 분자에 의해 인코딩되는 유럽 PRRS 바이러스를 포함하고,

상기 백신 바이러스는 돼지 동물에 이 백신을 투여하기 전, 돼지 세포, 또는 돼지 CD163 수용체를 발현하는 비-돼지 포유류 세포에서 자라도록 적응된 것이며,

폴리뉴클레오티드 분자는,

ORF1a 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 19에서 S 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 24에서 Y 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 156에서 A 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 157에서 Y 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 268에서 D 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 294에서 H 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 416에서 Y 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 742에서 S 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 884에서 L 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 908에서 P 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 916에서 K 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 977에서 K 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 1138에서 S 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 1160에서 F 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 1500에서 S 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 2094에서 R 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 2254에서 P 또는 이의 보존적 치환; 및 아미노산 위치 2290에서 L 또는 이의 보존적 치환;

ORF1b 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 567에서 S 또는 이의 보존적 치환; 및 아미노산 위치 912에서 H 또는 이의 보존적 치환;

ORF2a 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 22에서 L 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 88에서 F 또는 이의 보존적 치환; 아미노산 위치 94에서 M 또는 이의 보존적 치환; 및 아미노산 위치 95에서 F 또는 이의 보존적 치환;

ORF2b 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 47에서 L 또는 이의 보존적 치환;

ORF3 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 52에서 S 또는 이의 보존적 치환;

ORF4 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 151에서 T 또는 이의 보존적 치환;

ORF5 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 20에서 F 또는 이의 보존적 치환; 및 아미노산 위치 37에서 D 또는 이의 보존적 치환; 및

ORF5a 아미노산 서열에서, 아미노산 위치 18에서 V 또는 이의 보존적 치환; 및 아미노산 위치 35에서 R 또는 이의 보존적 치환

을 포함하는 유럽 PRRS를 인코딩하는 것인,

방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 보호성 면역이 백신접종 후 늦어도 28일 이전에 발생되는 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 제공되는 보호성 면역 기간은 최대 6개월인 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 폴리뉴클레오티드 분자가 서열 번호: 5에 대하여 최소한 99% 동일한 것인 백신.

청구항 9

청구항 5에 있어서, 폴리뉴클레오티드 분자가 서열 번호: 5에 대하여 최소한 99% 동일한 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 발명의 분야

[0002] 본 발명은 유럽의 돼지 생식 및 호흡기 증후군 (PRRS) 균주 바이러스에 대해 모든 연령대의 암컷 및 수컷 돼지를 보호하는 백신을 제공한다. 본 발명은 특히, 출생 직후 (즉, 단지 약 1 일 또는 그 미만)부터 3 주령까지, 이가(bivalent) PRRSV/*미코플라스마 히오뉴모니에(mycoplasma hyopneumoniae)* (*M.hyo*) 백신, 이가(bivalent) PRRSV/돼지 씨르코바이러스 유형 2 (PCV2) 백신, 그리고 삼가(trivalent) PRRSV/*M.hyo*/PCV2 백신, 또는 단순히 단가(monovalent) PRRSV 백신과 같이, 임의로 다가 조합 돼지 백신과 조합하여, 젖떼기 전에 새끼 돼지의 안전한 그리고 조기 백신접종을 제공하는데, 이때 상기 PRRS 백신 성분은 일반적으로 유럽 대륙에서 서유럽, 지중해 지역, 스칸디나비아 지역 및 러시아, 터키 및 우크라이나와 같은 동유럽을 포함하여 순환하는 것으로 인식되는 그의 유전자형 (및 상기 유전자형의 하위 유형)에 해당한다.

[0003] 본 발명은 개조된 살아있는 형태의 백신으로서 가장 어린 동물에게조차도 현저하게 안전하고 효과적이며, 매우 긴 면역 기간을 제공하는 약학적으로 감쇠된 유럽 PRRS 균주의 새로운 부류에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 발명의 배경

[0005] 돼지 생식기 및 호흡기 증후군 (PRRS)은 암태지 및 어린암태지에서 유산, 사산 및 다른 생식기 문제 뿐만 아니라 어린 돼지의 호흡기 질환이 특징이다. 원인 병원체는 아르테비리데(*Arteriviridae*) 패밀리 및 니도비랄레스(*Nidovirales*.) 목(order)의 구성원인 PRRS 바이러스 (PRRSV)이다. 상기 니도바이러스는 양성 극성 RNA의 단일 가닥으로 구성된 게놈을 갖는 외피형 바이러스다. 양성-가닥으로된 RNA 바이러스의 게놈 RNA는 유전 정보의 저장과 발현 모두에서 이중 역할을 수행한다. 니도바이러스에서 복제 또는 전사에 관여하는 DNA는 없다. 비-구조 단백질은 큰 폴리프로테인 (polyproteins)으로서의 니도바이러스의 게놈 RNA로부터 직접 해독되고, 이어서 바이러스성 프로테아제에 의해 분리된 기능성 단백질로 절단된다. 서브게놈 RNA (sgRNAs)의 3'-공유 (coterminal) 내포 세트가 게놈으로부터 합성되어, 상기 구조 단백질의 해독을 위한 메신저 RNA로 사용된다. 따라서 니도바이러스 게놈 RNA의 복제는 게놈 복제와 sgRNA 합성의 결합된 과정이다.

[0006] 1980년대 후반에 바이러스의 두 가지 별개의 유전자형이 북미와 유럽에서 각 하나씩 거의 동시에 나타났다. PRRS 바이러스는 현재 거의 모든 돼지 생산 국가에서 발병하고 있으며, 세계적인 돼지 산업에 영향을 미치는 경제적으로 가장 중요한 질병 중 하나로 간주된다. 또한, 매우 독성이 강한 유전자형이 중국과 주변 국가에서 분리되어 왔으며, 이러한 유전형은 일반적으로 북미 유전형과 밀접하게 관련되어 있다.

[0007] PRRSV의 생물학을 이해하는데 있어서 상당한 발전이 있었음에도 불구하고, 바이러스의 통제는 여전히 어려운 상태이다. 현장에서 동물의 백신접종은 크게 효과가 없는 것으로 입증되었다. PRRS는 일반적으로 면역화된 무리에서 다시 출현하며, 대부분의 농장 PRRSV 백신접종 캠페인은 궁극적으로 질병을 통제하지 못한다.

- [0008] 이론에 국한되지 않고, 야생형 PRRSV로 돼지를 감염시키거나 이 약제의 약독화 형태로 백신을 접종하면 유감스럽게도 비-중화 항체만 풍부하게 생산된다. 이 시간 간격 동안, 예를 들어, 제한된 양의 인터페론 (IFN)- γ 분비 세포만 생성된다. 따라서, PRRSV는 일관되게 풍부한 체액성 (항체-기반) 면역 및 가변적이고 제한적이지만 잠재적으로 보호적인 T 헬퍼 (Th) 1-유사 IFN- γ 반응에 의해 구별되는 불균형 면역 반응을 본질적으로 자극하는 것으로 보인다. 적응 면역의 불균형 발달에 가장 기여할 것 같은 PRRSV 감염의 한 특징은 적절한 선천적인 면역 반응의 부족이다. 일반적으로 바이러스에 감염된 세포는 감염으로부터 이웃 세포를 보호하는 I 유형 인터페론 "IFN"(IFN- α 및 IFN- β 를 포함한)을 분비한다. 또한, 방출된 I 유형 IFN은 바이러스 특이적 제 2 형 IFN (IFN- γ) 분비 세포로의 전환을 촉진시키기 위해 순수(naïve) T 세포의 서브 세트와 상호 작용한다. 대조적으로, PRRSV 노출에 대한 돼지의 IFN- α 반응은 거의 존재하지 않는다. 병원균에 의한 IFN- α 생산의 비효율적인 자극은 IFN- α 가 IFN- γ 유전자 발현을 상향 조절하기 때문에, 숙주의 적응 면역 반응의 특성에 중요한 영향을 줄 것으로 예상된다. 따라서, 이전의 사이토킨은 적응성 면역, 즉, T 세포-매개 IFN- γ 반응의 발달을 촉진시키고, 항 바이러스성 면역 방어를 절정에 이르게 하는 주요 경로를 조절할 가능성이 있다.
- [0009] 이와 관련하여, 바이러스 감염에서 선천성 면역과 적응 면역 사이의 가능한 연관성이 다량의 유형 I 인터페론을 생산하는 능력을 갖고, T-세포 기능의 극성화(polarization)에 중요한 역할을 하는 특수 유형의 수지상 세포를 통해 발생한다는 것이 명백해졌다. 구체적으로, 드물지만 현저한 유형의 수지상 세포인 플라스마시토이드 수지상 세포 (PDC) (천연 IFN- α/β -생성 세포라고도 함)은 순수 T 세포가 IFN- γ 분비 세포로 분화되게 하는 능력으로써 항-바이러스성 면역에 중요한 역할을 한다. 드물지만, PDC는 IFN- α 의 매우 강력한 생산자이며, 각 세포는 바이러스에 반응하여 3-10pg의 IFN- α 를 생산할 수 있다. 대조적으로, 단핵세포는 세포 당 기준으로 5 내지 10 배 적은 IFN- α 를 생성한다. 돼지 PDC의 표현형과 생물학적 특성이 기술되어 있다. (Summerfield 외, 2003, Immunology 110:440). 최근 연구에 따르면 PRRSV는 돼지 PDCs가 IFN- α 를 분비하도록 자극하지 않는다는 것이다 (Calzada 외, 2010, Veterinary Immunology and Immunopathology 135:20).
- [0010] 백신접종 당시 외인적으로 IFN- α 를 첨가한 관찰과 병행하여, 이 사실은 PRRSV 특이적-IFN- γ 반응의 강도를 향상시키는 것으로 밝혀졌고(W.A. Meier 외, Vet. Immunol. Immunopath. 102, pp 299-314, 2004), 돼지가 이 바이러스에 감염되는 동안 IFN- α 가 하는 중요한 역할을 강조한다. 방어 면역의 발달에 대한 IFN- α 의 명백한 결정적인 역할을 감안할 때, IFN- α 의 생산을 자극 및/또는 억제하는 상이한 PRRS 바이러스 스톡의 능력을 결정하는 것이 중요하다. 따라서, PRRS로부터 보호하기 위한 새롭고 개선된 그리고 개량된 생백신에 대한 절실한 필요성이 있다.
- [0011] 유럽 PRRS는 관련이 먼 북미 또는 "유형 2" PRRS와 구별하기 위해 일반적으로 '유형 1'로 명명되며, 두 가지 유형은 전체 뉴클레오타이드 수준에서 단지 약 60% 만 동일하다. 첫 번째로 명확하게 정의된 유럽 PRRSV 분리 군주는 Wensvoort 외에 의해 개제된 Lelystad 제제이다(Institut Pasteur 분리주 1102, 그리고 U.S. 특허 5,620,691 및 6,197,310 그리고 이들의 국제 대응부). 유럽 PRRS의 다양한 아형 (이들 모두는 본 발명의 모든 측면에 대해 보호될 수 있음)이 M. P. Murtaugh 외, Virus Research, Vol 154, pp. 18-30, 2010; 및 M. Shi 외, Virus Research, vol 154 pp. 7-17, 2010에서 더 상세되고 있다. 초기 북미 PRRS 분리물은 미국 특허 제 5,476,778 호 및 제 5,840,563 호에 개시되어 있다.
- [0012] 본 발명자들은 가장 어린 동물에게 투여될 때, 안전하고 효과적인 것으로 증명된 감쇄된 형태의 유럽 PRRS 균주를 제공할 수 있음을 발견하였으며, 현재 이용 가능한 많은 다른 PRRS 백신과는 달리, 앞서 언급한 것과 같이 동물의 면역 반응 메커니즘의 여러 측면을 억제하지 않아 안전성과 효능에 한층 더 기여한다. 당업계에 잘 공지된 바와 같이, PRRS 바이러스를 배양하는 것이 매우 어렵다는 것이 판명되었다. 역사적으로, 원숭이 신장 세포주 MA-104 및 그 유도체는 상업적으로 변형된 PRRSV 생(live)백신의 증식 및 감쇠에 거의 독점적으로 사용되었지만, 이러한 세포가 이러한 목적으로 사용 가능한 이유는 알려져 있지 않다 (U.S. 특허 5,476,778 참고).
- [0013] 포유류 세포 표면 단백질 "CD163"은 PRRS 바이러스가 포유 동물 세포에 도입되는데 자연적으로 이용된다는 발견 (예를 들어, 미국 특허 제 9,102,912 호 참조)은 새로운 PRRSV-허용 세포주의 개발을 허용했다. 놀랍게도, 이 새로운 세포주에서의 감쇠는 기존 백신과 다른 특성을 가진 백신 바이러스를 산출한다(U.S. 특허 9,566,324 및 U.S. 출원 공개 2013-0309263).
- [0014] 따라서, 돼지 CD163 수용체를 통합한 (1) 돼지 세포 또는 (2) 비-돼지 세포 상에서 배양되도록 적응된 유럽 PRRS 바이러스 (U. S. 특허 7,754,464 참고)는 전통적인 방법에 의해 배양된 백신 바이러스에 의해 제공되는 것보다 돼지 동물에 더 의미있는 안전하고 효과적인 프로파일을 보유하고, 어린 나이에 백신접종으로도 보호성 면역을 얻을 수 있다는 놀라운 발견을 하였다. 원숭이 신장 세포주 MA-104 (헤모글로블린 소거 기능과 관련된

가능성이 있는 원숭이 CD163을 이상하게도 발현시키고, 그리고 이때 전술한 원숭이 CD163은 돼지 CD163에 대하여 단지 약 85% 만 동일함)에서 배양되도록 PRRS의 통상적인 적응으로 항상 생물학적으로 관련성이 낮고 최적이지 아닌(non optimal), 안전성/효능 프로필을 제공하는 것으로 보인다. 돼지 CD163의 대표적인 예는 U.S. 특허 7,754,464, 및 이의 관련된 패밀리 군, U.S 특허 8,058,050; 8,486,685; 및 9,102,912 (예를 들면, 그 안에 서열 번호:14 및 서열 번호:2)에 기술된다. 이 특허 군에 더 기술된 바와 같이, 본 발명의 실시예 적용 가능할 때, CD163 폴리펩티드가 막에 앵커링을 위한 막 횡단 도메인을 가지고, 그 표면 노출 도메인을 발현하는 한, 재조합 발현세포는 전장 CD163을 발현할 필요는 없으며, 따라서 C-말단 도메인은 부재하거나 감소될 수 있다.

[0015] 추가적으로, 본 발명의 백신은 숙주 인터페론 반응을 하향 조절하지 않을 것으로 예상되는 반면, 선행기술의 백신, 이를 태면, 원숭이 세포(수용체로써 원숭이 CD163 만을 제공)에서 배양되도록 적응된 Ingelvac MLV(US 5,476,778 및 5,846,805 참고)는 숙주 IFN-알파 반응 상에서 강력학 억제 효과를 일반적으로 보여준다 (U.S. 9,566,324의 전반적으로 실시예 5, 그리고 도 4 참고).

[0016] PRRS 바이러스는 일반적으로 가장 어린 동물에서 가장 심한 증상을 나타내며, 단지 태어난지 하루된 새끼 돼지에게 안전하고 효과적인 백신접종을 제공할 수 있고, 예를 들면, 어린 새끼 돼지의 사망률을 낮추는 것뿐만 아니라, 젖먹 후 가능한 한 초기에 시설 간의 동물 이동을 허용함으로써, 축산 업계에 실질적으로 기여한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 양태는 현재의 유럽 원숭이 세포-기반 백신이 적합한 돼지 세포(예를 들면, 하기 PK-9 세포에 대한 논의 참고) 또는 돼지 CD163을 발현시키는 비-돼지 세포에서 자라도록 기저(underlying) 바이러스를 재적응시킴으로써 개선될 수 있고, 그리고 훨씬 어린 나이에 안전하고 오래 지속되는 면역 반응을 이끌어 낼 수 있다. 따라서, 원숭이 세포에서 제조된 전통적인 백신과 관련된 전형적인 안전성 및 효능 요건(가령, 그러한 백신은 약 3 주령 또는 그 이후에만 제공된다)은 피할 수 있으며, 개선된 성과와 또한 생후 1일제와 같은 초기에도 효과를 얻을 수 있다. 따라서, PRRSV의 광범위한 유형, 아형 및 균주가 주어지면, 본 발명의 방법은 또한 기존 PRRS 다수의 백신의 현재 관련성 및 효과를 개선시키는데 사용될 수 있다.

[0018] 젖먹기 전 투여될 때 유형 2 (북미) PRRS 백신은 북아메리카/아시아의 PRRS 계통에 대해 안전하고 효과적일 수 있다(예를 들면, WO2013/173443의 실시예 9 및 10), 특히 북미 PRRS 바이러스의 "P129 균주"의 감쇠 관련 (예를 들면, 이의 서열 번호:6 참고, 그리고 PCT/IB2011/055003 및 US 6,500,662 참고). 그러나, 유럽 및 북미 PRRS 바이러스는 뉴클레오티드 수준에서 약 60%만 동일하며, 상이한 부류(나이, 성별 및 이와 유사한 것들)의 동물에서 보이는 병리학 유형에 관해서는 다소 다른 방식으로 행동한다.

[0019] 여기서, 우리는 백신으로서 탁월한 성질을 갖는 유전자형 1 (유럽) PRRSV 균주를 감쇠시키고, 선택하기 위하여 돼지 CD163-발현 세포주의 사용을 기술한다.

[0020] 발명의 요약

[0021] 제 1 구체예에서, 본 발명은 백신으로서 돼지 동물에서 PRRS 바이러스에 대한 효과적인 면역보호 반응을 유도하도록 유전적으로 변형된 PRRS 바이러스를 인코딩하는 감염성 RNA 분자를 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 특정 측면에서, 본 발명은 서열 번호:5를 포함하는 본원에서 제시된 DNA 서열을 제공한다. 하기에 설명된 바와 같이, 다른 또는 전구체 균주와 전술한 분리주를 구별할 수 있는 다양한 주요 돌연변이를 제공한다면, 본 발명의 실행에 있어서 서열 번호:5에 대하여 최소한 80% 동일한 (더욱 바람직하게는 이에 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는) 서열을 인코딩하는 것도 사용가능하다.

[0022] 본 발명의 추가 구체예는 전술한 DNA 폴리뉴클레오티드에 대응하는 RNA 서열, 그리고 이로부터 발현될 수 있는 것들, 그리고 이러한 발현으로부터 어셈블리될 수 있는 실제 바이러스를 포함한다. 본 발명의 실시에서 유용한 추가로 감쇠된 유럽 PRRS 바이러스는 65°C에서 0.5 M NaHPo₄, 7% SDS, 1mM EDTA에 필터 결합된 DNA에 혼성화시키고, 그리고 68°C에서 0.1 SSC/0/1%SDS에서 세척하는 것을 포함하는, 매우 엄격한 조건하에 서열 번호:5의 DNA 서열의 보체에 혼성화되는 DNA 서열에 의해 인코딩된 것을 포함한다.

[0023] 본 발명의 목적을 위해, "상응하는"이란 상대 서열이 Henikoff 외.Proc Natl. Acad. Sci., USA, 89, pp. 10915-10919, 1992에 기재된 BLOSUM 알고리즘을 사용하여 최적으로 정렬될 수 있음을 의미한다.

[0024] 특정 구체예에서, 본 발명은 본원에서 제시하는 바와 같은 단리된 폴리뉴클레오티드 분자와 적합한 숙주 세포 안에서 상기 폴리뉴클레오티드 분자를 전사시킬 수 있는 프로모터를 포함하는 플라스미드를 제공한다. 또다른 구체예에서, 본원의 플라스미드의 유럽 PRRS 인코딩 서열은 하나 또는 그 이상의 탐지가능한 이중성(heterologous) 항원 에피토프를 더 인코딩한다. 본 발명은 본원에서 제시된 플라스미드를 포함하는 형질감염

된 숙주 세포를 제공한다.

- [0025] 또다른 측면에서, 본 발명은 PRRS 바이러스에 의한 감염으로부터 돼지 동물을 보호하는 백신을 제공한다. 상기 백신은 감염성 RNA 분자에 의해 인코딩된 유럽 PRRS 바이러스, 상기 감염성 RNA 분자를 포함할 수 있으며, 이들 각각은 본원에서 제시된 바와 같은 단리된 폴리뉴클레오티드 분자에 의해 인코딩된다. 여전히 또다른 측면에서, 상기 백신은 플라스미드 또는 본원의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터를 포함한다. 본원에서 제시된 바와 같은 백신은 수의학적 용도로 허용되는 백신 운반체를 임의로 포함할 수 있다. 하나의 중요한 측면에서, 상기 백신은 야생형 유럽 바이러스 및 다른 이용가능한 백신과 비교하였을 때, 감소된 인터페론- α 억제 효과를 보유한다.
- [0026] 하나의 구체예에서, 본 발명은 PRRS 바이러스의 필드 계통에 자연적으로 감염된 돼지 동물과 본원에 기재된 변형된 생 백신으로 백신접종된 돼지 동물을 구별하는 (소위 DIVA 테스트) 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 진단 키트를 제공한다.
- [0027] 다른 구체예에서, 본 발명은 PRRS 바이러스 균주의 감염으로부터 돼지 동물을 보호하는 방법을 제공하며, 여기에는 본원에 청구된 면역원적 보호량의 백신을 동물에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0028] 본 발명은 또한 적절한 숙주 세포를 직접 형질감염시킬 수 있고, 그렇게 형질감염된 적합한 숙주 세포로부터 돼지 생식 호흡기 증후군 바이러스 (PRRS)를 발현시킬 수 있는 플라스미드를 제공하는데, 이때 플라스미드는 다음을 포함한다: (a) 상기 PRRS 바이러스를 인코딩하는 감염성 RNA 분자를 인코딩하는 DNA 서열, 그리고 (b) 전술한 감염성 RNA 분자를 전사시킬 수 있는 프로모터.
- [0029] 추가 바람직한 구체예에서, 전술한 플라스미드는 표적 진행 세포에서의 DNA 진수(launch)를 가능하게 할 수 있는 진행 생물 프로모터, 또는 플라스미드의 시험관내 전사를 지시할 수 있는 원핵 또는 과지 프로모터를 함유한다. 본 발명은 PRRS 바이러스를 생성시키는 방법을 제공하는데, 이 방법은 적절한 숙주 세포를 적절한 플라스미드로 형질감염시키고, 이 형질감염된 세포에 의해 생성된 PRRS 바이러스를 수득하는 것을 포함한다.
- [0030] 본 발명은 또한 폴리뉴클레오티드 분자로 형질감염된 숙주 세포를 제공하고, PRRS 바이러스에 의한 감염으로부터 돼지 동물을 보호하기 위한 백신을 제공하는데, 이때 이 백신은 다음을 포함한다: (a) 상기 언급된 폴리뉴클레오티드 분자에 의해 인코딩되는 유전적으로 변형된 유럽 PRRS 바이러스, 또는 (b) 전술한 감염성 분자, 또는 (c) 플라스미드 형태에서 전술한 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 (d) 전술한 폴리뉴클레오티드 분자와 의학적 사용에 적합한 운반체를 포함하는 바이러스 벡터, 이때 상기 PRRS 바이러스는 감염에 대한 면역 보호를 생성하는데 효과적인 양으로 PRRS 바이러스에 의한 감염에 대한 효과적인 면역 보호 반응을 유도할 수 있다.
- [0031] 구체적으로, 본 발명은 유럽 돼지 생식기 및 호흡기 증후군 (PRRS) 바이러스를 만드는 방법을 포함하는데, 이 방법은 적합한 진행 숙주 세포는 다음으로 구성된 군에서 선택된 조성물로 형질감염시키는 것을 포함한다:
- [0032] (a) (1) 유럽 PRRS 바이러스를 인코딩하는 감염성 RNA 분자를 인코딩하는 DNA 서열, 이때 전술한 인코딩 DNA 서열은 서열 번호:5, 또는 서열 번호:5에 대하여 최소한 85% 동일한 DNA 인코딩 서열이고, 그리고 (2) 전술한 적합한 숙주 세포에서 전술한 감염성 RNA 분자를 인코딩하는 전술한 DNA 서열의 전사를 구동할 수 있는 프로모터를 포함하는 플라스미드; 그리고
- [0033] (b) 유럽 PRRS 바이러스를 인코딩하는 전술한 감염성 PRRS RNA 분자를 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는 플라스미드의 시험관내 전사로부터 생성된 감염성 PRRS RNA 분자, 이때 전술한 인코딩 DNA 서열은 서열 번호:5, 또는 서열 번호:5에 대하여 최소한 85% 동일한 인코딩 DNA 서열,
- [0034] 이때, (a) 및 (b)의 경우 인코딩 서열은 서열 번호:5에 대하여 최소한 85% 동일하고, 참조서열과 비교하였을 때, 하나 또는 그 이상의 특정 돌연변이를 포함한다.
- [0035] 바람직한 실시예에서, 보호성 및 안전한 백신접종은 태어난 지 하루 안지난, 가령, 출생 후 8-16 시간, 약 2 주에서 3 주 사이의 어느 시점에서든 새끼 돼지가 젖을 때는 것을 고려하여 2 주 또는 3 주령과 같은 나이에 일회 투여로 돼지 새끼(암컷 또는 수컷)에게 백신접종과 안전한 접종을 제공 할 수 있다. 따라서 본 발명은 단일-투여 초기 백신접종에 일반적으로 적용할 수 있는데, 이것은 태어난 첫날 임의의 시점(출생부터 24시간 안), 유사하게 2일째, 3일째, 4일째, 5일째, 6일째, 7일째, 1-10일째, 1-14일째, 그리고 1-21일째, 또는 단순히 백신접종은 첫째는 날보다 대략 더 이른 날 실행된다. 2 또는 이상의 투여량이 선택적으로 사용될 수 있다.
- [0036] 이러한 조건하에서 돼지 생식기 및 호흡기 증후군 바이러스 (PRRSV)에 대항하는 초기 백신접종(전형적으로 근육 내 또는 비강내 경로)은 약 1 내지 8주령까지, 또는 백신접종 후 약 2 내지 6주 사이; 그리고 백신접종 후 약

28일차에 보통 보호성 면역의 조기 개시를 또한 제공한다.

[0037] 본 발명의 실시예에 따른 백신접종은 전형적으로 거래되는 돼지의 기대 수명인 약 23-28 주가 되는, 전형적으로 약 26 주인 돼지에 대한 면역 지속 기간을 제공한다. 따라서 본 발명에 의해 가능한 백신 프로그램은 돼지가 감염에 가장 취약하고, 가장 취약이 용이할 때 돼지를 보호한다. 이러한 백신접종은 또한 젖을 떼 새끼 돼지를 암태지로부터 떼어놓을 때 면역이 개시되고, 그리고 PRRSV에 의한 추가 감염 위험이 있을 수 있는 다른 시설로 이송될 때 면역이 개시될 수 있도록 한다. 본 발명의 백신은 또한 수태지, 그리고 암태지와 새끼 보호에 매우 효과적이고; 따라서 태어나지 않은 자손을 간접적으로 보호한다. 근육내 및 비강내 백신접종이 바람직하게 고려되지만, 다른 경로가 또한 적용 가능하다.

[0038] 본 발명의 추가 실시예에서, 비록 이 실시예는 바람직하지는 않지만, CD163 폴리펩티드는 재조합 세포에 의해 발현되는데, 유럽 PRRS 바이러스가 배양되는 재조합 세포는 돼지 CD163가 아니며 (따라서 돼지 동물에서 감염 및 성장하기 위하여 사전-적응됨), 돼지 서열에 매우 근접한, 이를 테면, U.S. 7,754,464의 서열 번호 2 또는 14에 대하여 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 보유한 포유류 CD163이다. 더욱 바람직하게는, 상기 아미노산 동일성은 92%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%이다.

[0039] 본 발명은 PRRS 바이러스의 필드 균주에 자연적으로 감염된 돼지 동물과 본 발명의 백신으로 백신접종된 돼지 동물을 구별하는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 진단 키트를 또한 제공하며, 이때 백신 (바이러스)은 야생형과 비교하였을 때, 바람직하게는 인터페론- α 억제 효과를 감소시킨다.

[0040] 본 발명은 또한 유럽 (벨기에) PRRSV 분리주(isolate) 96V198로부터 유래된 PRRSV의 대표적인 전체 게놈 서열을 제공한다. 분리주 96V198 그 자체는 1996년 벨기에 Ghent University의 Hans Nauwynck 교수가 호흡기 증상이 있는 어린 돼지 폐에서 얻은 것이다(감염된 돼지의 혈청으로부터 계대(Passage) 0을 회수하였다(서열 번호:1).

[0041] 계대 1 (서열 번호:2)는 1 차 돼지 폐포 대식세포(PAMs)에 대한 단일 계대의 결과이다. 모든 후속 계대는 BHK21-C12-26 세포주에서 수행되었다. 계대 9 (서열 번호:3)는 제한 회석 3 회에 의한 바이러스의 생물학적 클로닝 직전이다. 계대 14 (서열 번호:4)는 클론 1 (검사하고, 평가된 6개 클론중)이다. 클론 1은 계대 44에서 Master Seed 바이러스가 되고, 그리고 MSV+5 계대는 계대 49에서 Suvaxyn® PRRS MLV 산물이된다(서열 번호:5). 모든 게놈의 길이는 15,092 nt이다. 모든 게놈은 서로 최소한 99.5% 동일하고, Lelystad 바이러스와는 약 92% 동일하다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도면의 간단한 설명

도 1은 Suvaxyn® PRRS MLV 산물, 서열 번호:5에 대한 계대 49 분리주의 전장 뉴클레오티드 서열 (15,092개 염기)을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 서열 목록의 간단한 설명

[0044] 서열 번호:1은 PRRSV 분리주 96V198의 계대 0을 제공한다.

[0045] 서열 번호:2는 PRRSV 분리주 96V198의 계대 1을 제공한다.

[0046] 서열 번호:3은 PRRSV 분리주 96V198의 계대 9를 제공한다.

[0047] 서열 번호:4는 PRRSV 분리주 96V198의 계대 14를 제공한다.

[0048] 서열 번호:5는 PRRSV 분리주 96V198의 계대 49를 제공한다.

[0049] 서열 번호: 6-8은 PCR 프라이머 서열을 제공한다.

[0050] 발명의 상세한 설명

[0052] 본 명세서에서 단수("a", "an" 및 "the")형은 다른 명시적인 언급이 없는 한, 복수 개념을 포함한다. 따라서, 예를 들면, "방법"에 대한 언급은 본 명세서에서 기술된 하나 또는 이상의 유형의 방법 및/단계를 포함하며, 이는 본 명세서의 내용을 읽을 때 당업자에게 자명한 것들이다.

- [0053] 명시적으로 다른 언급이 없는 한, 본 명세서에서 이용된 모든 기술적 그리고 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업계 숙련자들에 의해 공통적으로 이해되는 것이다. 본원에 기재된 것과 유사한 또는 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 지금부터 기술된다.
- [0054] 본 발명의 실시는 바이러스 기술, 면역학, 미생물학, 분자 생물학 및 재조합 DNA 기술의 통상적인 방법을 반대로 명시하지 않는 한, 당해 기술 분야의 숙련자 내에서 이루어질 것이며, 이들 중 다수는 하기의 예시 목적으로 기술된다. 이러한 기술은 문헌에서 충분히 설명되어 있다. 가령, Sambrook, 외 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Maniatis 외 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984).
- [0055] "북미 PRRS 바이러스"는 1990년 초 미국에서 최초로 분리된 PRRS 바이러스(가령, Collins, J. E., 외, 1992, J. Vet. Diagn. Invest. 4:117-126); 북미 PRRS 바이러스 분리주 MN-1b (Kwang, J. 외, 1994, J. Vet. Diagn. Invest. 6:293-296); PRRS의 Quebec LAF-exp91 균주 (Mardassi, H. 외, 1995, Arch. Virol. 140:1405-1418); 그리고 북미 PRRS 바이러스 분리주 VR 2385 (Meng, X.-J 외, 1994, J. Gen. Virol. 75:1795-1801)에 국한되지 않는, 북미 PRRS 바이러스 분리주와 관련된 유전적 특성을 갖는 PRRS 바이러스를 의미한다. 유전적 특성은 북미 PRRS 바이러스 균주에 의해 공유되는 게놈 뉴클레오티드 서열 유사성 및 아미노산 서열 유사성을 지칭한다. 아시아 PRRS 바이러스는 일반적으로 북아메리카 계통과 80-95%의 염기 서열 동일성에 대한 증거를 가지고 있고(Lasergene software suite, DNASTAR, Inc.의 Clustal W 알고리즘 디폴트 값 참고), 그리고 북미 계통은 서로 유사하게 약 85% 내지 100% 동일하다.
- [0056] "유럽 PRRS 바이러스" (PRRSV-1, 또는 기존의 PRRSV 유형 1)는 대략 1991년 유럽에서 처음으로 분리된 PRRS 바이러스와 관련된 유전적 특성을 가진 PRRS 바이러스의 모든 균주를 말한다(가령, Wensvoort, G., 외, 1991, Vet. Q. 13:121-130, the Lelystad virus 참고, U.S. 특허 5,620,691 및 6,197,310 또한 참고). 유럽 PRRS 바이러스는 Lelystad 균주와 약 80% 또는 더 많이 동일한 전장 뉴클레오티드 서열을 갖는 바이러스를 일반적으로 지칭한다. PRRSV-1 안에, 아형(subtypes)이 확인되었으며, 따라서 Lelystad 바이러스는 아형 1에 대한 프로토타입(prototype)으로, 그리고 Lena 바이러스 (U. Karniychuk 외, BMC Veterinary Research, 2010, Vol 6, 번호 30)는 아형 3의 프로토타입으로 명명되었다. 이들 두 바이러스는 대략적으로 PRRSV-1의 최대 현재 퍼짐으로 펼쳐놓고, 그리고 따라서, 예를 들면, ORF5를 이용하여, Lelystad 와 Lena는 뉴클레오티드 수준에서 약 82.8% 동일하고, 그리고 전장 게놈을 이용하면, Lelystad와 Lena는 뉴클레오티드 수준에서 약 80.7% 동일하다. 정렬의 최적화는 알고리즘 매개 변수에 따라 약간 가변적인데, 그러나 독자는 일반적으로 Lasergene 소프트웨어 제품군(DNASTAR, Inc.)의 Clustal W 알고리즘에 대한 기본값을 참조한다.
- [0057] 유럽 PRRS 균주는 일반적으로 북미 및 아시아 (중국) 균주와 약 60% 만 동일하다. 예를 들면, ORF5 뉴클레오티드 서열 (전체 게놈이 알려지지 않았을 때, 전체 게놈을 공정하게 평가하는 경향이 있음)을 이용하여, 상기 PRRSV-1 프로토타입 Lelystad 바이러스와 북미 프로토타입 VR2332 균주는 뉴클레오티드 수준에서 약 65.0% 동일하다. 온전한 게놈 뉴클레오티드 서열을 이용하면, 프로토타입 Lelystad 바이러스와 프로토타입 VR2332 바이러스는 언급된 Clustal W 알고리즘에 대한 디폴트 값을 이용하면, 뉴클레오티드 수준에서 약 58.6% 동일하다.
- [0058] 본 발명의 목적을 위한 "효과적인 면역보호 반응", "면역 보호" 및 이와 유사한 용어는 백신접종된 동물에서 병원체에 의한 감염으로부터 보호하기 위해, 병원체의 하나 또는 그 이상의 항원성 에피토프에 대한 면역 반응을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해, 병원체에 의한 감염으로부터 보호는 감염의 절대적인 예방 뿐만 아니라, 병원체에 의한 감염의 정도 또는 속도의 임의의 탐지가 가능한 감소, 또는 백신접종하지 않은 감염된 동물과 비교하여, 백신접종된 동물에서 병원균으로 인한 질병, 임의의 증상 또는 상태의 심각성에서 임의의 탐지가 가능한 감소를 포함한다. 효과적인 면역 보호 반응은 이전에 병원체에 감염되지 않았거나 및/또는 백신접종 당시 병원체에 감염되지 않은 동물에서 유도될 수 있다. 효과적인 면역 보호 반응은 또한 백신접종 당시 이미 병원체에 감염된 동물에서 유도될 수 있다.
- [0059] 유전적으로 변형된 PRRS 바이러스는 변형안된 부모의 독성보다 독성이 덜하다면, "감쇠된 것이다(attenuated)". 질병의 중증도를 결정하는 하나 또는 그 이상의 매개 변수가 통계적으로 유의하게 감소하는 경우, 이 균주는 "독성이 덜(less virulent)"하다. 그러한 매개 변수는 바이러스혈증의 수준, 발열, 호흡 곤란의 중증도, 생식 증상의 중증도, 또는 폐 병변의 수 또는 중증도를 포함할 수 있다.

- [0060] "PRRS 바이러스 복제를 지원할 수 있는 숙주 세포"란 본 발명의 바이러스에 감염될 때 감염성 PRRS를 생성할 수 있는 세포를 의미한다. 그러한 세포는 돼지 폐포 대식세포 및 유도체와 같은 단핵구/대식세포 계통의 돼지 세포, MARC-145 세포와 같은 MA-104 원숭이 신장 세포 및 유도체; 및 PRRS 바이러스에 대한 수용체를 코딩하는 유전자로 형질 감염된 세포를 포함한다 (포유류 CD163 표면 단백질을 정상 PRRS 바이러스 세포 수용체로 할당하는 것을 언급하는 미국 특허 9,102,912 참고). 용어 "PRRS 바이러스 복제를 지원할 수 있는 숙주 세포"에는 살아있는 돼지 내의 세포를 포함할 수도 있다.
- [0061] 본원에 사용된 "개방 판독 프레임(Open reading frame)" 또는 "ORF"는 중간개재 중단 코돈없이, 특정 PRRS 바이러스 단백질을 인코딩하는데 필요한 최소 뉴클레오티드 서열을 의미한다.
- [0062] "돼지(porcine 또는 swine)"은 본 명세서에서 상호 교환 적으로 사용되며, 예를 들어 돼지(pig)와 같은 수아에 (*Suidae*) 족의 구성원인 임의의 동물을 지칭한다. 본 발명의 백신 및 방법 프로토콜은 모든 연령대의 수컷 또는 암컷의 돼지에게 적용가능하며, 암돼지 및 새끼 돼지를 포함하고, 이러한 방법은 또한 암컷 및 수컷 새끼 돼지를 투여를 받은 어미 돼지에 대한 보호를 통해 간접적으로 보호할 수 있다. 본문에서 사용된 "PRRS 바이러스"라는 용어는 달리 명시되지 않는 한, 북아메리카, 아시아 또는 유럽 PRRS 바이러스의 모든 균주를 의미한다.
- [0063] "PRRS"는 PRRS 바이러스 (PRRSV) 감염으로 인한 돼지의 질병 증상을 포함한다. 그러한 증상의 예로는 발열, 임신한 암컷의 유산, 호흡 곤란, 폐 병변, 식욕 부진 및 어린 돼지의 사망률이 포함되나 이에 국한되지 않는다. 본원에서 사용된 "PRRS를 생산할 수 없는" PRRS 바이러스는 돼지를 감염시킬 수 있지만, 돼지의 PRRS 감염과 관련하여 어떠한 질병 증상도 일으키지 않는 바이러스를 지칭한다.
- [0064] "형질감염된 숙주 세포"는 실질적으로 PRRS 바이러스 RNA로 형질감염될 때, PRRS 비리온의 적어도 제 1 라운드를 생성할 수 있는 임의의 숙주 세포를 의미한다.
- [0065] 본 발명의 목적을 위한 "전염성 DNA 분자"는 적절한 숙주 세포로부터 기능적 비리온으로의 복제, 전사 및 해독을 지원하는데 필요한 요소를 암호화하는 DNA 분자이다.
- [0066] 마찬가지로, "단리된 폴리뉴클레오티드 분자"는 존재하는 경우 자연 발생 상태에서부터 임의의 검출 가능한 정도로 정제되거나 제어된 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 물질의 조성물을 지칭한다.
- [0067] 본 발명의 목적 상, 제 2 폴리펩티드 분자 (RNA 또는 DNA)의 뉴클레오티드 서열은 제 1 폴리뉴클레오티드 분자의 뉴클레오티드 서열과 "상동성(homologous)"이거나, 또는 상기 제 1 폴리뉴클레오티드 분자와 "동일"하고, 여기서 제 2 폴리뉴클레오티드 분자의 뉴클레오티드 서열은 유전자 코드의 축퇴에 기초하여 제 1 폴리뉴클레오티드 분자의 뉴클레오티드 서열과 동일한 폴리아미노산을 인코딩하고, 또는 본 발명을 실시하는데 유용하도록 제 1 폴리뉴클레오티드 분자의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 폴리아미노산과 충분히 유사한 폴리아미노산을 코딩한다. 상동성 폴리뉴클레오티드 서열은 또한 센스 및 안티센스 가닥을 지칭하고, 모든 경우에 그러한 가닥의 보체(complement)를 지칭한다. 본 발명의 목적 상, 폴리뉴클레오티드 분자는 본 발명을 실시하는데 유용하며, 따라서 상동성이거나 동일성을 갖고, 이때 표준 하이브리드 또는 증폭 기술을 이용하여 감염된 돼지의 체액 또는 조직 샘플에서 PRRS 바이러스 또는 바이러스 폴리뉴클레오티드의 존재를 검출하기 위한 진단 프로브로서 사용될 수 있다. 일반적으로, 제 2 폴리뉴클레오티드 분자의 뉴클레오티드 서열은 BLASTN 알고리즘 (National Center for Biotechnology Information, 그렇지 않으면 the United States National Institute of Health의 NCBI으로 공지됨(Bethesda, Maryland, USA))에 기초하여 제 1 폴리뉴클레오티드 분자의 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 70%의 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 경우, 제 1 폴리뉴클레오티드 분자의 뉴클레오티드 서열에 상동이다. 본 발명의 실시예에 따른 산출의 특정 예로써, BLASTP 2.2.6를 참조한다 [Tatusova TA and TL Madden, "BLAST 2 sequences-a new tool for comparing protein and nucleotide sequences." (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250.]. 간략하게 설명하자면, 2 개의 아미노산 서열을 정렬하여 10의 갭 오픈 페널티, 0.1의 갭 연장 페널티, 및 Henikoff 및 Henikoff의 "blosum62"특점 매트릭스를 사용하여 정렬 스코어를 최적화한다(Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:10915-10919. 1992). 동일성 백분율은 다음과 같이 계산된다: 동일한 매치(matches)의 총 수 x 100/더 긴 서열의 길이+두 서열을 정렬하기 위하여 더 긴 서열로 도입된 갭의 수.
- [0068] 바람직하게는, 상동성 뉴클레오티드 서열은 최소한 약 75% 뉴클레오티드 서열 동일성, 더 더욱 바람직하게는 최소한 약 80%, 85%, 90% 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는다. 유전 암호가 축중(degenerate)이기 때문에, 상동성 뉴클레오티드 서열은 임의의 수의 "침묵(silent)" 염기 변화, 즉 동일한 아미노산을 코딩하는 뉴클레오티드 치환을 포함할 수 있다.
- [0069] 상동성 뉴클레오티드 서열은 이 서열이 제 1 뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리아미노산과 적어도 약 70% 동

일하게 유지되는 한, 암호화되지 않은 폴리아미노산에서 아미노산 차이를 야기하는 비-침묵 돌연변이, 즉 염기 치환, 결실 또는 첨가를 추가로 포함할 수 있고, 또는 그 외에는 본 발명을 실시하는데 유용하다.

[0070] 이와 관련하여, 일반적으로 전체 단백질 기능을 불활성화시키지 않는 것으로 인식되는 특정 보존적 아미노산 치환이 이루어질 수 있다: 양전하를 띤 아미노산 (및 그 반대), 리신, 아르기닌 및 히스티딘; 음전하를 띤 아미노산 (및 그 반대)과 관련하여, 아스파르트산 및 글루탐산; 중성 아미노산의 특정 그룹 (모든 경우에, 또한 그 반대의 경우)과 관련하여, (1) 알라닌 및 세린, (2) 아스파라긴, 글루타민, 및 히스티딘, (3) 시스테인과 세린, (4) 글리신과 프롤린, (5) 이소류신, 류신 및 발린, (6) 메티오닌, 류신 및 이소류신, (7) 페닐알라닌, 메티오닌, 류신, 및 티로신, (8) 세린 및 트레오닌, (9) 트립토판과 티로신, (10) 그리고 예를 들면 티로신, 트립토판 및 페닐알라닌. 아미노산은 2 차 및 3 차 단백질 구조에 대한 물리적 특성 및 기여도에 따라 분류될 수 있다. 보존적 치환은 당해 기술 분야에서 유사 아미노산을 갖는 하나의 아미노산을 또다른 한 아미노산으로 대체하는 것으로 인식된다. 예시적인 보존적 치환은 WO 97/09433, page 10, Mar. 13, 1997 공개 (PCT/GB96/02197, Sep. 6, 1996. 대안적으로, 보존적 아미노산은 Lehninger, (Biochemistry, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY:NY (1975), pp. 71-77)에서 기술된 바와 같이, 집단화될 수 있다. 추가의 적절한 보존적 변경 및 그 응용을 아래에서 설명한다.

[0071] 상동성 뉴클레오티드 서열은 예를 들어, 상기 BLASTN을 사용하여 뉴클레오티드 서열의 비교에 의해 결정될 수 있다. 대안적으로, 상동성 뉴클레오티드 서열은 선택된 조건 하에서 하이브리드화에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 제 2 폴리뉴클레오티드 분자의 뉴클레오티드 서열은 중등도의 엄격한 조건, 가령, 65°C에서 0.5 M NaHPO₄, 7% 도데실 황페이트 나트륨 (SDS), 1 mM EDTA에서 필터-결합된 DNA에 혼성화, 그리고 42°C에서 0.2xSSC/0.1% SDS에서 세척(Ausubel 외 editors, Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, 1994, pp. 6.0.3 to 6.4.10)하에, 또는 또는 그렇지 않으면 하기 정의된 바와 같은 PRRS 바이러스를 인코딩하는 서열의 혼성화를 초래할 조건하에, 서열 번호 5의 보체에 혼성화하는 경우, 서열 번호: 5 (또는 임의의 다른 특정 폴리뉴클레오티드 서열)와 상동이다. 혼성화 조건에서의 변형은 경험적으로 결정될 수 있거나 프로브의 구아노신/시토신 (GC) 염기 쌍의 길이 및 백분율에 기초하여 정확하게 계산될 수 있다. 혼성화 조건은 Sambrook, 외, (Eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1989), pp. 9.47 to 9.51.에서 기술된 것과 같이, 산출될 수 있다.

[0072] 또다른 구체예에서, 가령, 당분야에 공지된 바와 같이(Ausebel 외 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1989, 65°C에서 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS, 1 mM EDTA에서 필터-결합된 DNA에 혼성화되고, 그리고 68°C에서 0.1xSSC/0.1% SDS에서 세척되는 것과 같은 매우 엄격한 조건하에 서열 번호:5의 보체에 혼성화되는 경우, 제 2 뉴클레오티드 서열은 서열 번호:5 (또는 본 발명의 임의의 다른 서열)에 상동성이다.

[0073] 추가로, 본 발명의 단리된 폴리뉴클레오티드 분자 및 단리된 RNA 분자는 합성 분자 및 시험관내 클로닝 및 전사에 의한 것과 같은 재조합 기술을 통해 수득된 분자 모두를 포함한다는 것을 이해해야 한다.

[0074] 폴리뉴클레오티드 분자는 당분야의 숙련자에게 공지된 재조합 기술을 사용하여 부위 특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 당업계에 공지된 바와 같이 화학적 돌연변이 또는 방사선에 노출시키는 것과 같은 무작위 돌연변이 유발을 통해 유전적으로 변형시킬 수 있다. 돌연변이는 당업계에 공지된 표준 방법, 예를 들면, 기술된 바와 같이(가령, Meulenberg 외, Adv. Exp. Med. Biol., 1998, 440:199-206), 감염성 복사체의 부위 지정 돌연변이 유발 (가령, Sambrook 외(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 참고)에 의해 실행될 수 있다.

[0075] 젖떼기 전의 새끼 돼지에 투여할 때, 안전하고 효과적인 바람직한 유럽 PRRS 바이러스 서열을 제공하는 것과 관련하여, 변형될 수 있는 아미노산 위치 중 하나를 다음에서 제시한다. 이러한 특정 돌연변이를 확인하는데 있어서, 상기 정의된 바와 같이 이들 바람직한 아미노산 잔기에 대한 보존적 치환이 또한 사용될 수 있음이 물론 주목된다. 선호되는 인코딩된 아미노산을 확인함에 있어서, 96V198 균주의 야생 분리주의 상응하는/원래 아미노산 또한 괄호로 표시하고, 따라서 계대 0 (서열 번호:1)은 계대 49 (선호되는 백신 재료, 서열 번호:5)이다. 따라서, ORF1a의 인코딩된 아미노산 서열의 경우, 아미노산 위치 19에서 S (N); 아미노산 위치 24에서 Y (F); 아미노산 위치 156에서 A (T); 아미노산 위치 157에서 Y (H); 아미노산 위치 268 D (N); 아미노산 위치 294에서 H (Y); 아미노산 위치 416에서 Y (C); 아미노산 위치 742에서 S (P); 아미노산 위치 884에서 L (F); 아미노산 위치 908에서 P (S); 아미노산 위치 916에서 K (E); 아미노산 위치 977에서 K (E); 아미노산 위치 1138에서 S (P); 아미노산 위치 1160에서 F (L); 아미노산 위치 1500에서 S (P); 아미노산 위치 2094에서 R (Q); 아미노산

위치 2254에서 P (S); 그리고 아미노산 위치 2290에서 L (F). ORF1b로부터 인코딩된 아미노산 서열의 경우, 아미노산 위치 567에서 S (N); 그리고 아미노산 위치 912에서 H (Q). ORF2a로부터 인코딩된 아미노산 서열의 경우, 아미노산 위치 22에서 L (S); 아미노산 위치 88에서 F (V); 아미노산 위치 94에서 M (I); 그리고 아미노산 위치 95에서 F (L). ORF2b로부터 인코딩된 아미노산 서열의 경우, 아미노산 위치 47에서 L (F). ORF3로부터 인코딩된 아미노산 서열의 경우, 아미노산 위치 52에서 S (T). ORF4로부터 인코딩된 아미노산 서열의 경우, 아미노산 위치 151에서 T (I). ORF5로부터 인코딩된 아미노산 서열의 경우, 아미노산 위치 20에서 F (L); 그리고 아미노산 위치 37에서 D (N). ORF5a로부터 인코딩된 아미노산 서열의 경우, 아미노산 위치 18에서 V (A); 그리고 아미노산 위치 35에서 R (Q).

[0076] 따라서, 본 발명은 유전적으로 변형된 유럽 PRRS 바이러스를 만드는 방법을 더 제공하는데, 이 방법은 상기에서 기술된 바와 같이 PRRS 바이러스를 인코딩하는 감염성 RNA 분자를 인코딩하는 DNA 서열을 돌연변이시키고, 그리고 이 유전적으로 변형된 PRRS 바이러스는 적합한 발현 시스템을 이용하여 발현시키는 것을 포함한다. 유전적으로 변형된 PRRS 바이러스는 이 분야에서 일반적으로 공지된 적합한 발현 시스템을 사용하여 단리된 폴리뉴클레오티드 분자로부터 발현될 수 있으며, 이의 예는 이 출원에 기재되어 있다. 예를 들면, 상기 단리된 폴리뉴클레오티드 분자는 하기에 더 상세히 기술되는 바와 같이, 시험관내에서 적합한 숙주 세포에서 인코딩된 바이러스를 발현시킬 수 있는 플라스미드의 형태일 수 있다.

[0077] 북미 PRRSV N 단백질 서열은 고도로 보존되어 있으며, 보고된 서열은 서로 약 93-100%의 동일성을 갖는다. 북미 및 유럽 PRRSV N 단백질은 약 57-59% 동일하며, 공통 구조 모티프를 공유한다. 일반적으로, 특정 뉴클레오티드 또는 인코딩된 아미노산에 대해 다르게 번호가 매겨질 수 있는 PRRS 코딩 서열과 분리주를 비교할 때, 적절한 부위의 확인은 관심대상의 PRRS 균주에서 보존된 특징적인 아미노산을 확인하고, 참조 균주와 정렬시킴으로써, 용이하게 달성된다.

[0078] 재조합 DNA 기술은 DNA 수준에서 핵산을 변형시키는 것을 목표로 하는 매우 다양하고, 강력한 분자 생물학 기술을 포함하며, 분자 수준에서 계놈을 분석하고 수정할 수 있다. 이와 관련하여, 계놈의 적당한 크기로 인해 PRRS 바이러스와 같은 바이러스는 그러한 조작에 특히 적절하다. 그러나, 재조합 DNA 기술은 비-레트로 바이러스 RNA 바이러스에 즉시 적용될 수 없는데, 그 이유는 이들 바이러스는 복제에서 DNA 중간 단계를 포함하지 않기 때문이다. 그러한 바이러스의 경우, 변형된 바이러스를 생성하기 위해, 이들의 계놈에 재조합 DNA 기술을 적용하기 전, 감염성 cDNA 클론을 개발해야 한다. 전염성 클론은 연구중인 바이러스의 전체-길이 (계놈 길이) cDNA (RNA의 DNA 사본의 광범위한 의미에서 뿐만 아니라 mRNA의 DNA 사본의 엄격한 의미에서 사용됨)의 구축을 통해 도출될 수 있고, 그 후 전장 cDNA로 형질감염된 세포에서 생체 내에서 감염성 전사체를 합성하지만, 전사 카테일의 존재 하에 원핵 생물 프로모터를 갖는 플라스미드에서 전장 cDNA로부터 시험관내 전사에 의해 감염성 전사체를 얻을 수 있거나, 또는 전체 바이러스 계놈을 포함하는 절찰된 부분-길이 cDNA 단편을 사용하여 시험관내에서 다시 얻을 수 있다. 모든 경우에 있어서, 전사된 RNA는 cDNA에 도입된 모든 변형을 보유하며, 이렇게 변형된 바이러스를 추가로 통과 시키는데 사용될 수 있다.

[0079] 유럽 PRRS 바이러스 분리주 또는 Lelystad 바이러스의 전염성 클론의 제조는 U.S. 미국 특허 6,268,199에 기재되어 있다. P129로 명명된(Lee 외, 2005; Yoo 외, 2004) 북미 PRRS 바이러스 분리주의 감염성 cDNA 클론의 제조는 U.S. 특허 번호 6,500,662에 기술되어 있다(이는 참고자료에 통합됨). P129 cDNA의 서열은 Genbank 수탁 번호 AF494042 및 U.S. 특허 번호 6,500,662에 기술된다. 하기의 우리 작업은 플라스미드와 관련하여, CMV 즉시 초기 프로모터에 의해 발현되고 pCMV-S-P129로 명명된 상기 전염성 클론을 사용하는 것이며, 이 또한 U.S. 특허 번호 6,500,662에 기술된다. U.S. 특허 번호 6,500,662에는 여기에 사용하기에 적합한 다른 플라스미드 및 프로모터가 기재되어 있다.

[0080] 임의의 오픈 리딩 프레임의 완전한 서열 및 관심 대상의 아미노산 잔기의 위치가 주어지면, 당업자는 원하는 특정 위치에서의 변화를 설계하기 위해 코돈 테이블을 참고하면된다.

[0082] 코돈은 mRNA와 그에 해당하는 cDNA 분자에서 뉴클레오티드의 삼중항 염기 서열로 구성된다. 코돈은 mRNA 분자에 존재할 때, 염기성 우라실 (U)을 특징으로 하지만, DNA에 존재할 때 염기성 티미딘 (T)을 특징으로 한다. 폴리뉴클레오티드 내의 동일한 아미노산 잔기에 대한 코돈의 단순 변화는 인코딩된 폴리펩티드의 서열 또는 구조를 변화시키지 않을 것이다. 특정 3개 염기 서열이 임의의 특정 아미노산을 "인코드 (encode)"한다는 것을 나타내는 구문이 표시될 때, 당업자는 상기 표가 문제의 특정 뉴클레오티드를 확인하는 수단을 제공한다는 것을 인식할 것이다. 예를 들어, 특정 세개의 뉴클레오티드 서열이 리신을 인코딩한다면, 상기 표는 두 개의 가능한 삼중항 서열이 AAA 및 AAG임을 개시한다. 글리신은 GGA, GGC, GGT (RNA의 경우 GGU) 및 GGG에 의해 인코딩된다.

인코딩된 단백질에서 리신을 글리신 잔기로 변경하기 위해, AAA 또는 AAG 삼중항을 GGA 및 GGC, GGT 또는 GGG로 인코딩 핵산을 대체할 수 있다.

[0083] PRRS 바이러스의 면역 생물학에 관한 연구는 PRRS 바이러스와 PDCs의 상호 작용이 검사의 가치가 있음을 암시한다. 이 세포 유형은 사람, 생쥐, 쥐, 돼지 및 원숭이의 말초 혈액 단핵 세포의 0.2%-0.8%를 나타낸다. 회소성에도 불구하고, 이 세포는 타고난 면역계의 중요한 구성 요소이며, 바이러스 자극 후 다양한 IFN- α 를 분비할 수 있다. IFN- α 의 분비를 통해 PDC는 자연 살해 세포, B 세포 및 T 세포의 기능을 촉진하기 때문에, 항바이러스성 및 적응성 면역 조절에 중요한 역할을 한다. 또한, 돼지 단핵구 유도 수지상 세포 (MoDC)의 성숙은 PDCs에 의해 분비된 IFN- α 에 의해 촉진되어, MoDC가 항원을 제시하고, T 세포를 활성화시키는 능력을 향상시킨다. 바이러스 감염의 후기 단계에서 PDCs는 독특한 유형의 성숙 수지상 세포로 분화되고, 직접 T 세포의 기능을 조절하고, T 세포의 분화를 IFN- γ 를 분비할 수 있는 세포로 유도하고, 이는 PRRS 바이러스를 포함한 바이러스에 대한 항바이러스성 면역의 주요 매개체이다. 당연히 IFN- α 를 분비하는 PDC의 능력을 억제하는 것으로 알려진 호흡기 세포 융합 바이러스 및 홍역 바이러스와 같은 인간 바이러스가 있다. 이러한 억제 효과는 체액성 면역 반응이 우세하고, 이 바이러스에 감염된 결과로 관찰되는 관련 면역 병리학 뿐만 아니라 박테리아성 및 바이러스성 2차 감염에 대한 숙주의 감수성이 증가하는 것으로 생각된다.

[0084] 전술 한 바와 같이, 유럽, 북미 및 중국 PRRS의 다수의 공지된 균주 및 분리가 존재하며, 신규한 균주는 계속 진화하거나 또는 단리되어 왔다. 이들 모든 균주 사이에는 높은 수준의 아미노산 서열 상동성이 존재하지만, 당업자라면 어떤 변형이 존재한다는 것을 즉각 인식할 것이며, 실제로 모든 백신 균주의 표현형 특성을 개선하기 위해 이러한 차이점과 유사점을 활용할 수 있다.

[0085] 우선, 하기에 명시된 바와 같이 서열 번호로 특정된 모든 아미노산 모티프에 있어서, 이러한 다른 균주에서 대체 및/또는 결실 또는 부가를 일으키는 추가적인 변화가 일어났더라도, 다른 유럽 PRRS로부터 상응하는 발현된 단백질 서열을 조사하여 상응하는 아미노산 모티프를 발견하는 것은 심지어 진화의 결과로서 일반적으로 가능하다. 따라서, 예를 들어, 그 중 발린이 이소류신 또는 류신, 또는 임의의 다른 잔기로 대체되거나, 잔기가 단순히 누락되거나 또는 추가적인 잔기가 첨가되는 경우, 다른 PRRS 균주에서 비교 가능한 모티프를 동정할 수 있어야 한다. 정렬을 확인하여 폴리펩티드 서열 모티프가 일치하는지를 결정하기 위한 다수의 컴퓨터 프로그램이 존재하는데, 예를 들어, 소위 Blosum 표 (일정한 퍼센트의 동일성에 기초 함)가 있다. S. Henikoff 외 "Amino Acid Substitution matrices from protein blocks", Proc Natl Acad Sci, USA, 89(22), pp. 10915-10919, Nov 15, 1992. 참조, 그리고 A. L. Lehninger 외 Principles of Biochemistry, 2005, MacMillan and Company, 4th edition 또한 참고. 보존적 아미노산 변화는 5 개의 전체 그룹으로 구별되는 것에 의해 인지될 수 있다: 술폰히드릴 (Cys); 방향족 (Phe, Tyr, 그리고 Trp); 염기성 (Lys, Arg, His); 지방족 (Val, Ileu, Leu, Met), 그리고 친수성 (Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser 및 Thr). 따라서 임의의 유럽 PRRS 인코딩 뉴클레오타이드 서열에서 서열 번호:5에서 적절하고 상응하는 위치에 제공된 임의의 아미노산 변화를 통합하도록 변형시키는 것은 설사 지정된 위치에 인접한 다른 아미노산중 하나 또는 그 이상이 추가, 삭제, 또는 치환되더라도 본 발명의 실시 범위 내에 있다. 이러한 아미노산 변화는 물론 부위 특이적 돌연변이 유발, PCR 및 당업계에 잘 공지된 다른 기술에 의해 바이러스의 상응하는 인코딩된 뉴클레오타이드 서열에 도입될 수 있다.

[0086] 감쇠의 전반적인 측정

[0087] 특정 유전적으로 변형된 균주가 감쇠되었음을 입증하기 위해, 다음과 같이 기술된 실험을 사용할 수 있다.

[0088] 각 시험에는 PRRSV가 없는 농장에서 데리고 온 그룹당 최소 10 마리의 암퇘지가 포함되어 있다. 동물은 PRRS 바이러스 특이성 혈청 항체가 없고, PRRSV는 음성인 것으로 테스트된다. 시험에 포함된 모든 동물은 동일한 원산지와 품종이다. 그룹에 동물을 할당하는 것은 무작위로 이루어진다.

[0089] 임신 90 일째에 1 ml PRRSV, 쿿팅당 10^5 TCID₅₀를 비강 내로 투여하여 공격을 실행한다. 각 테스트 설정에는 최소한 세 개의 그룹이 있다: 야생형 바이러스에 대한 한 그룹; 바이러스 감쇠 가능성이 있는 시험 그룹 하나; 하나의 엄격한 대조군 그룹.

[0090] 이 연구는 엄격한 대조군이 연구의 시간 경과에 따라 PRRSV-음성을 유지하고, 엄격한 대조군과 비교하여 야생형 공격을 받은 그룹에서 적어도 25% 덜 건강한 새끼 돼지가 출생한 경우 유효한 것으로 간주된다.

[0091] 감쇠, 즉 독성이 덜한 것은 생식 기능 또는 다른 증상을 결정하는 하나 또는 그 이상의 매개 변수의 통계적으로 유의적인 변화로 정의된다.

- [0092] 시험군 (아마도 감쇠된 바이러스)에 대한 다음 매개 변수 중 적어도 하나가 유의미적으로 감소되면, 변형되지 않은 모체 계통의 감염된 집단과 비교하여, 감쇠를 나타낸다:
- [0093] a) 사산의 빈도
- [0094] b) 임신 112 일 또는 그 이전에 유산
- [0095] c) 미이라화된 새끼 돼지의 수
- [0096] d) 덜 활발하고 약한 새끼 돼지의 수
- [0097] e) 젖떼기 전 사망률.
- [0098] 더욱이, 비변형 부모 군주에 감염된 군과 비교하여 시험군에서 다음의 매개 변수 중 하나의 유의적인 증가는 바람직하다:
- [0099] f) 암태지당 젖을 땀 새끼 돼지의 수
- [0100] g) 암태지 당 태어난 살아있는 건강한 돼지의 수.
- [0101] 대안으로, PRRSV 감염의 호흡기 증상 및 다른 증상을 조사하여 감쇠가 이루어졌는지 확인할 수 있다.
- [0102] 감쇠된 군주는 백신의 제제에 가치가 있다. 돼지가 PRRS 바이러스에 의한 감염으로부터 돼지를 보호한다면, 본 백신은 효과적이다. 하나 또는 그 이상의 감염되지 않은 돼지에게 백신을 투여한 후, 생물학적으로 순수한 바이러스 분리주 (예, 임의의 유럽 야생형)을 사용한 후속 공격으로 임의의 총체적 또는 조직병리학적 변화(가령, 폐에 병변)가 보호되지 않은 유사한 돼지(가령, 적절한 대조군과 비교)에서 이 분리주에 의해 전형적으로 야기되는 변화 또는 증상과 비교하여 감소되거나, 또는 질환의 증상이 감소된다면, PRRS 바이러스에 의한 감염에 대하여 이 백신은 돼지를 보호한다. 더 구체적으로, 본 백신은 백신을 필요로 하는 하나 또는 그 이상의 적합한 돼지에게 투여한 다음, 적절한 시간의 경과 후(가령, 4주), 생물학적으로 순수한 PRRSV 분리주의 대량 시료 ($10^{(3-7)}$ TCID₍₅₀₎)로 공격을 한다. 약 일주일 후에 공격을 받은 돼지의 혈액 샘플을 채취하여 혈액 샘플에서 바이러스를 분리하려는 시도가 수행된다. 많은 양의 바이러스가 분리되면 백신이 효과적이지 않을 수 있다는 표시이며, 바이러스의 단리되는 양이 준다는 것(또는 바이러스가 없음)은 백신이 효과적일 수 있다는 표시이다.
- [0103] 따라서, 본 백신의 유효성은 정량적으로 (즉, 적절한 대조군과 비교하여 굳은 폐 조직의 백분율 감소) 또는 정성적으로(예를 들어, 혈액에서의 PRRSV의 단리, 면역 분석법에 의해 측정에 의해 폐, 편도선 또는 림프절 조직 샘플을 예서의 PRRSV 항원의 검출) 평가될 수 있다. 돼지 생식 및 호흡기 질환의 증상은 정량적으로 (예를 들어, 온도/발열) 또는 반-정량적 (가령, 청색증, 폐렴, 폐 병변 등과 같은 하나 이상의 증상의 존재 또는 부재, 또는 하나 이상의 증상의 중증도 감소)으로 평가될 수 있다.
- [0104] 감염되지 않은 돼지는 돼지 생식 및 호흡기 질환 감염 인자에 노출되지 않은 돼지이거나, 또는 돼지의 생식 및 호흡기 질환 감염 인자에 노출되어 있지만 이 질병의 증상을 보이지는 않는 돼지다. 감염된 돼지는 PRRS의 증상을 나타내거나, 또는 PRRSV가 단리될 수 있는 돼지다.
- [0105] 본 발명의 백신은 표준 완충액, 안정화제, 희석제, 방부제 및/또는 가용화제와 같은 인간을 비롯한 동물에 대한 허용가능한 운반체 (적용가능할 경우)를 포함하도록 허용된 관례에 따라 제형화될 수 있으며, 그리고 서방형이 되도록 제제화될 수 있다. 희석제는 물, 식염수, 텍스트로스, 에탄올, 글리세롤 등을 포함한다. 등장성을 위한 첨가제로는 염화나트륨, 텍스트로스, 만니톨, 소르비톨 및 락토오스가 포함된다. 그중에서 안정제에는 알부민이 포함된다. 변형된 생백신을 제제화하는데 특히 유용한 것들을 포함하는 다른 적합한 백신 비이클 및 첨가제는 공지되어 있거나 또는 당업자에게 명백할 것이다. 가령, Remington's Pharmaceutical Science, 18th ed., 1990, Mack Publishing 참고하며, 이는 본 명세서에 참고자료에 통합된다.
- [0106] 본 발명의 백신은 추가로 하나 또는 그 이상의 추가의 면역 조절 성분, 예를 들어, 면역 보강제 또는 사이토킨을 포함할 수 있다. 본 발명의 백신에 사용될 수 있는 어쥬번트의 비-제한적인 예는 RIBI 어쥬번트 시스템 (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), 명반, 수산화 알루미늄 겔과 같은 미네랄 겔, 수중유 에멀전, 유중수 에멀전, 예를 들어, Freund's 완전 및 불완전 어쥬번트, 블록 공중합체(CytRx, Atlanta, Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), AMPHIGEN.RTM. 어쥬번트, 사포닌, Quil A 또는 다른 사포닌 분획, 모노포스포릴 지질 A 및 아브리딘 지질-아민 어쥬번트를 포함한다. 본 발명의 백신에 유용한 수중유 에멀전의 비-제한적 예는 변형된 SEAM62 및 SEAM 1/2 제제를 포함한다. 변형된 SEAM62는

5% (v/v) 스쿠알렌 (Sigma), 1% (v/v) SPAN.RTM. 85 세제 (ICI Surfactants), 0.7% (v/v) TWEEN.RTM. 80 세제 (ICI Surfactants), 2.5% (v/v) 에탄올, 200 pg/ml Quil A, 100 [mgr]g/ml 콜레스테롤, 그리고 0.5% (v/v) 레시틴을 함유하는 수중유 에멀전이다. 변형된 SEAM 1/2는 5% (v/v) 스쿠알렌, 1% (v/v) SPAN.RTM. 85 세제, 0.7% (v/v) Tween 80 세제, 2.5% (v/v) 에탄올, 100.mu.g/ml Quil A, 그리고 50.mu.g/ml 콜레스테롤을 함유하는 수중유 에멀전이다 백신에 포함될 수 있는 다른 면역 조절제는 예를 들어 하나 이상의 인터류킨, 인터페론 또는 다른 공지된 사이토킨을 포함한다.

[0107] 본 발명의 백신은 본 발명의 바이러스, 감염성 RNA 분자, 플라스미드 또는 바이러스 벡터의 서방형 방출을 위해 임의로 제제화될 수 있다. 그러한 서방형 제제의 예로는, 예를 들어 폴리(락트산), 폴리(락탁-코-글리콜산), 메틸 셀룰로오스, 히알루론산, 콜라겐 등의 생체 적합성 중합체의 복합체와 조합된 바이러스, 감염성 RNA 분자, 플라스미드 또는 바이러스 벡터가 포함된다. 약물 전달 매체에서의 분해성 중합체의 구조, 선택 및 사용은 Domb 외, 1992, Polymers for Advanced Technologies 3: 279-292을 포함한 여러 간행물에서 검토되었고, 이는 본원의 참고자료에 통합된다. 제약 제제에서 중합체를 선택하고, 사용하는 추가의 지침은 당 업계에 공지된 문헌에서 찾을 수 있으며, 예를 들면 M. Chasin and R. Langer (eds), 1990, "Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems" in: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol. 45, M. Dekker, N.Y.에 기술되며, 이 또한 본원의 참고자료에 통합된다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 바이러스, 플라스미드 또는 바이러스 벡터는 투여 및 효능을 개선시키기 위해 마이크로 캡슐화될 수 있다. 바이러스, 플라스미드 또는 바이러스 벡터는 투여 및 효능을 개선시키기 위해 마이크로캡슐화될 수 있고, 그리고 가령, U.S. 특허 번호 3,137,631; U.S. 특허 번호 3,959,457; U.S. 특허 번호 4,205,060; U.S. 특허 번호 4,606,940; U.S. 특허 번호 4,744,933; U.S. 특허 번호 5,132,117; 그리고 국제 특허 공개 WO 95/28227에서 기술하고 있는 기술을 포함하며, 이들 모두는 본원 참고자료에 통합된다.

[0108] 리포솜은 또한 바이러스, 플라스미드 또는 바이러스 벡터의 지속적인 방출을 제공하는데 사용될 수 있다. 리포솜 제제를 제조하고 사용하는 방법에 관한 세부 사항은 다른 곳, U.S. 특허 번호 4,016,100; U.S. 특허 번호 4,452,747; U.S. 특허 번호 4,921,706; U.S. 특허 번호 4,927,637; U.S. 특허 번호 4,944,948; U.S. 특허 번호 5,008,050; 그리고 U.S. 특허 번호 5,009,956에서 찾을 수 있고, 이들 모두는 본원 참고자료에 통합된다.

[0109] 상기 한 백신 중 어느 하나의 유효량은 통상적인 방법으로 바이러스, 바이러스 단백질 플라스미드 또는 바이러스 벡터의 저 용량(dose) 투여로 시작하여, 효과를 모니터링하면서 투여량을 증가시킬 수 있다. 백신의 단일 투여 후 또는 백신의 다중 투여 후에 유효한 양을 얻을 수 있다. 동물 당 최적의 용량을 결정할 때, 알려진 인자를 고려할 수 있다. 여기에는 동물의 종류, 체구, 나이 및 전반적인 상태, 동물에서의 다른 약물의 존재 등이 포함된다. 실제 투여량은 다른 동물 연구 결과를 고려한 후에 선택하는 것이 바람직하다 (하기의 실시예 3-7 참조).

[0110] 적절한 면역 반응이 달성되었는지 여부를 검출하는 한 가지 방법은 백신접종 후 동물에서 혈청 전환 및 항체 역가(titer)를 측정하는 것이다. 백신접종시기와 부스터(boosters)의 횟수는 의사와 수의사가 결정하는 것이 바람직하며, 그 중 일부는 위에 설명된 모든 관련 요인의 분석을 토대로 결정된다.

[0111] 본 발명의 바이러스, 단백질, 감염성 DNA 분자, 플라스미드 또는 바이러스 벡터의 유효 투여량은 백신접종되는 동물의 체중과 같은 당업자에 의해 결정될 수 있는 인자를 고려하여, 공지된 기술을 사용하여 결정될 수 있다.

본 발명의 백신에서 본 발명의 바이러스의 투여량은 바람직하게는 약 10^1 내지 약 10^9 pfu (플라크 형성 단위), 더욱 바람직하게는 약 10^2 내지 약 10^8 pfu, 그리고 가장 바람직하게는 약 10^3 내지 약 10^7 pfu이다. 본 발명의 백신 안에 본 발명의 플라스미드의 투여량은 바람직하게는 약 0.1mg 내지 약 100mg, 더욱 바람직하게는 약 1mg 내지 약 10mg, 더 더욱 바람직하게는 약 10mg 내지 약 1mg이다. 본 발명의 백신 안에 본 발명의 감염성 DNA 분자의 투여량은 바람직하게는 약 0.1mg 내지 약 100mg, 더욱 바람직하게는 약 1mg 내지 약 10mg, 더 더욱 바람직하게는 약 10mg 내지 약 1mg이다. 본 발명의 백신 안에 본 발명의 바이러스 벡터의 투여량은 바람직하게는 약 10^1 pfu 내지 약 10^9 pfu, 더욱 바람직하게는 약 10^2 pfu 내지 약 10^8 pfu, 그리고 더 더욱 바람직하게는 약 10^3 내지 약 10^7 pfu이다. 적합한 투약량(dosage) 크기는 약 0.5 ml 내지 약 10 ml, 그리고 더욱 바람직하게는 약 1 ml 내지 약 5 ml이다.

[0112] 본 발명의 실시예 따른 바이러스 단백질 또는 펩티드 백신의 적합한 투여량은 각각의 물질에 대해 인정된 방법으로 결정되는 보조제의 양과 함께, 일반적으로 투여량 당 1 내지 50 마이크로그램 범위, 또는 보다 많은 양의 범위가 되는데, 이는 표준 방법에 의해 결정될 수 있다. 돼지의 백신접종에 관한 본 발명의 바람직한 예에서,

동물에 대한 최적 연령 표적은 약 1 일에서 21 일 사이이며, 이는 젖떼는 시기에 *미코플라스마 히오뉴모니에* (*mycoplasma hyopneumoniae*) 또는 PCV에 대항한 다른 일정의 백신접종에 또한 대응할 수 있다. 추가적으로, 번식 암태지를 위한 바람직한 백신접종 일정은 연간 재접종 계획과 비슷한 투여량을 포함할 것이다.

[0113] 적절한 면역 반응이 달성되었는지 여부를 검출하는 한 가지 방법은 백신접종 후 동물에서 혈청 전환 및 항체 역가(titer)를 측정하는 것이다. 백신접종시기와 부스터(boosters)의 횟수는 의사와 수의사가 결정하는 것이 바람직하며, 그 중 일부는 위에 설명된 모든 관련 요인의 분석을 토대로 결정된다.

[0114] 본 발명의 바이러스, 감염성 RNA 분자, 플라스미드 또는 바이러스 벡터의 유효 투여량은 백신접종되는 동물의 체중과 같은 당업자에 의해 결정될 수 있는 인자를 고려하여, 공지된 기술을 사용하여 결정될 수 있다. 예로서, 백신은 경구, 비경구, 피내, 피하, 근육 내, 비강 내 또는 정맥 내로 전달될 수 있다. 경구 전달은 예를 들어, 동물의 사료 또는 음료에 조성물을 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 백신 투약량에 영향을 미치는 요소에는 예를 들어, 돼지의 체중과 나이가 포함된다.

[0115] 본 발명은 본원에서 기술된 PRRS 바이러스, 감염성 RNA 분자, 플라스미드, 또는 바이러스 벡터를 포함하는 백신을 준비하는 방법을 또한 제공하는데, 이 방법은 본 발명의 상기 PRRS 바이러스, 감염성 RNA 분자, 플라스미드, 또는 바이러스 벡터 중 임의의 하나의 효과량과 약학적 또는 수의학적 사용을 위해 허용되는 운반체를 복합시키는 것을 포함한다.

[0116] 또한, 본 발명의 감쇠화된 생백신은 공지된 재조합 기술을 이용하여 PRRS 바이러스 게놈에 삽입되는 이중성 항원 에피토프를 인코딩하기 위하여 U.S. 특허 6,500,662에 기술된 바와 같이 변형된다. U.S. 특허 7,132,106 참고, 이는 전문의 본원의 참고자료에 편입된다. 본 발명의 이중성 항원 에피토프로 유용한 항원 에피토프는 PRRS 바이러스 이외의 돼지 병원균으로부터 유래된 항원 에피토프를 포함하는데, 예를 들면 다음의 것으로 구성된 군에서 선택된 항원 에피토프를 포함하나, 이에 국한되지 않는다: 돼지 파르보바이러스, 돼지 쉰크코바이러스, 돼지 로타바이러스, 돼지 인플루엔자, 가성광견병 바이러스, 전염성 위장염 바이러스, 돼지 호흡기 코로나바이러스, 전통적인 돼지 열 바이러스, 아프리카 돼지 열 바이러스, 뇌척수막염 바이러스, 돼지 파라믹소바이러스, 토크 테노 바이러스, *악티노바실러스 플루로뉴모니에*(*Actinobacillus pleuropneumoniae*), *악티노바실러스 수이스*(*Actinobacillus suis*), *바실러스 안트라키스*(*Bacillus anthracis*), *보르데텔라 브론키셉티카*(*Bordetella bronchiseptica*), *클로스트리듐 아에모리티쿰*(*Clostridium haemolyticum*), *클로스트리듐 페르프링겐스*(*Clostridium perfringens*), *클로스트리듐 테타니*(*Clostridium tetani*), *대장균*(*Escherichia coli*), *에리시페로트릭스 뉴시오타티에*(*Erysipelothrix rhusiopathiae*), *헤모필러스 파라수이스*(*Haemophilus parasuis*), *렙토스피라 종*(*Leptospira spp.*), *미코플라스마 히오뉴모니에*(*mycoplasma hyopneumoniae*), *미코플라스마 히리니스*(*Mycoplasma hyorhinis*), *미코플라스마 효시노비아*(*Mycoplasma hyosynoviae*), *파스튜렐라 톨토시다*(*Pasteurella multocida*), *살모넬라 콜레라수이스*(*Salmonella choleraesuis*), *살모넬라 티리뮤리움*(*Salmonella typhimurium*), *스트렙토코커스 에퀴스밀리스*(*Streptococcus equismitis*), 그리고 *스트렙토코커스 수이스*(*Streptococcus suis*). 전술한 돼지 병원균으로부터의 항원성 에피토프를 인코딩하는 염기 서열은 당업계에 공지되어 있으며, (USA) National Center for Biotechnology Information의 Genbank와 같은 세계적 웹상의 공개 유전자 데이터베이스로부터 획득할 수 있다.

[0117] 본 발명의 추가적인 특징 및 변형은 상세한 설명을 포함하여 본 출원의 전체에서 당업자에게 명백할 것이며, 그러한 모든 특징은 본 발명의 양태로서 의도된다. 마찬가지로, 본 명세서에 설명된 본 발명의 특징들은 특징들의 조합이 본 발명의 양상 또는 실시예로서 구체적으로 언급되었는지 여부에 관계없이, 본 발명의 양상들로서 의도되는 추가 실시예들로 재조합될 수 있다. 또한, 본 발명에서 중요하게 여기에 기술된 그러한 제한은 그 자체로 간주되어야 하고; 본 명세서에 임계적으로 기술되지 않은 제한이 없는 본 발명의 변형은 본 발명의 양태로서 의도된다. 본 발명은 전술한 설명 및 실시예에서 특별히 기술된 것과 다르게 실시될 수 있음이 명백할 것이다.

[0118] 따라서, 서열 번호:5 바이러스에 기초한 PRRS 백신은 출생 당일과 같은 초기에 새끼 돼지의 성공적인 백신접종을 허용하고, 생후 약 6 개월까지 면역력이 장기간 지속되는, 상당한 개선을 제공하는 안전성 및 효능 프로파일을 갖는 대표적인 것으로 여겨질 것이며, 이러한 백신 성능의 전례없는 개선은 돼지 숙주에서 바이러스의 적절하고 안전한 복제를 허용하면서 필요한 숙주 면역 반응을 하향 조절하지 않는 것을 포함하는, 돼지 생물학과의 관련성을 최대화하는 세포 배양 환경에서 바이러스를 배양하고, 감쇠시킴으로써 제공되는 것이다. 이러한 혜택은 새끼 돼지, 멧돼지, 암태지 및 새끼 (임신 전과 임신 중)에 그리고 그 동물이 백신접종시점에 혈청양성인지 또는 혈청음성인 모든 경우에 제공된다.

[0119] 본 발명의 배양 개선은 재조합 수단에 의해 조작되었거나 조작될 예정인 것이건 상관없이, 또는 단리, 유지 또

는 배양되고 일차 비-재조합 수단에 의해 적응되었는지에 관계없이, 유럽 PRRS 바이러스에 동등하게 적용 가능하다는 것이 또한 명백하며; 사용된 배양 세포가 재조합체인지 아닌지를 포함하여 모든 경우에 사용된다.

[0120] 본 발명의 많은 수정 및 변형이 상기 교시에 비추어 가능하며, 따라서 본 발명의 범위 내에 있다.

[0121] 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것으로서 본 발명을 한정하고자 하는 것은 아니다.

[0122] 실시예 1 BHK21-C12-26 세포주의 생성

[0123] 이들 연구에 사용된 BHK21-C12-26 세포주의 모체인 BHK21-C12 세포주의 생성은 이미 US 9,102,912에 기재되어 있다. 이 특허에서, BHK21-C12 세포주는 실시예 14 및 도 6에서 BHK/CMV/v1 #12로 지칭된다. 간략하게 설명하자면, 일반적으로 사용된 아기 햄스터 신장 세포주 BHK-21은 CMV 프로모터의 제어하에 돼지 (sus) CD163 PRRSV 수용체 유전자의 절두된 변이체 (v1)를 함유하는 플라스미드 pCMV-susCD163v1로 형질감염된다. 이 플라스미드는 또한 대장균 및 포유 동물 세포에서의 선별을 위한 이중 원핵/진핵 프로모터의 조절 하에 카나마이신/네오마이신 내성 유전자를 각각 함유한다. 형질 감염 후, 세포를 96-웰 플레이트에서 G418 (Geneticin, 네오 마이신 유사체) 및 단일 세포 클로닝으로 동시 선택되었다. 생성된 클론 중 하나 (# 12 또는 "C12")는 추후 사용을 위해 선택되었으며, BHK21-C12로 지정되었다.

[0124] BHK21-C12 세포주를 G418 선별 하에 연속적으로 65회 계대 배양하고, PRRSV-허용성 표현형을 유지하였다. 계대 64에서 소수의 세포는 PRRS 바이러스에 감염에서 생존되었는데, 이는 초기 단계의 표현형 불안정성을 나타낸다. 추가적인 단일 세포 클로닝이 수행되었고, 많은 새로운 클론이 PRRSV-허용 표현형 및 일반적인 성장 특성에 대해 평가되었다. 이들 중, 클론 #26은 다른 클론보다 우수하고, 부모 BHK21-C12 세포주보다 우수하여 선정되었다. 클론 #26은 BHK21-C12-26으로 명명되었고, PRRS 바이러스 96V198의 감쇠에 사용되었다.

[0125] 실시예 2 출생후 첫날과 같은 매우 어린 시기에 백신접종을 위하여 안전하고 효과적인 바이러스의 적응 및 배양에 적합한 추가 세포.

[0126] PK-9 세포는 돼지 CD163 유전자 및 네오마이신 내성 유전자의 결실 버전을 인코딩하는 플라스미드로써, PK0809 돼지 신장 세포주를 안정적으로 형질감염시킴으로써 유래된 형질 전환 세포주이다. PK-9 세포주의 구성 및 특성화에 대한 세부 사항은 이전에 기술되어 있다 (U.S. 특허 9,102,912 참고).

[0127] PAM 세포에서 PK-9 세포에서의 성장으로의 제 1 계대 바이러스의 적응은 어려울 수 있으며, 여러 개의 병렬 계통을 가진 여러 시도가 필요하다는 점에 유의해야 한다. 이 경우, 바이러스 뉴클레오펙시드 단백질에 특이적인 FITC-접합된 모노클로날 항체 SDOW17을 사용하여 이중 웰의 면역 형광으로 감염을 모니터링할 수 있다 (Rural Technologies Inc, Brookings South Dakota). 초기 계대는 몇 개의 작은 좌(foci)를 초래할 수 있으며, 새로운 단층의 감염을 시작하기에 충분한 무-세포 바이러스 입자를 생성하지 않는다. 그럼에도 불구하고, 이러한 계대는 감염된 단층을 Accutase (트립신 대체물)로 처리하고, 비-감염된 PK-9 세포의 첨가 여부에 관계없이, 새로운 배양액을 가진 여러 웰에 세포를 재접종함으로써 수행할 수 있다. 이러한 여러 계대 이후에, 어떤 계통은 형광 좌의 빈도와 크기의 명백한 증가를 보여야 한다. 이들 중 일부는 무-세포 바이러스 유체를 사용하여 계대 배양할 수 있는 능력을 획득해야 한다. 일반적으로, 적절한 계대는 알파 인터페론을 저해하는 능력이 감소했다는 것을 증명할 것으로 기대된다.

[0128] 본 발명의 유럽 PRRS 백신의 안전성 및 효능은 바로 이어지는 실시예 3 내지 7을 포함하는 실험 프로토콜 및 데이터에 의해 추가 입증된다.

[0129] 실시예 3 1-일령의 새끼 돼지에게 유럽 PRRS MLV 를 투여하고, 백신접종 후 대략 26주 시점에 추가 유럽 PRRSV 분리주로 후속 공격에 의해 제공되는 면역 기간.

[0130] 이 연구의 목적은 근육 주사 (IM, 그룹 T02) 또는 비강 내 (IN, 그룹 T03) 경로에 의해, 1-일령에 유럽 PRRS 변형 생백신 (서열 번호: 5에 의해 인코딩된 바이러스)으로 백신접종된 돼지에서 백신접종 후 26 주째에 다른 유럽 PRRSV 균주를 사용하여 호흡기 공격을 한 경우 면역 지속 기간 (DOI)을 평가하는 것이었다. 효능을 결정하는 주요 변수는 T01 돼지와 비교하여, 치료 그룹 T02 및 T03의 혈청 (바이러스혈증)에서의 바이러스 부하였다. 폐 병변, 직장 온도, 흘림(shedding), 임상 증상 및 체중을 이차 변수로 비교하였다.

[0131] 1-일령에 T02 및 T03 그룹의 돼지에게 근육 내 (T02) 또는 비강내 (T03) 경로를 통해 IVP의 2mL 용량을 1 회 투여했다. 대조군 (T01)의 돼지는 생리 식염수 2 ml의 근육 내 및 2 ml의 비강내 투여받았다. 백신접종-후 26주 (182 일차) 시점에서, 호흡기 공격으로써 돼지는 EU PRRSV 분리주 01ot/91을 비강내 경로를 통하여 공격받았다 (J. Duran et al., Virus Genes, vol 14 No. 1., 1997, pp 19-29 및 Z. Lu et al., Virology Journal, vol

11, No 42, 2014 참고). 공격 단계에서 혈액 검체, 비강 및 경구 면봉, 임상 관찰 및 직장 온도를 부검 당일까지 3-4 일마다 수집했다. 백신접종 전에, 공격받기 전에, 그리고 부검시 돼지의 체중을 측정했다. 공격-후 9 일 또는 10 일에 돼지를 안락사시키고, 부검했다. 부검시, PRRSV 병변의 존재 여부에 대해 폐를 평가하고 점수를 매겼다. 백신접종 기간 동안 모든 T01 돼지가 PRRSV 혈청음성으로 남아 있었기 때문에, 이 검사가 유효했으며, 교란 질환 인자는 발견되지 않았다.

[0132] IM과 IN 백신접종의 보호 효과는 그룹 간의 혈청 내 바이러스 부하를 비교할 때 관찰되었다. IVP (T02 및 T03)로 백신접종된 두 그룹 모두 접종 후, 모든 샘플링 날짜 (3, 6, 8 및 9/10일은 연구일자 185, 188, 190 및 191/192에 상응함)에 대조군에 비해 바이러스 역가가 유의적으로 낮았다 ($P \leq 0.05$). 효능은 대조군과 비교하여, 백신접종 군에서 코와 입에서 흘림의 유의적 감소 뿐 아니라 부검시 PRRSV 관련 폐 병변의 유의적 감소로 뒷받침되었다.

[0133] 백신접종 군 간의 비교에서, 항원 투여 후 3 일째에 IN 경로 (T03)로 백신접종된 그룹은 IM 경로에 의해 백신접종된 그룹 (T02)과 비교하여, 바이러스혈증, 코 흘림 및 경구 흘림이 유의적으로 낮았다. 이 결과는 본 연구의 조건 하에서 IN 백신접종 후 얻은 보호가 IM 백신접종보다 더 강력함을 나타낸다.

[0134] 백신접종은 접종 후 28 일 이내에 PRRSV 특이적 항체의 발생을 유도했다. 모든 백신접종 돼지는 접종 (백신접종 후 26 주)시 PRRS 항체에 혈청양성 반응을 나타내었고, 두 경로 모두 백신접종에 대한 강력하고, 방어적인 항체 반응을 유도할 수 있음을 나타낸다. 그러나, 공격시 검출된 항체 역가의 수준은 IN 경로에 의해 백신접종된 군에서 근육 주사로 접종된 군에 비해 유의적으로 높았으며, 이 사실은 항원 투여 후 3 일째에 IM 군과 비교하여 IN 군에서 혈청 및 배설 경로 모두에서 검출된 바이러스 부하의 유의적인 감소를 설명할 수 있다.

[0135] 결론적으로, 근육 내 또는 비내 경로에 의해 1-일령된 돼지에게 $2.5 \log_{10}$ CCID₅₀의 투여량을 함유하는 EU PRRSV MLV 백신 (서열 번호: 5)의 단일 투여는 6.5 개월 (26 주)의 보호성 면역 기간을 부여한다는 것이 본 연구로부터의 결과로부터 설명된다.

[0136] 실시예 3-7에서 사용된 약어는 다음을 포함한다: AAALAC, 실험실 동물 관리 평가 및 인증 협회; AE, 부작용; CCID₅₀, 세포 배양 감염성 투여량 50%; CP, 대조군 산물; DC, 공격일; DCF, 데이터 캡처 양식; DRAC, 일일 검토 동물 관리; ID, 식별증; IF, 면역 형광법; IM, 근육내; IN, 비강내; IV, 정맥내; IVP, 조사용 수의용 산물; MDA, 모체 유도 항체; MLV, 변형된 생 백신; MSF, 주요 연구 화일; MSV, 마스터 씨드 바이러스; NA, 적용불가; PAM, 돼지 폐포 대식세포; PRRSV, 돼지 생식기 및 호흡기 증후군 바이러스; PBS, 인산 완충 염수; RT-qPCR, 정량적 역전사 중합 효소 연쇄 반응; SART, 아픈 동물 보고서 및 치료; SOP, 표준 작동 절차; S/P, 양성 시료; 그리고 TBD, 결정되어야 함.

[0137] 기획

그룹	처리 상세	투약량 (실제 역가)	경로	투여일	공격일 (DC)	공격 투여량 (실제 역가)	연구 종료 (DN)	N
T01	CP	2 mL + 2 mL	IM + IN	D0	D182	$5.7 \log_{10}$ CCID ₅₀ /돼 지	D191/ D192	20
T02	IVP	$2.2 \log_{10}$ CCID ₅₀ /2.0 mL	IM	D0	D182		D191/ D192	18
T03	IVP	$2.2 \log_{10}$ CCID ₅₀ /2.0 mL	IN	D0	D182		D191/ D192	17

[0138]

[0139] 1-일령에, CP의 2 mL 용량 (IM 경로) 및 2 mL 용량 (IN 경로)을 T01 새끼 돼지에 투여하였다. 또한, IM 경로로 T02 새끼돼지에 2.0 mL의 IVP 투여하였고, IN 경로로 T03 새끼돼지에 IVP 2.0 mL 투여하였다. 백신접종 후, 26 주 동안, 돼지에게 PRRSV Olot/91을 접종하고 공격 후 9-10 일에 안락사시키고, 부검하였다. 0 일차= 백신접종 일.

[0140] 무작위화(Randomisation)

[0141] 출생 직후, 새끼 돼지가 교배-육성되었으므로, 모든 암태지를 대상으로 새끼 돼지가 무작위로 번식되었다. 젖떨 때 암태지를 떼어놓고, 새끼 돼지를 출생 농장의 우리에 넣었다 (처치 당 1개 우리).

[0142] 동물의 특정 매개 변수는 다음과 같다 :

종/번식:	돼지 교배
0 일차에 처음 나이:	1 일령(24±12 h)
0 일차에 처음 체중	NA
성별:	암컷과 수컷
출처:	Farm Cal Marqués Zoetis Manufacturing & Research Spain S.L. Ctra Camprodon s/n Finca "La Riba" 17813 Vall de Bianya (Girona), Spain
혈청학적 상태:	PRRSV 에 대한 혈청반응음성
생식 상태:	NA
식별 방법:	귀 꼬리표
소유주:	Zoetis Manufacturing & Research Spain S.L.

[0143]

[0144] 12 마리의 임신 암태지를 사용하여 총 117 마리의 새끼 돼지를 얻었다. 예상 분만일 전날, 클로프로스테놀 (Cyclix® Porcino, Virbac)을 근육 주사하여 분만을 유도하였다. 모든 암태지는 그 다음날(D-1) 분만했다. 분만 기간과 사산 새끼 돼지 수를 줄이기 위해, 2 마리를 제외한 모든 암태지 (이미 분만을 마친 두 마리 제외 71 및 78번)에게 옥시토신(Partovet® DFV)을 주사하였다.

[0145] 상기 백신접종단계에서 8 마리의 새끼 돼지는 죽거나 안락사했다. 나머지 109 마리의 새끼 돼지들 중 55 마리가 본 연구 대상이었다.

[0146] 노년에 수컷 돼지의 공격적이고, 성적인 행동을 줄이기 위해 새끼 돼지를 부위-특이적인 동물 복지 절차에 따라 6-일령에 거세시켰다. 3 마리의 새끼 돼지 (232, 284, 286)는 음낭 탈장이 있었기 때문에 거세할 수 없었다.

[0147] 백신접종 후, 약 1 개월 만에 바닥에 흰 반점이 있는 동일한 병리학적 소견을 보인 2 마리의 급사와, 배뇨 과정의 마지막에 흰 소변을 보인 일부 돼지는 요로 감염시키는 박테리아 감염을 암시했다. 모든 동물이 치료에 잘 반응하고, 나머지 백신접종 단계(공격까지 그 다음 3개월)에서는 다른 것들이 나타나지 않았기 때문에 이 과정은 연구 결과에 영향을 미치지 않는 것으로 간주된다. 동물의 건강과 결과 평가에 영향을 줄 수 있는 시험 절차와 관련이 없는 상해 또는 임상 질환을 가진 동물은 조사자의 재량에 따라 연구에서 철회될 수 있다. 조사용 수의용 제품 (IVP)은 동결 건조된 분획으로부터 제공되었으며, 이를 2.5 log₁₀CCID₅₀/mL (서열 번호: 5 바이러스)의 식염수에 재현탁되었다.

[0148] 재구성

[0149] 0 일째, IVP를 백신 희석제 (로트 T22019)로 희석하여, 표적 역가와 일치시켰다 (2.5 log₁₀ CCID₅₀/2 mL). 복용량을 확인하기 위하여, BHK-21-C12-26 세포에서 1 회 분량의 IVP를 수거하였다. 추가로 IVP 샘플을 동결시키고 (-80 ± 10°C) 보존 샘플로 보관한다. BHK-21-C12-26 세포에서의 적정은 로컬 표준 절차에 따라 수행되었다. 재구성되고, 희석된 백신은 10^{1.9} CCID₅₀/mL의 역가를 보유하고, 이는 10^{2.2} CCID₅₀/2 mL (2.2 log₁₀CCID₅₀ /2 mL)에 상응한다. 0 일째, IVP를 백신 희석제 (로트 T22019)로 희석하여, 표적 역가와 일치시켰다 (2.5 log₁₀ CCID₅₀/2 mL). 복용량을 확인하기 위하여, BHK-21-C12-26 세포에서 1 회 분량의 IVP를 수거하였다. 추가로 IVP 샘플을 동결시키고 (-80 ± 10°C) 보존 샘플로 보관한다. BHK-21-C12-26 세포에서의 적정은 로컬 표준 절차에

따라 수행되었다. 재구성되고, 희석된 백신은 $10^{1.9}$ CCID₅₀/mL의 역가를 보유하고, 이는 $10^{2.2}$ CCID₅₀/2 mL ($2.2 \log_{10}$ CCID₅₀ /2 mL)에 상응하며, 대조 산물 (CP)은 백신 희석제 (염수 용액)이며, 4.0 mL (2.0 mL IM+2.0 mL IN)로 투여되었다.

[0150] 0 일째에, 기재된 바와 같이 새끼돼지에 IVP 또는 CP를 백신접종하였다. T01 및 T02 그룹 새끼돼지의 목 우측으로 근육내 주사하였다. T01 및 T03 그룹 새끼돼지에게 콧구멍당 1.0 mL을 제공하도록 비강내 주사하였다.

[0151] 공격 투여

[0152] 105.7 CCID₅₀/2 mL의 역가로 Olot/91 바이러스를 각 콧 구멍에 1.0 mL 공격 물질을 주입하여, 2.0 mL의 총 공격 용적으로 모든 돼지의 비강 내 투여 (IN)를 통하여 돼지를 공격하였다.

[0153] 결과-바이러스혈증

[0154] 백신접종 전 (D0)과 공격 전 (D181)에 모든 돼지의 혈청은 RT-qPCR PRRSV 음성이었다. 공격 후, T01 그룹의 돼지 100%는 185 일 시점(공격-후 3 일, DC+3)에 바이러스혈증(viremic)이 되어, 연구가 끝날 때까지 양성을 유지했다. 백신접종 군에서 돼지의 100% (T02 군)와 88% (T03)도 DC+3 시점에서 양성이었다. 그러나, 두 백신 군에서 양성 돼지의 백분율은 대조군 T01에 비해 DC+8 및 부검 일 (DN)에서 현저히 낮아지고 감소했다.

[0155] 두 백신접종 군 모두에서, 혈청에서 검출된 바이러스 부하의 양은 공격 이후 모든 샘플링 일에서 그룹 T01에 비해 유의하게 감소되었다. 185 일째에 (DC+3), T02와 관련하여 T03 군에서도 바이러스 성 역가가 유의하게 감소되었다. 표 1은 공격 이후 10 일 동안의 바이러스 혈장 결과를 요약한 것이다.

표 1

표 1. 그룹 별 및 연구 일별 (공격 단계 데이터)의 바이러스 혈증 결과 요약

그룹	연구 일짜	N	최소 제곱 평균	Log ₁₀ RNA 복사체/혈청 ml			상부(Upper) 95% CB	바이러스 혈증성 동물 %
				SE	범위	하부(Lower) 95% CB		
T01	D181 (DC-1)	20	1.69	0.18	1.70 내지 1.70	1.31	2.08	0.0
T02	D181 (DC-1)	18	1.71	0.18	1.70 내지 1.70	1.33	2.09	0.0
T03	D181 (DC-1)	17	1.70	0.26	1.70 내지 1.70	1.17	2.22	0.0
T01	D185 (DC+3)	20	6.47	0.18	5.28 내지 7.95	6.09	6.85	100.0
T02	D185 (DC+3)	18	5.77	0.18	3.94 내지 7.13	5.38	6.15	100.0
T03	D185 (DC+3)	17	5.04	0.26	1.70 내지 7.28	4.51	5.57	88.2
T01	D188 (DC+6)	20	5.24	0.18	3.89 내지 6.40	4.86	5.62	100.0
T02	D188 (DC+6)	17	3.95	0.18	1.70 내지 5.86	3.56	4.34	94.1
T03	D188 (DC+6)	17	3.73	0.26	1.70 내지 5.45	3.20	4.26	82.4
T01	D190 (DC+8)	20	4.62	0.18	2.91 내지 6.58	4.24	5.00	100.0
T02	D190 (DC+8)	17	2.12	0.18	1.70 내지 4.17	1.74	2.51	35.3
T03	D190 (DC+8)	17	2.22	0.26	1.70 내지 4.48	1.70	2.75	29.4
T01	D191/192 (DN)	20	5.90	0.18	4.51 내지 7.35	5.52	6.28	100.0
T02	D191/192 (DN)	17	2.06	0.18	1.70 내지 3.41	1.68	2.45	35.3
T03	D191/192 (DN)	17	1.99	0.26	1.70 내지 2.95	1.46	2.51	29.4

[0156]

[0157] N: 숫자; SE: 표준 오차; CB: 신뢰 한계; D= 연구일짜; DC: 공격 일짜; DN: 검시 일짜; RT-qPCR 양성: > 1.7 log₁₀ RNA 복사체/ml.

[0158] 코 흘림(Nasal Shedding)

[0159] 모든 돼지는 공격 전 (D181)에 비강 면봉법에서 RT-qPCR PRRSV 음성이었다. 공격 후, T01의 모든 돼지는 코 흘림을 시작했다. 백신접종을 받은 그룹에서 코 흘림 돼지의 비율은 94% (T02 그룹)와 88% (T03 그룹)였다. T01 군과 관련하여, T03 군에서 185 일, 188 일 그리고 191/192 일 (DC+3, DC+6 및 DN), 그리고 T02 군에서 191/192 (DN)일에 코-흘림(nasal shedders) 백분율의 유의적인 감소가 관찰되었다. 백신접종 군간에 코-흘림 비율에서 유의적인 차이는 없었다. 코 흘림을 통한 바이러스의 양은 DC+6 및 DN 시점에서 T02 그룹과 DC+3, DC+6 및 DN 시점에서 T03과 비교하여 T01 그룹이 현저히 높았다. 백신접종 군 간의 비교에서 DC+3 시점에서 T03에 비해 T02 군에서 유의하게 높은 바이러스 역가가 나타났다. 표 2은 공격 이후 10 일 동안의 코-흘림 결과를 요약한 것이다.

표 2

표 2. 그룹 별 및 연구 일별 (공격 단계 데이터)의 코-홀림 결과 요약

그룹	연구 일짜	N	최소 제공 평균	Log ₁₀ RNA 복사체/ml			코-홀림	
				SE	범위	하부(L ower) 95% CB	상부(U pper) 95% CB	돼지(nas al shedder s) %
T01	D181 (DC-1)	20	1.70	0.19	1.70 내지 1.70	1.32	2.08	0.0
T02	D181 (DC-1)	18	1.68	0.20	1.70 내지 1.70	1.28	2.08	0.0
T03	D181 (DC-1)	16	1.69	0.21	1.70 내지 1.70	1.27	2.11	0.0
T01	D185 (DC+3)	20	4.61	0.19	3.70 내지 5.51	4.23	4.99	100.0
T02	D185 (DC+3)	18	4.66	0.20	1.70 내지 6.49	4.26	5.06	88.9
T03	D185 (DC+3)	17	3.35	0.21	1.70 내지 5.44	2.94	3.75	70.6
T01	D188 (DC+6)	20	4.36	0.19	3.44 내지 5.25	3.98	4.75	100.0
T02	D188 (DC+6)	17	3.33	0.21	1.70 내지 5.21	2.92	3.74	94.1
T03	D188 (DC+6)	17	3.02	0.21	1.70 내지 5.22	2.62	3.43	76.5
T01	D190 (DC+8)	20	2.21	0.19	1.70 내지 3.69	1.83	2.59	40.0
T02	D190 (DC+8)	17	2.39	0.21	1.70 내지 4.73	1.98	2.80	35.3
T03	D190 (DC+8)	17	2.21	0.21	1.70 내지 3.92	1.80	2.61	35.3
T01	D191/192 (DN)	20	2.55	0.19	1.70 내지 5.98	2.17	2.94	50.0
T02	D191/192 (DN)	17	1.81	0.21	1.70 내지 3.25	1.40	2.22	11.8
T03	D191/192 (DN)	17	1.82	0.21	1.70 내지 2.84	1.41	2.22	11.8

[0160]

[0161] N: 숫자; SE: 표준 오차; CB: 신뢰 한계; D= 연구일짜; DC: 공격 일짜; DN: 검시 일짜; RT-qPCR 양성: > 1.7 log₁₀ RNA 복사체/ml.

[0162] 경구-홀림(Oral Shedding)

[0163] 모든 돼지는 공격 전 (D181)에 구강 면봉법에서 RT-qPCR PRRSV 음성이었다. 공격 후 T01, T02 및 T03 그룹에서 경구-홀림 돼지의 비율은 각각 9/20 (45%), 8/18 (44%) 및 7/17 (41%)이었다. 연구가 끝날 때까지 T02 그룹의 모든 돼지와 T03 그룹의 모든 돼지는 구두 면봉법에서 음성이었다. 대조군 T01에서 5/20은 그 당시에 여전히 양성이었으며; T01과 T02 사이의 경구-홀림 비율의 차이는 연구 종료 시점 (DN)에서 통계적으로 유의했다. 구강 경로에 의해 홀리는 바이러스 양은 부검일(공격 후 9/10 일에 상응함) 시점에서 T03 그룹과 비교하여 T01 그룹이 현저하게 높았다 바이러스 부하는 185 일 (DC+3) 시점에서 T01과 T03과 비교하여 T02 군에서 유의하게 높았다. 표 3은 공격 이후 10 일 동안의 경구-홀림 결과를 요약한 것이다.

표 3

표 3. 그룹 별 및 연구 일별 (공격 단계 데이터)의 경구-홀림 결과 요약

그룹	연구 일짜	N	최소 제공 평균	SE	Log ₁₀ RNA 복사체/ml		하부(L ower) 95% CB	상부(U pper) 95% CB	경구- 홀림 돼지(oral shedder s) %
					범위				
T01	D181 (DC-1)	20	1.70	0.07	1.70 내지 1.70		1.57	1.83	0.0
T02	D181 (DC-1)	18	1.70	0.12	1.70 내지 1.70		1.45	1.95	0.0
T03	D181 (DC-1)	17	1.70	0.08	1.70 내지 1.70		1.54	1.86	0.0
T01	D185 (DC+3)	20	1.79	0.07	1.70 내지 2.71		1.66	1.93	10.0
T02	D185 (DC+3)	18	2.17	0.12	1.70 내지 5.65		1.92	2.42	27.8
T03	D185 (DC+3)	17	1.79	0.08	1.70 내지 2.52		1.64	1.95	11.8
T01	D188 (DC+6)	20	1.85	0.07	1.70 내지 2.86		1.72	1.98	15.0
T02	D188 (DC+6)	17	1.95	0.13	1.70 내지 2.59		1.70	2.20	23.5
T03	D188 (DC+6)	17	2.11	0.08	1.70 내지 3.66		1.95	2.26	35.3
T01	D190 (DC+8)	20	1.70	0.07	1.70 내지 1.70		1.57	1.83	0.0
T02	D190 (DC+8)	17	1.75	0.13	1.70 내지 1.70		1.49	2.00	0.0
T03	D190 (DC+8)	17	1.70	0.08	1.70 내지 1.70		1.54	1.86	0.0
T01	D191/192 (DN)	20	1.95	0.07	1.70 내지 3.16		1.81	2.08	25.0
T02	D191/192 (DN)	17	1.73	0.13	1.70 내지 1.70		1.48	1.99	0.0
T03	D191/192 (DN)	17	1.72	0.08	1.70 내지 2.00		1.56	1.87	5.9

[0164]

[0165] N: 숫자; SE: 표준 오차; CB: 신뢰 한계; D= 연구일짜; DC: 공격 일짜; DN: 검시 일짜; RT-qPCR 양성: > 1.7 log₁₀ RNA 복사체/ml.

[0166] 임상 관찰

[0167] 모든 돼지는 공격 후 전체 기간 동안 비정상 상태, 우울증, 호흡 곤란, 기침 또는 재채기를 보였다.

[0168] 직장 온도

[0169] 표 4는 공격-후 기간 동안 직장 온도 결과를 요약한 것이다. T01 그룹에서, 5/20 돼지 (25%)는 공격-후 기간 동안 적어도 한 번 발열이 있었다 (RT≥40.5). 백신접종 군 T02와 T03에서 접종 후 발열한 돼지의 비율은 각각 8/18 (44%)와 12/17 (71%)이었다. 직장 온도는 185 일 (DC+3) 시점에 T01 그룹과 비교하여 백신접종 그룹 T02와 T03 모두에서 유의하게 높았다.

표 4

표 4. 직장 온도의 요약에 따라 그룹 별 및 연구 일자에 따른 새끼 돼지 결과

그룹	연구 일자	N	직장 온도 (°C)				발열이 있는 돼지 % (RT≥40.5)	
			LSM	SE	범위	하부(Lower) 95% CB	상부(Upper) 95% CB	
T01	D182 (DC)	20	39.5	0.09	39 내지 40.32	39.3	39.7	0.0
T02	D182 (DC)	18	39.7	0.13	39 내지 40.85	39.4	39.9	5.6
T03	D182 (DC)	17	39.7	0.12	38.94 내지 40.43	39.4	39.9	0.0
T01	D185 (DC+3)	20	39.9	0.09	39.06 내지 40.82	39.7	40.1	5.0
T02	D185 (DC+3)	18	40.3	0.13	39.39 내지 41.54	40.1	40.6	33.3
T03	D185 (DC+3)	17	40.4	0.12	39.3 내지 41.14	40.1	40.6	52.9
T01	D188 (DC+6)	20	40.0	0.09	39.14 내지 40.8	39.8	40.1	25.0
T02	D188 (DC+6)	17	40.1	0.14	39.14 내지 41.02	39.9	40.4	29.4
T03	D188 (DC+6)	17	40.2	0.12	39.36 내지 41.38	39.9	40.4	29.4
T01	D190 (DC+8)	20	39.5	0.09	38.9 내지 40.26	39.3	39.7	0.0
T02	D190 (DC+8)	17	39.7	0.14	39.02 내지 40.75	39.4	39.9	5.9
T03	D190 (DC+8)	17	39.6	0.12	39.07 내지 40.86	39.4	39.9	17.6
T01	D191(DC+9)	20	39.5	0.09	38.85 내지 39.95	39.3	39.7	0.0
T02	D191(DC+9)	17	39.7	0.14	39.02 내지 40.2	39.4	40.0	0.0
T03	D191(DC+9)	17	39.7	0.12	38.9 내지 41.15	39.5	40.0	5.9

[0170]

[0171] LSM: 최소 제곱 평균; SE: 표준 오차; CB: 신뢰한계; RT: 직장 온도

[0172] 폐 병변

[0173] 각 치료 군에 대한 병변이 있는 폐의 백분율을 표 5에 나타내었다. 폐 시각적 점수는 표 6에 표시된다. 부검에서, 대조군 T01의 18/20 돼지 (90%)는 양성 폐 시각적 점수를 나타내며, 이는 PRRSV 공격으로 폐 병변이 성공적으로 유도되었음을 나타낸다. T02와 T03 그룹에서 12/17 (71%)와 7/16 (44%) 돼지도 양성을 보였다. T03 군 (# 300)의 돼지 한 마리는 우 폐엽의 10 ~ 70%, 좌측 폐엽의 2 ~ 30%, 부속 엽(lobe)의 70%에 영향을 미치는 카제랄(catharral)-화농성 늑막폐렴을 보였고, 임의의 잠재적 PRRSV 관련 병변의 존재를 감추었다. 이 폐지의 데이터는 분석에서 표시되었다 (MSF의 플래깅 리포터 참조). 부검시 병변이 있는 폐의 백분율은 백신접종 군 T02 및 T03에 비해 대조군 T01에서 유의하게 높았다. 백신접종된 그룹간에 차이는 발견되지 않았다.

표 5

표 5. 병변이 있는 폐의 백분율 요약

그룹	N	역 변환된 LSM*	SE	하부 95% CB	상부(Upper) 95% CB	범위
T01	20	3.7 ^A	0.61	2.6	5.0	0.2 내지 13.5
T02	17	1.0 ^B	0.35	0.5	1.9	0.0 내지 4.4
T03	16	0.7 ^B	0.30	0.2	1.5	0.0 내지 5.2

* 상이한 윗첨자 문자는 통계적으로 유의미한 차이를 나타낸다.

[0174]

표 6

표 6. 치료 그룹 별 폐 시각적 점수

그룹	시각적 점수								총 관찰
	0		1		2		3		
	(병변 없음)		(약간의 병변)		(중간 수준의 병변)		(심각한 병변)		
	숫자	%	숫자	%	숫자	%	숫자	%	숫자
T01	2	10.0	17	85.0	1	5.0	0	0.0	20
T02	5	29.4	12	70.6	0	0.0	0	0.0	17
T03	9	56.3	7	43.8	0	0.0	0	0.0	16

[0175]

[0176] 혈청학 (ELISA) 결과

[0177] 혈청학 결과의 요약은 표 7에 나와있다. 백신접종 단계에서 월별 간격으로 수집된 샘플로부터 얻은 ELISA 결과는 산술 통계 (기하 평균 및 표준 편차)로 요약되며; 실험 단위의 반복이 없었기 때문에(치료법은 혼합하지 않았다). 그룹간 차이를 평가할 수 없었다. 그룹 사이의 차이는 공격 단계를 위해 동물들을 섞은 후 181 일 시점의 연구 일에만 시험되었다. 백신접종 전에 모든 돼지는 ELISA 음성이었다 (IDEXX S/P 비 <0.4). 대조군 T01의 돼지는 접종 전까지는 음성이었다. 백신접종 1 개월 후 (28 일), T02와 T03 그룹의 모든 돼지는 PRRSV 항체를 이미 발달시켰으며, 이들 모두는 접종 (백신접종 후 6.5 개월)시점에 여전히 양성이었다. 181 일째 (DC-1)의 그룹 간 비교는 T02 그룹에 비해 T03 그룹에서 항체 역가가 유의하게 더 높은 것을 나타냈다.

표 7

표 7. S/P 비율 ELISA 결과의 요약,

처리 번호	연구 일자	N	기하 평균/LSM*	SD/SE	범위	혈청양성 %
T01	0 일차	20	0.023 ₄₉	0.002	-0.019 내지 0.239	0.0
T02	0 일차	18	0.006	0.000	-0.015 내지 0.140	0.0
T03	0 일차	17	0.001	0.000	-0.018 내지 0.100	0.0
T01	28 일차	20	-0.013	-0.000	-0.025 내지 0.018	0.0
T02	28 일차	18	2.487	0.174	2.112 내지 2.923	100.0
T03	28 일차	17	2.496	0.218	2.022 내지 3.037	100.0
T01	56 일차	20	-0.010	-0.001	-0.079 내지 0.182	0.0
T02	56 일차	18	2.366	0.832	-0.078 내지 3.591	94.4
T03	56 일차	17	2.523	0.317	1.656 내지 3.452	100.0
T01	83 일차	20	0.011	0.000	-0.013 내지 0.080	0.0
T02	83 일차	18	2.249	0.328	1.556 내지 2.852	100.0
T03	83 일차	17	2.281	0.322	1.582 내지 3.162	100.0
T01	113 일차	20	0.042	0.001	-0.003 내지 0.091	0.0
T02	113 일차	18	1.598	0.333	0.692 내지 2.606	100.0
T03	113 일차	17	1.797	0.360	0.956 내지 2.938	100.0
T01	140 일차	20	0.023	0.001	-0.005 내지 0.118	0.0
T02	140 일차	18	1.270	0.249	0.612 내지 2.076	100.0
T03	140 일차	17	1.461	0.316	0.526 내지 2.534	100.0
T01	168 일차	20	0.034	0.001	-0.002 내지 0.122	0.0
T02	168 일차	18	1.433	0.329	0.709 내지 2.780	100.0
T03	168 일차	17	1.674	0.427	0.677 내지 3.175	100.0
T01	181 일차	20	0.055	0.001	0.006 내지 0.200	0.0
T02	181 일차	18	1.190	0.060	0.477 내지 1.959	100.0
T03	181 일차	17	1.527	0.068	0.665 내지 2.422	100.0

[0178]

[0179] * 0, 28, 56, 83, 113, 140 및 168 일의 결과는 기하 평균 및 표준 편차 (SD)로 표현된다. 역 변환이 있는 181 일차-최소 제곱 평균 (LSM) 및 표준 오류 (SE) ; ELISA 양성:S/P 비율 ≥ 0.4

[0180] 바이러스혈증 및 흡립

[0181] 통계 분석 전에 RT-qPCR을 적절한 대수 변환을 사용하여 변형시켰다. 변환된 데이터는 일반적인 선형 반복 측정 혼합 모델을 사용하여 분석되었다. 시간 대 상호 작용 효과에 의한 치료 또는 치료가 유의할 경우 ($P \leq 0.05$) 매 시점마다 쌍별 치료 비교가 이루어졌다. 치료 최소 제곱 평균과 95% 신뢰 구간이 다시 발표를 위해 역 변형되었다. 동물 바이러스혈증/흡립 백분율을 또한 산출하였다. 각 샘플은 > 50 PRRSV RNA 복사체/mL ($1.7 \log_{10}$ PRRSV RNA copies/mL)인 경우 양성으로 결정되었으며, 이는 기술의 검출 한계의 반에 해당한다 (100 PRRSV RNA 복사체/mL). 또한 동물이 일차 $\leq$ DC (공격 전) 및 일차 $>$ DC (공격 후) 경우, 바이러스혈증 (viremi

c)이거나 흘림이 있는지 여부가 결정되었다. 바이러스혈증 상태에 대한 빈도 표는 각 시점에 대해 계산되었고, 동물이 항원 투여-전 및 투여-후 며칠 동안 바이러스혈증을 나타내었는지를 계산하였다.

[0182] 직장 온도

[0183] 직장 온도는 일반적인 선형 반복 측정 혼합 모델 분석을 사용하여 분석되었다. 시간 대 상호 작용 효과에 의한 치료 또는 치료가 유의할 경우 ($P \leq 0.05$) 매 시점마다 쌍별 치료 비교가 이루어졌다. 치료 최소 제곱은 95% 신뢰 구간을 의미하며, 최소 및 최대는 각 시점에 대해 계산되었다. 산술적 통계, 평균, 표준 편차 및 범위는 각 치료 및 시험 당일, 공격-전에 계산되었다. 발열 (직장 온도 $\geq 40.5^\circ\text{C}$)이 있는 동물의 빈도 분포를 각 치료에 대해 계산하고 시간 데이터를 수집했다. 동물에게 일차 $\leq$ DC와 일차 $>$ DC 일 시점에 열이 있었는지 여부가 결정되었다. 동물이 각 기간, 일차 $\leq$ DC 및 일차 $>$ DC 기간 동안 열이 있었는지에 대해 빈도 표가 산출되었다.

[0184] 혈청학 (ELISA)

[0185] 통계 분석에 앞서 필요한 대수 변환을 사용하여 혈청학을 변환시켰다. 변환된 혈청학 데이터는 일반적인 선형 반복 측정 혼합 모델을 사용하여 분석되었다. 시간 대 상호 작용 효과에 의한 치료 또는 치료가 유의할 경우 ($P \leq 0.05$) 매 시점마다 쌍별 치료 비교가 이루어졌다. 치료 최소 제곱 평균 및 95% 신뢰 구간을 다시 발표를 위해 역변형되었다. 또한, 각 시점에서 각 치료에 대한 양성/음성 결과의 빈도 분포가 계산되었다. 또한, 각 동물에 대해 연구 중 임의 시점에서 혈청전환되었는 지가 (≥ 0.4 S/P 비율) 여부를 결정했다. 혈청 전환 여부에 대한 빈도 분포는 각 치료에 대해 계산되었다. 산술적 통계, 평균, 표준 편차 및 범위는 각 치료 및 공격-전에 계산되었다.

[0186] 임상 관찰

[0187] 공격 이전의 임상 징후 및 공격 후 임상 징후의 빈도 분포를 각각의 처리 및 시간 점 데이터에 대해 개별적으로 계산하였다. 각 단계 (일차 $\leq$ DC 및 일차 $>$ DC)에 대해 동물이 임상적 증상을 보인 적이 있는지 여부에 대한 빈도 분포가 각 치료에 대해 계산되었다.

[0188] 체중

[0189] 체중을 일반 선형 반복 측정 혼합 모델을 사용하여 분석 하였다. 최소 제곱 평균, 표준 오차, 95% 신뢰 구간, 최소값 및 최대 값이 각 시점에서 각 치료에 대해 계산되었다. 치료 효과 및/또는 시간-시점 상호 작용에 의한 치료가 유의적이었다면, 각 시점에서 치료간에 쌍별 치료 비교가 이루어졌다. 추정치의 표준 오차와 95% 신뢰 구간을 계산했다. 산술적 통계, 평균, 표준 편차 및 범위는 각 치료 및 공격-전에 계산되었다. 평균 일일 이득 추정 및 비교는 모델의 매개 변수 추정을 사용하여 계산되었다.

[0190] 폐 병변

[0191] 병변이 있는 총 폐의 백분율은 다음 공식을 사용하여 계산되었다. 병변이있는 총 폐의 백분율 $= (0.10 \times \text{왼쪽 두 개골}) + (0.10 \times \text{왼쪽 중간}) + (0.25 \times \text{왼쪽 꼬리}) + (0.10 \times \text{오른쪽 두 개골}) + (0.10 \times \text{오른쪽 중간}) + (0.25 \times \text{오른쪽 꼬리}) + (0.10 \times \text{부속(accessory)})$. 아크 사인 제곱근 변환(arcsine square root transformation)은 분석하기 전에 병변이 있는 전체 폐의 백분율에 적용되었다. 변형된 폐 병변을 일반적인 선형 혼합 모델로 분석하였다. 치료 효과가 유의적이었다면, 치료군 간에 쌍별 비교가 이루어졌다. 폐 병변이 있는 전체 폐의 백분율의 역 변환된 최소 제곱 평균, 이의 표준 오차, 및 95% 신뢰 구간 뿐만 아니라 최소값과 최대 값도 계산되었다.

[0192] 폐 병변 평가 점수

[0193] 각 병변에 대해 폐 병변 평가 점수의 빈도 분포를 계산하였다. 정규 또는 정상이 아닌 점수는 2 항(binomial) 데이터에 대한 일반 선형 혼합 모델을 사용하여 분석되었다. 일반 선형 혼합 모델이 수렴하지 않으면, Fisher의 Exact 테스트를 사용하여 데이터를 분석한다. 치료의 주 효과가 유의적이었다면, 쌍별 치료 비교가 이루어졌다.

[0194] 분석 모델

[0195] 병변이 있는 전체 폐의 변환 백분율은 고정 효과, 치료, 무작위 효과 펜(pen) 및 펜내에서 블록(block)이 있는 일반적인 선형 혼합 모델을 사용하여 분석되었다. 유의한 ($P \leq 0.05$) 치료 효과에 대한 테스트 후, 선형적 대비에서 매개 변수 추정의 선형 조합을 사용했다. 치료간에 비교가 이루어졌다. 5% 유의 수준 ($P \leq 0.05$)이 통계적 차이를 평가하는 데 사용되었다. 최소 제곱 평균 (역-변환된), 표준 오차, 수단의 95% 신뢰 구간 및 범위는 각 치료에 대해 계산되었다.

- [0196] 바이러스혈증 상태는 고정 효과를 갖는 로짓 링크(logit link): 처리, 시점, 그리고 시점 상호작용에 의한 처리, 그리고 무작위 효과: 펜, 펜내 블록, 그리고 블록내 동물, 펜, 그리고 처리-이는 동물 용어임-와 함께 일반적 선형 반복 측정 혼합 모델로 분석되었다. 유의한 ($P \leq 0.05$) 치료 효과 또는 시점 상호작용에 의한 치료에 대한 테스트 후, 선험적 대비에서 매개 변수 추정치 선형 조합을 사용했다. 각 시점에서 치료간에 비교가 이루어졌다. 5% 유의 수준 ($P \leq 0.05$)이 통계적 차이를 평가하는 데 사용되었다. 평균의 최소 제곱 평균 (역-변형된), 표준 오차 및 95% 신뢰 구간이 각 치료 및 시점에 대해 계산되었고, 모델이 수렴하지 않으면 Fisher의 Exact가 분석에 사용되었다.
- [0197] 폐 평가 점수, 정상/비정상, 그리고 바이러스혈증인지는 고정된 치료 효과, 및 무작위 효과 펜 및 펜내 블록을 갖는 일반화된 선형 혼합 모델로 GLIMMIX를 통하여 분석되었다. 치료의 주 효과가 유의적이었다면, 쌍별 치료 비교가 이루어졌다. GLIMMIX가 수렴하지 않으면 Fisher의 Exact 테스트를 분석에 사용했다.
- [0198] 바이러스 부하, 혈청학, 체중, 그리고 직장 온도는 고정 효과: 처리, 시점, 그리고 시점 상호작용에 의한 처리, 그리고 무작위 효과: 펜, 펜내 블록, 그리고 블록내 동물, 펜, 그리고 처리-이는 동물 용어임-와 함께 일반적 선형 반복 측정 혼합 모델로 분석되었다. 유의한 ($P \leq 0.05$) 치료 효과 또는 시점 상호작용에 의한 치료에 대한 테스트 후, 선험적 대비에서 매개 변수 추정치 선형 조합을 사용했다. 각 시점에서 치료간에 비교가 이루어졌다. 5% 유의 수준 ($P \leq 0.05$)이 통계적 차이를 평가하는 데 사용되었다. 최소 제곱 평균 (바이러스 부하 및 혈청학에 대하여 역-변환된), 표준 오차, 수단의 95% 신뢰 구간 및 범위는 각 치료에 대해 계산되었다. 모든 가설 테스트는 양면 검정법을 사용하여 유의 수준 0.05에서 수행되었다.
- [0199] 논의
- [0200] 따라서, 본 연구의 목적은 1 일령에 근육 내 (IM, 그룹 T02) 또는 비강 (IN, 그룹 T03) 경로를 통하여 백신접종된 돼지는 백신접종-후 26주 시점에서 호흡기 공격으로 유전자형 I PRRS 분리주가 접종되어 EU PRRS 변형된 생백신(서열 번호: 5)의 면역 기간(DOI)을 평가되었다. 효능을 결정하는 주요 변수는 T01 돼지와 비교하여, 치료 그룹 T02 및 T03의 혈청 (바이러스혈증)에서의 바이러스 부하였다. 폐 병변, 직장 온도, 흘림(shedding), 임상 증상 및 체중을 이차 변수로 비교하였다.
- [0201] 백신접종 기간 동안 모든 T01 돼지가 PRRSV 혈청음성으로 남아 있었기 때문에, 이 검사가 유효했으며, 교란 질환 인자는 발견되지 않았다. IM과 IN 백신접종의 보호 효과는 그룹 간의 혈청 내 바이러스 부하를 비교할 때 관찰되었고; 대조군 T01은 공격-후 모든 샘플링 일에 백신접종군 T02 및 T03에 비해 유의하게 높은 바이러스 역가를 가졌다. 또한, 대조군과 관련하여, 백신접종 군에서 공격-후 8 일 및 9/10 일에 바이러스혈증 돼지의 비율이 유의하게 감소되었다. 백신접종된 그룹을 비교할 때, IN 경로 (T03)로 백신접종된 그룹에서 185 일째 (DC+3) 시점에 근육내로 백신접종된 그룹 (T02)과 비교하여 현저하게 낮은 바이러스 역가가 검출되었다. 바이러스 복제에 대한 IM 및 IN 백신접종의 이점은 비강 경로에 의해 흘러나온 바이러스 양 및 코-흘림 백분을 모두에서 백신접종 그룹 모두에서 관찰된 유의적인 감소에 의해 뒷받침되었다. 또한, 대조군과 비교하여 바이러스 부하 (T03 그룹) 또는 구강 면봉법에서 양성 돼지 백분율(T02 그룹)의 유의적인 감소에서 입증된 바와 같이, 공격-후 9/10 일 시점에서 경구-흘림에서 백신접종의 긍정적인 효과가 관찰되었다.
- [0202] 공격 후, DC+3 시점에서 대조군에 비교하여, 직장 온도가 두 백신접종군 모두에서 유의하게 높았다. 그 시점에서, IM과 IN 경로에 의해 IVP로 백신접종된 그룹에서 발열 ($RT \geq 40.5^\circ C$)이 있는 돼지의 비율은 각각 6/18 (33%)와 9/17 (53%)이었다. 대조군에서 DC+3 시점에서 발열은 1/20 (5%)에 불과했다. 그러나, 그 시점 (DC+3)에서, 혈청에서 검출된 바이러스 부하가 대조군과 비교하여 두 백신접종 군 모두에서 실제로 유의 적으로 감소되었다는 것을 언급하는 것은 주목할 만하며, 이는 PRRSV 복제가 공격 직후에 백신접종된 돼지에서 관찰된 직장 온도 상승의 유일한 이유는 아닐 것이라고 제안했다. 또한, 이후로 백신접종 한 돼지의 직장 온도가 낮아졌고, 공격-후 8 일째에 모든 그룹의 직장 평균 기온은 이미 $40^\circ C$ 이하였다.
- [0203] 상승된 직장 온도 외에도, 모든 그룹의 돼지 중 어느 것도 전체 공격-후 기간 동안 PRRSV와 양립되는 임상 증상 (비정상적인 신체 상태, 우울증, 호흡 곤란, 기침 또는 재채기)을 보였다. 또한, 그룹간에 체중이나 평균 일일 체중 증가의 차이는 발견되지 않았다.
- [0204] 부검에서, 대조군 T01의 18/20 돼지 (90%)는 양성 폐 시각적 점수를 나타내며, 이는 PRRSV 공격으로 폐 병변이 성공적으로 유도되었음을 나타낸다. T02와 T03 그룹에서 12/17 (71%)와 7/16 (44%) 돼지도 양성을 보였다. 치료 그룹을 비교한 결과, 백신접종 군에 비해 대조군에서 병변이 있는 폐의 비율이 유의하게 높았고, 이는 투여 경로에 관계없이 PRRSV-관련된 폐 병변을 감소시키는 백신접종의 이점을 입증한다.

- [0205] 혈청학 데이터에 따르면, IM 또는 IN 경로에 의한 IVP 접종은 백신접종 후 28 일 이내에 PRRSV-특이적 항체의 발달을 유도했다. 모든 백신접종 돼지는 접종 (백신접종 후 6.5개월)시 PRRSV 항체에 항체 양성 반응을 나타내었고, 두 경로 모두 백신접종에 대한 강력하고, 방어적인 항체 반응을 유도할 수 있음을 나타낸다. 그러나, 백신접종 그룹 간의 비교는 IM 경로에 의해 백신접종된 그룹에 비해 IN 경로로 백신접종된 그룹에서 유의하게 높은 항체가를 나타냈다.
- [0206] IN과 IM 경로 모두에 의한 백신접종 후, 26 주 시점에 PRRSV 공격에 대한 확실한 보호가 이루어졌지만, 공격-후 3 일째 시점에 그룹 간 비교에서 IN 경로로 백신접종된 그룹 (T03)은 근육 주사로 백신접종된 그룹 (T02)에 비해 바이러스혈증, 코-홀림 및 경구-홀림이 유의적으로 낮았다. 이 결과는 본 연구의 조건 하에서 IN 백신접종 후 얻은 보호가 IM 백신접종보다 더 강력함을 나타낸다. 바이러스 결과에서 이러한 차이는 IM 바이러스 백신접종 군 (S/P 비율 범위:0.477-1.959)과 비교하여, IN 백신접종 군 (S/P 비율 범위:0.665-2.422)에서 공격 전에 ELISA에 의해 검출된 유의적으로 더 높은 항체 역가에 의해 설명될 수 있다.
- [0207] 백신접종 후 26 주에 병원성 EU PRRSV 균주로 공격 후 혈청에서 검출된 바이러스 부하의 유의적인 감소에 의해 알 수 있듯이, IM 또는 IN 경로에 의해 2.5 log₁₀ CCID₅₀의 투여량을 함유한 EU PRRS MLV 백신(서열 번호 5)을 1 일령의 혈청음성 돼지에게 단일 투여한 백신접종은 26 주간의 면역 지속 기간을 부여 하였다. 효능은 또한 검시시 폐 병소의 비율을 현저하게 감소시킬 뿐만 아니라 코-홀림 및 경구-홀림의 감소를 뒷받침하였다.
- [0208] 실험실 방법
- [0209] RT qPCR과 관련하여, 백신접종 (D-1) 전, 공격전(D62), 및 공격-후 3, 5, 7 및 10일차 시점(D66, D68, D70 및 D73)에 수집된 혈청 샘플에 대해 국소 SOP에 따라 수행한 역전사 (RT) qPCR를 사용하여 바이러스혈증 (혈청 내 PRRSV 부하) 및 홀림 (면봉 물질의 PRRSV 부하)을 측정하였다. 요약하면, 정제된 바이러스 RNA를 주형으로 사용하여 50℃에서 30 분 동안 역전사시키고, 95℃에서 5 분 동안 변성시켰다. 반응의 PCR 프로그램은 95℃에서 20 초 동안 변성시키고, 53℃에서 40 초 동안 어닐링하는 40회 사이클로 구성된다. qRT-PCR은 7500 실시간 PCR 시스템 터모사이클러에서 수행되었다. 적절한 프라이머 및 프로브를 Lelystad 바이러스에 대해 다음과 같이 선택하였다 :
- [0210] 포워드 프라이머 (Lelystad F): 5'-GCACCACCTCACCAGAC-3' (서열 번호: 6, 최종 농도 0.5 마이크로몰).
- [0211] 역 프라이머 (Lelystad R): 5'-CAGTTCTGCGCCTTGAT-3' (서열 번호:7, 최종 농도 0.5 마이크로몰).
- [0212] 프로브 (Lelystad S): 5'-6-FAM-CCTCTGCTTGCAATCGATCCAGAC -TAMRA-3' (서열 번호:8, 최종 농도 0.6 마이크로몰).
- [0213] 혈청학 (ELISA)
- [0214] IDEXX PRRS X3 ELISA를 사용하여 제조사의 지시에 따라 백신접종전 (D0), 공격전 (D67) 및 부검 (D77) 시점에 수거된 혈청에서 PRRSV에 대한 항체 검사를 실시하였다. 요약하면, 혈청 샘플을 제조함 PRRSV 항원으로 코팅된 96-웰 플레이트에서 1:40으로 희석하고, 18-26℃에서 30 분 동안 배양하였다. 세척 후, 항-돼지 양고추냉이 과산화효소 접합체를 첨가하고 플레이트를 18-26℃에서 30 분 동안 추가로 배양하였다. 결합되지 않은 접합체가 씻겨져서, TMB 기질이 웰에 첨가되었다. 발색은 650 nm에서 측정되었다. S/P 값은 각 샘플에 대해 기록되었다. S/P 비율이 ≥ 0.4인 경우, 샘플은 PRRS 항체에 대하여 양성으로 분류되었다. S/P 비가 < 0.4인 경우, 샘플은 음성으로 분류되었다. ELISA 지침은 연구 파일에 포함되어 있다.
- [0215] 실시에 4 백신접종-후 4 주 시점에 유럽 PRRS 분리주에 대항하여 2 주령 돼지에게 투여된 변형된 EU PRRSV 생백신의 면역 개시 (OOI)
- [0216] 이 연구의 목적은 백신접종-후 4 주 시점에 PRRSV에 의해 유도된 호흡기 질환의 예방을 위해 2-주령 돼지에게 투여된 실험용 EU PRRSV MLV 백신 (서열 번호: 5 바이러스)의 면역 개시 (Onset of Immunity, OOI)를 평가하는 것이었다. 질환 예방을 결정함에 있어서 주요 변수는 T01 (대조군 제품으로 백신접종)과 비교하여 치료군 T02 (시험 항목으로 백신접종)에서 혈청 내 바이러스 부하였는데, 이는 폐 병변, 코-홀림 및 경구-홀림, 임상적 관찰, 직장 온도 및 체중에 의해 뒷받침되었다.
- [0217] 14 내지 15 일령에서 대조군 제품 (CP) 또는 시험 항목 (TI, 서열 번호: 5 바이러스)의 단일 2.0 mL 투여량을 각 동물에게 근육 내 주사로서 투여 하였다. 백신접종-후 4 주 시점에, 돼지는 호흡기 공격으로써 EU PRRSV 분리주 01ot/91에 의해 비강 내로 공격받았다. 공격 단계에서 혈액 검체, 비강 및 경구 면봉, 임상 관찰 및 직장 온도를 부검 당일까지 2-3 일마다 수집했다. 백신접종 전에, 공격받기 전에, 그리고 부검시 돼지의 체중을 측정

했다. 공격후 10 일 후, 폐지를 마취시키고, 안락사시키고, 부검하였다. 부검시, PRRSV 병변의 존재 여부에 대해 폐를 평가하고 점수를 매겼다. 백신접종 기간 동안 T01 돼지가 PRRSV 혈청음성으로 남아 있었기 때문에, 이 연구는 유효했으며, 교란 질환 인자는 발견되지 않았다.

[0218] 백신접종의 보호 효과는 그룹 간의 혈청 내 바이러스 부하를 비교할 때 관찰되었다. TI를 접종한 그룹 (T02)은 접종 후 모든 샘플링 일자에 대조군에 비해 바이러스 역가가 유의적으로 낮았다.

[0219] 효능은 부검(공격-후 10 일 시점)에서 병변이 있는 폐의 비율의 현저한 감소, 코-홀림 및 경구-홀림의 감소, 그리고 공격-후 7 일 시점에서의 직장 온도 감소에 의해 또한 뒷받침되었다. 체중에서 차이는 발견되지 않았다. 백신접종은 접종 후 4주 이내에 PRRSV 특이적 항체의 발생을 유도했다. 공격후 10 일 시점에서, 항체 역가가 대조군 (T01)에 비해 T02 군에서 유의하게 더 높게 유지되었다. 결론적으로, 2.0 log₁₀ CCID₅₀투여량을 함유한 실험용 EU PRRSV MLV 백신을 14-15-일령의 돼지 (PRRSV에 대한 혈청음성)의 근육으로 단일 투여하면 백신접종 후 4 주 시점에서 병원성 EU PRRS 군주로 공격받은 후 유발된 호흡기 질환에 대항하여 예방되었다. 실험 설계는 다음과 같다:

그룹	백신접종 (0 일차)		공격 (27 일차)		N
	테스트 재료	투여량	테스트 재료	투여량	
T01	대조 산물	2 mL	PRRSV Olot/91	5.4 log ₁₀ CCID ₅₀ /2 mL	20
T02	테스트 아이템	2.0 log ₁₀ CCID ₅₀ /2 mL	PRRSV Olot/91	5.4 log ₁₀ CCID ₅₀ /2 mL	20

[0220]

[0221] 폐지를 다시 우리에게 가두고 27 일째에, 모든 동물은 비강 내 (IN) 경로에 의한 2 ml의 항원 군주 Olot/91로 공격을 받았다. 돼지는 각 콧구멍으로 1.0 mL의 공격 재료를 주입하여 총 2.0 mL의 전체 공격 용적으로 공격받았다. 돼지는 공격 후 몇 초 동안 머리를 들고 있도록 하였다.

[0222] 임상 관찰 및 직장 온도

[0223] 임상 관찰은 일반적인 상태, 기침, 재채기, 기침 및 호흡 곤란을 포함한다. 직장 온도는 현지 표준 절차에 따라 수집되었다. 완전한 임상 검사가 수행되지 않은 날들 (백신접종/공격 접종 전 및 후) 돼지의 일반적인 건강 상태를 관찰하고, 표준 SOP에 따라 일일 검토 동물 관리(Daily Review Animal Care(DRAC)) 양식에 기록했다.

[0224] 부검 및 폐 점수.

[0225] 부검시 다음과 같은 방법으로 폐 병변을 기록하였다: 1) 각 엽(lobe)(왼쪽 두개골, 왼쪽 중간, 왼쪽 꼬리, 오른쪽 두개골, 오른쪽 중간, 오른쪽 꼬리 및 부속)에 대한 통합 백분율은 병변이 있는 엽의 백분율로 점수화되고, 기록될 것이며; 그리고 2) 수치적 시각적 점수 (0, 1, 2, 3).

[0226] RT qPCR

[0227] 표준 절차에 따라 시행된 역전사 (RT) qPCR를 사용하여 바이러스혈증 (혈청 내 PRRSV 부하) 및 홀림 (비강 및 경구 면봉법에서 PRRSV 부하)를 측정했다. 요약하면, 정제된 바이러스 RNA를 주형으로 사용하여 50°C에서 30 분 동안 역전사시키고, 95°C에서 5 분 동안 변성시켰다. 반응의 PCR 프로그램은 95°C에서 20 초 동안 변성시키고, 53°C에서 40 초 동안 어닐링하는 40회 사이클로 구성된다. qRT-PCR은 7500 실시간 PCR 시스템 터모사이클러에서 수행되었다. 결과를 RNA 복사체/mL로 표시하였다.

[0228] 혈청학

[0229] IDEXX PRRS X3 ELISA를 사용하여 제조사의 지시에 따라 백신접종 전, 공격전 및 부검 시점에 수거된 혈청에서 PRRSV에 대한 항체 검사를 실시하였다. 요약하면, 혈청 샘플을 재조합 PRRSV 항원으로 코팅된 96-웰 플레이트에서 1:40으로 희석하고, 18-26°C에서 30 분 동안 배양하였다. 세척 후, 항-돼지 양고추냉이 과산화효소 접합체를 첨가하고 플레이트를 18-26°C에서 30 분 동안 추가로 배양하였다. 결합되지 않은 접합체가 씻겨져서, TMB 기질이 웰에 첨가되었다. 발색은 650 nm에서 측정되었다. S/P 값은 각 샘플에 대해 기록되었다. S/P 비율이 ≥ 0.4 인 경우, 샘플은 PRRS 항체에 대하여 양성으로 분류되었다. S/P 비가 < 0.4인 경우, 샘플은 음성으로 분류되었

다. ELISA 지침은 연구 파일에 포함되어 있다. 연구는 37 일째에 끝났다 (안락사).

[0230] 바이러스혈증 및 흘림

[0231] 통계 분석 전에 RT-qPCR 데이터를 적절한 대수 변환을 사용하여 변형시켰다. 변환된 데이터는 일반적인 선형 반복 측정 혼합 모델을 사용하여 분석되었다. 시간 대 상호 작용 효과에 의한 치료 또는 치료가 유의할 경우 ($P \leq 0.05$) 매 시점마다 쌍별 치료 비교가 이루어졌다. 치료 최소 제곱 평균과 95% 신뢰 구간이 다시 발표를 위해 역변형되었다. 바이러스혈증/흘림 일수의 백분율을 또한 산출하였다. 각 시료는 기술의 검출 한계(500 PRRSV RNA 복사체/시료 mL)의 절반에 해당하는 PRRSV RNA 복사체/mL가 >250인 경우 양성으로 판정되었다. 또한 동물이 ≤ 27 의 일차 (공격 전) 및 >27 일차 (공격 후) 경우 바이러스혈증 (viremic)이거나 흘리는 지 여부가 결정되었다.

[0232] 폐 병변

[0233] 병변이 있는 총 폐의 백분율은 다음 공식을 사용하여 계산되었다. 병변이 있는 총 폐의 백분율 = $(0.10 \times \text{왼쪽 두 개골}) + (0.10 \times \text{왼쪽 중간}) + (0.25 \times \text{왼쪽 꼬리}) + (0.10 \times \text{오른쪽 두 개골}) + (0.10 \times \text{오른쪽 중간}) + (0.25 \times \text{오른쪽 꼬리}) + (0.10 \times \text{부속(accessory)})$. 아크 사인 제곱근 변환(arcsine square root transformation)은 분석하기 전에 병변이 있는 전체 폐의 백분율에 적용되었다. 변형된 폐 병변을 일반적인 선형 혼합 모델로 분석하였다. 치료 효과가 유의적이었다면, 치료군 간에 쌍별 비교가 이루어졌다. 폐 병변이 있는 전체 폐의 백분율의 역 변환된 최소 제곱 평균, 이의 표준 오차, 및 95% 신뢰 구간 뿐만 아니라 최소값과 최대 값도 계산되었다. 각 병변에 대해 폐 병변 평가 점수의 빈도 분포를 계산하였다. 정규 또는 정상이 아닌 점수는 2 항(binomial) 데이터에 대한 일반 선형 혼합 모델을 사용하여 분석되었다. 일반 선형 혼합 모델이 수렴하지 않으면, Fisher의 Exact 테스트를 사용하여 데이터를 분석한다. 치료의 주 효과가 유의적이었다면, 쌍별 치료 비교가 이루어졌다.

[0234] 폐 점수

[0235] 각 치료 군에 대한 병변이 있는 폐의 백분율을 표 8에 나타내었다. 폐 시각적 점수는 표 9에 표시된다. 부검에서, 대조군 T01의 17/18 돼지 (94.4%)는 양성 폐 시각적 점수를 나타내며, 이는 PRRSV 공격으로 폐 병변이 성공적으로 유도되었음을 나타낸다. T02 그룹에서 14/19 (73.7%) 돼지도 양성을 보였다. 대조군 T01은 T02 군에 비해 병변이 있는 폐의 평균 LS 평균 비율이 유의하게 높았다. 총 폐 시각적 점수와 관련하여, 모든 T02 돼지의 폐를 0 (병변 없음) 또는 1 (경미한 병변)으로 기록하였다. T01 대조군에서, 7/18 (38.9%)의 돼지에게 2 점의 시각적 점수 (중등도의 병변)가 주어졌다. 어떤 군의 폐도 3 점 (심한 병변)의 시각 점수를 얻지 못했다.

표 8

표 8. 병변이 있는 폐의 백분율 요약

	N	역 변환된 LS 평균	표준 오차	하부 95% CL	상부 95% CL	범위
T01	18	7 ^a	2	4	11	0 내지 29
T02	19	2 ^b	1	1	5	0 내지 10

상이한 위첨자는 그룹 간의 유의미한 차이를 의미한다.

표 9

표 9. 치료 그룹 별 폐 시각적 점수

처리	시각적 점수						총 관찰
	0 (병변없음)		1 (약간의 병변)		2 (중간 수준의 병변)		
	번호	%	번호	%	번호	%	번호
T01	1	5.6	10	55.6	7	38.9	18
T02	4	26.3	14	73.7	0	0.0	19

[0238] RT-qPCR 결과, 바이러스혈증 (혈청에서 PRRSV 부하)

[0239] 모든 돼지는 0 일째 혈액에서 RT-qPCR PRRSV 음성이었다. 공격 시점 (27 일)에, PRRSV RNA는 T1 (T02 그룹)로 백신접종된 돼지의 100%에서 검출될 수 있었다. 그 때까지는 모든 T01 돼지가 여전히 PRRSV 음성이었다. 대조군 돼지에서, 29 일 시점(공격-후 2 일째)에 바이러스혈증이 먼저 검출되었고, 돼지는 연구가 끝날 때까지 PRRSV 양성으로 유지되었다. 공격-후 모든 샘플링 일자에서, 대조군 T01 군에서 검출된 바이러스 부하는 T02 군에서 검출된 것보다 유의적으로 높았다. 표 10은 27 일째 (공격 당일)부터 36 일까지의 바이러스혈증 결과를 요약한 것이다. 그룹 간의 최소 제곱 평균 및 LS 평균의 요약이 표 11에 나와 있다.

표 10

표 10. 그룹 별 및 연구 일별의 바이러스 혈증 결과 요약

	연구 일자	Log ₁₀ RNA 복사체/혈청 ml					바이러스혈증성 돼지 %
		최소 제곱 평균	표준 오차	범위	하부 95% 신뢰구간	상부 95% 신뢰구간	
T01	27 일차	2.4	0.16	2.4 내지 2.4	2.0	2.8	0.0%
T02	27 일차	6.0	0.16	4.6 내지 7.8	5.6	6.4	100.0%
T01	29 일차	7.4	0.25	5.3 내지 9.4	6.8	7.9	100.0%
T02	29 일차	5.6	0.25	3.8 내지 7.8	5.1	6.1	100.0%
T01	31 일차	8.1	0.27	6.3 내지 9.2	7.5	8.6	100.0%
T02	31 일차	6.9	0.27	4 내지 8.9	6.4	7.5	100.0%
T01	34 일차	7.3	0.24	5.4 내지 8.4	6.8	7.8	100.0%
T02	34 일차	6.4	0.24	4.2 내지 8	5.9	6.9	100.0%
T01	36 일차	7.2	0.28	5.7 내지 8.6	6.6	7.7	100.0%
T02	36 일차	5.6	0.28	2.7 내지 8.4	5.0	6.2	100.0%

RT-qPCR 양성: > 2.4 log₁₀ RNA 복사체/ml

[0240]

표 11

표 11. 바이러스 혈증 결과를 위한 최소 제공 평균 요약표.

처리 번호	상이한 연구 날짜에서 최소 제공 평균				
	27 일차	29 일차	31 일차	34 일차	36 일차
T01	2.4 ^a	7.4 ^a	8.1 ^a	7.3 ^a	7.2 ^a
T02	6.0 ^b	5.6 ^b	6.9 ^b	6.4 ^b	5.6 ^b

상이한 위첨자는 그룹 간의 유의미한 차이를 의미한다.

[0241]

[0242]

코-혈립 및 경구-혈립

[0243]

모든 돼지는 0 일째 코-혈립 및 경구-혈립에서 RT-qPCR PRRSV 음성이었다. 공격 시점 (27 일)에 TI (T02 그룹)로 백신접종된 돼지의 70% 및 85%는 비강 및 구강 면봉법에서 검출 가능한 PRRSV RNA를 각각 가지고 있었다. 그 당시 T01 그룹의 돼지는 없었다. 공격-후 기간 동안, T01 그룹의 코-혈립의 비율은 85% (34 일)에서 100% (29 일)의 범위였다. T02 군에서 코-혈립 비율은 42% (36 일)에서 90% (29 일)까지 분포했다. 경구-혈립과 관련하여 양성 돼지의 비율은 T01 그룹에서 95-100%, T02 그룹에서 73.7-100% 사이였다. 그룹 간 LSM의 비교는 공격 후 모든 날짜에 T01 그룹에서 유의적으로 높은 바이러스 부하를 보였으나, 비강 면봉법의 경우 34 일, 구강 면봉의 경우 31 및 36 일에 바이러스 부하가 유의하게 높았다.

[0244]

27 일 (공격 당일)부터 36 일까지의 코-혈립 및 경구-혈립 결과를 표 12 및 표 14에 각각 요약한다. LSM과 LS의 요약 그룹 간의 차이는 표 13과 표 15에 나와있다.

표 12

표 12. 그룹 별 및 연구 일별 코-홀림 결과 요약

	연구 일차	RNA 복사체/ml (면봉당)					홀리는 돼지의 %
		최소 제공 평균	표준 오차	범위	하부 95% 신뢰구간	상부 95% 신뢰구간	
T01	27 일차	2.4	0.19	2.4 내지 2.4	2.0	2.8	0.0%
T02	27 일차	3.5	0.26	2.4 내지 4.9	3.0	4.1	70.0%
T01	29 일차	6.5	0.19	5.4 내지 7.6	6.1	6.9	100.0%
T02	29 일차	4.8	0.26	2.4 내지 6.8	4.2	5.3	90.0%
T01	31 일차	6.4	0.19	5.2 내지 7.7	6.0	6.8	100.0%
T02	31 일차	5.0	0.27	2.4 내지 6.8	4.5	5.5	94.7%
T01	34 일차	4.5	0.19	2.4 내지 6.9	4.1	4.9	85.0%
T02	34 일차	4.2	0.27	2.4 내지 7.2	3.7	4.8	84.2%
T01	36 일차	4.7	0.20	2.4 내지 6.5	4.3	5.1	88.9%
T02	36 일차	3.3	0.27	2.4 내지 5.6	2.8	3.9	42.1%

RT-qPCR 양성: > 2.4 log₁₀ RNA 복사체/ml

표 13

표 13. 코-홀림 결과를 위한 최소 제공 평균 요약표

처리 번호	상이한 연구 날짜에서 최소 제공 평균				
	27 일차	29 일차	31 일차	34 일차	36 일차
T01	2.4 ^a	6.5 ^a	6.4 ^a	4.5 ^a	4.7 ^a
T02	3.5 ^b	4.8 ^b	5.0 ^b	4.2 ^a	3.3 ^b

표 14

표 14. 그룹 별 및 연구 일별의 경구-흡입 결과 요약

	연구 일차	RNA 복사체/ml (면봉당)					흡리는 돼지의 %
		최소 제공 평균	표준 오차	범위	하부 95% 신뢰구간	상부 95% 신뢰구간	
T01	27 일차	2.4	0.19	2.4 내지 2.4	2.0	2.8	0.0%
T02	27 일차	4.9	0.26	2.4 내지 7.4	4.3	5.4	85.0%
T01	29 일차	4.2	0.19	2.4 내지 5.9	3.8	4.6	95.0%
T02	29 일차	4.0	0.26	2.4 내지 5.2	3.5	4.6	90.0%
T01	31 일차	5.2	0.19	4 내지 6.9	4.8	5.6	100.0%
T02	31 일차	4.4	0.26	2.4 내지 6.6	3.8	4.9	94.7%
T01	34 일차	4.9	0.19	3.7 내지 6.7	4.5	5.3	100.0%
T02	34 일차	4.6	0.26	3 내지 5.8	4.1	5.1	100.0%
T01	36 일차	4.6	0.20	3.5 내지 6.1	4.2	5.0	100.0%
T02	36 일차	3.8	0.26	2.4 내지 5.2	3.3	4.4	73.7%

RT-qPCR 양성: > 2.4 log10 RNA 복사체/ml

[0247]

표 15

표 15. 경구-흡입 결과를 위한 최소 제공 평균 요약표

처리 번호	상이한 연구 날짜에서 최소 제공 평균				
	27 일차	29 일차	31 일차	34 일차	36 일차
T01	2.4 ^a	4.2 ^a	5.2 ^a	4.9 ^a	4.6 ^a
T02	4.9 ^b	4.0 ^a	4.4 ^b	4.6 ^a	3.8 ^b

상이한 위첨자는 그룹 간의 유의미한 차이를 의미한다.

[0248]

[0249] 혈청학

[0250] 모든 돼지는 백신접종 전에 PRRSV에 대해 혈청학적으로 음성이었다 (IDEXX S/P 비율 <0.4). 공격-시점 (백신접종 후 4 주 시점) 모든 대조군 돼지는 여전히 혈청음성이었고, TI로 백신접종된 돼지의 90%는 PRRSV로 혈청 전환되었다(IDEXX S/P 비율 > 0.4). 36 일 시점 (공격 후 9 일), 모든 돼지는 PRRSV에 대해 양성이었다. T02 군의 돼지는 대조군 T01과 비교하여, 유의적으로 더 높은 LS 평균 항체역가를 나타내었다. 표 16은 ELISA에 의해 얻어진 혈청학적 결과를 요약한 것이다.

표 16

표 16. S/P 비율 ELISA 결과 (LS 평균 및 범위) 그리고 처리군 및 일자에 의한 혈청양성 돼지 %

처리	27 일차		36 일차	
	LS 평균 (범위)	혈청양성%	LS 평균 (범위)	혈청양성%
T01	0.011 ^a (-0.087 내지 0.123)	0.0%	1.582 ^a (0.846 내지 2.357)	100%
T02	1.617 ^b (0.31 내지 2.561)	90%	1.960 ^b (0.762 내지 2.884)	100%

상이한 위첨자는 그룹 간의 유의미한 차이를 의미한다.

[0251]

[0252] 논의

[0253] 이 연구는 백신접종 후 4 주 시점에서 호흡기 공격으로 병원성 유전자형 I PRRSV 분리주를 접종한 14-15 일령의 백신접종 돼지에서 변형된 PRRSV 생백신의 면역개시(OOI)을 평가했다. 백신접종 기간 동안 모든 T01 돼지가 PRRSV 혈청 및 바이러스(viro)-음성으로 남아 있었기 때문에, 이 검사가 유효했으며, 교란 질환 인자는 발견되지 않았다.

[0254] 효능을 결정하는 주요 변수는 T01 돼지와 비교하여, 치료 그룹 T02의 혈청에서의 바이러스 부하였다. 폐 병변, 직장 온도, 흘림(shedding), 임상 증상 및 체중을 이차 변수로 비교하였다.

[0255] T01과 T02 그룹 간의 혈청 내 바이러스 부하를 비교할 때 IM 백신접종의 보호 효과가 관찰되었고; TI로 백신접종된 그룹은 공격-후 모든 샘플링 시점에서 대조군 T01과 비교하여 유의하게 낮은 바이러스 역가를 가졌다.

[0256] 공격 후에 치료 그룹에 관계없이 모든 돼지에서 경구-흘림 및 코-흘림이 탐지될 수 있다. 그러나, T01 군에서는 모든 날짜에 유의적으로 더 높은 바이러스 부하가 탐지되었는데, 비강 면봉법의 경우 34 일, 구강 면봉법의 경우 31 일과 36 일에 탐지되었다.

[0257] 폐 병변과 관련하여, 그룹간에 폐 병변의 최소 제곱 평균 백분율을 비교할 때, T02 돼지에 대한 예방 백신 효과가 관찰되었다. 또한, 부검 시점에서 양성 시각 점수를 받은 14 마리의 모든 T02 돼지는 1 점 (경미한 병변)으로 기록되었다. 이와는 대조적으로, T01 군 17 마리의 폐에서 양성으로 평가되었고, 10 마리에게는 1 점(경미한 병변)이 주어졌으며, 7마리에게는 2점(중간 수준의 병변)이 주어졌다.

[0258] 공격-후 7 일째에, TI로 백신접종한 돼지에서 공격-후 기간 동안 직장 온도가 유의적으로 낮았다. 그때까지 T01 돼지의 20%는 발열을 보였으나 T02 그룹에서는 어느 동물도 발열하지 않았다. 공격-전에 T02 그룹의 직장 온도도 T01과 비교하여 현저히 낮았다. 그러나, 어떤 돼지도 발열이 없었으며, 직장 온도의 상승을 유도할 수 있는 명백한 임상 증상은 없었다. 직장 온도가 상승한 것 외에, PRRS 와 양립가능한 다른 임상 관찰(우울증, 호흡 곤란, 기침 또는 재채기)은 전체 기간 동안 모든 돼지에서 관찰되지 않았다. 또한, 그룹 간의 어떤 시점에서도 체중의 차이는 발견되지 않았다.

[0259] 혈청학 데이터에서 TI로 백신접종(T02 그룹)은 접종 후 4주 이내에 PRRSV 특이적 항체의 발생을 유도했다는 것을 실증하였다. T02 그룹의 항체 역가는 연구가 끝날 때까지 증가했으며, 백신접종되지 않은 공격 그룹 T01에서 그 시간까지 검출된 역가보다 유의하게 높았다.

[0260] 2.0 log₁₀ CCID₅₀의 투여량을 함유하는 실험적 EU PRRSV MLV 백신을 14-15 일령의 돼지에게 근육 내 단일 투여로 백신접종하면 PRRSV에 대해 예방적이었는데, 이는 백신접종 후 4 주 시점에 병원성 EU PRRS 균주로 공격을 한 후 혈청에서 검출된 바이러스 부하의 유의한 감소에 의해 볼 수 있었다. 효능은 부검(공격-후 10 일 시점)에서 병변이 있는 폐의 비율의 현저한 감소, 코-흘림 및 경구-흘림의 감소, 그리고 공격-후 7 일 시점에서의 직장 온도 감소에 의해 관찰된 보호 효과에 의해 뒷받침되었다.

[0261] 실시예 5-유럽 PRRSV 분리주에 대한 공격에 대해 1-일령의 혈청양성 돼지에게 투여된 변형된 EU PRRSV 생백신의

효능에 있어서 모체-유래 항체의 잠재적 효과 평가

- [0262] 본 연구의 목적은 1 일령의 새끼 돼지에게 근육 내 (IM, 그룹 T02) 또는 비내 (IN, 그룹 T03) 경로에 의해 투여 될 때 EU PRRS MLV (서열 번호: 5로부터 발현된 바이러스)의 효능에 대한 모체-유래 항체 (MDA)의 영향을 평가 하는 것이었다
- [0263] 본 연구는 EMA/CVMP/WP/439467/2007: "Reflection paper on the demonstration of a possible impact of maternally derived antibodies on vaccine efficacy in young animals" 및 European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) Monograph 04/2008:50207: "Evaluation of efficacy of veterinary vaccines and immunosera"의 권고에 근거하여 기획되었다. 두 문헌 모두 백신의 효능에 대한 수동적으로 획득된 그리고 모체-과생된 항체의 영향을 적절히 평가해야 한다고 권고한다. 또한, EMA/CVMP/WP/439467/2007에서는 MDAs 존재하에 백신을 접종한 동물에서 백신의 효능은 정상적인 생물학적 변이에도 불구하고, 동일한 연령의 동물에서 MDAs가 없는 경우 백신접종에서 수득된 것과 유사해야한다고 명시한다.
- [0264] 위에서 언급된 명세를 기반으로, 호흡기 공격으로 병원성 유전자형 I PRRSV 분리주 접종시 1 일령에 백신접종된 (IM 및 IN 경로) 혈청양성 돼지에서 변형된 EU PRRSV 생백신의 예방 면역의 개시 (OOI)를 평가하였다. 대조군 (T01)에서 혈청 중화 시험 (SNT)에 의해 검출된 MDA의 수준이 탐지될 수 없었던 시점에서 동물을 공격하였다. 공격에 대항하는 보호를 입증하기 위해, 혈청음성 동물에서 수행된 이전의 연구에서 평가된 동일한 매개 변수 (혈청 내 바이러스 부하, 폐 병변, 직장 온도, 흘림, 임상 징후 및 체중)가 평가되었다.
- [0265] 백신접종 기간 동안 모든 대조군 (T01 그룹) 돼지가 PRRSV 바이러스(viro)-음성으로 남아 있었기 때문에, 이 검사가 유효했으며, 교란 질환 인자는 발견되지 않았다.
- [0266] EU PRRS MLV가 IM 경로에 의해 투여되었을 때, 대조군과 비교하여 혈청 내 바이러스 부하의 유의적인 감소에 의해 백신접종의 예방 효과가 관찰되었다; 효능은 또한 직장 온도의 유의적인 감소 뿐만 아니라 코-흘림 및 경구-흘림의 유의적인 감소에 의해 뒷받침되었다. 폐 병변의 평균 백분율의 차이는 유의성에 근접하였다($p=0.092$). 본 연구에서 IM 투여후 관찰된 효능은 혈청음성 동물에서 효능을 평가한 이전의 연구에서 얻은 효능과 유사하다; 두 연구에서 백신접종의 주요 영향은 주요 변수 (바이러스혈증 감소)에서 관찰되었고, 또한 코-흘림 및 직장 온도 감소에 의해 뒷받침되었다.
- [0267] EU PRRS MLV가 IN 경로에 의해 투여될 때, 평가된 매개 변수의 중요한 차이가 없는 것으로 볼 수 있는 것과 같이, PRRSV 시도에 대해 어떠한 보호도 달성되지 못했다.
- [0268] 결론적으로, 본 연구의 결과는 1-일령의 새끼 돼지에서 백신을 근육 내로 투여했을 때, 모체에서 유래된 백신 효과를 가진 항체의 간섭이 없음을 설명한다. 그러나, 백신이 IN 경로에 의해 투여될 때, 아마도 MDA에 의한 백신의 중화로 인해, 백신접종 후 대부분의 돼지에서 면역 반응이 생성되지 않았다. PRRSV MDA 양성 새끼돼지를 생산하기 위하여, 6 마리의 임신 암퇘지에게 임신 초기(임신 45일 시점)에 EU PRRS MLV 백신 로트 VMRD13-015 ($5 \log_{10}$ CCID₅₀/2 mL)를 백신접종하였다. 예상 분만일 전날, 클로프로스테놀(Cyclix® Porcino, Virbac)을 근육 주사하여 분만을 유도하였다. 모든 암퇘지는 그 다음날 분만했다. 모든 암퇘지는 0 일차 시점에 PRRS에 혈청반응을 보였다. 결과를 나타낸다.
- [0269] 백신 바이러스는 $6.0 \log_{10}$ CCID₅₀/mL의 효능으로 제공되었다. 0 일차 시점에, IVP를 백신 희석제 (로트 T22019)로 희석하여, 표적 역가와 일치시켰다 ($2.5 \log_{10}$ CCID₅₀/2 mL). 복용량을 확인하기 위하여, BHK-21-C12-26 세포에서 1 회 분량의 IVP를 수거하였다. 추가로 IVP 샘플을 동결시키고 ($-80 \pm 10^{\circ}\text{C}$) 보존 샘플로 보관한다. BHK-21-C12-26 세포에서의 적정은 로컬 표준 절차에 따라 수행되었다. 재구성되고, 희석된 백신은 $101.8 \text{ CCID}_{50}/\text{mL}$ 의 역가를 보유하였고, 이는 $102.1 \text{ CCID}_{50}/2 \text{ mL}$ ($2.1 \log_{10}$ CCID₅₀ /2 mL)에 상응한다.
- [0270] 0 일째에, 섹션 4에 기재된 바와 같이 새끼돼지에 IVP 또는 CP를 백신접종하였다. T01 및 T02 그룹 새끼돼지의 목 우측으로 근육내 주사하였다. T01 및 T03 그룹 새끼돼지에게 콧구멍당 1.0 mL를 제공하도록 비강내 주사하였다. 공격 재료는 돼지 폐포 대식세포(PAM)에서 성장한 유전형 1 스페인 PRRSV 분리주 Olot/91이었다. 이 균주는 1991년 암퇘지의 낙태 후 분리되었다.
- [0271] 바이러스혈증
- [0272] 모든 돼지는 백신접종 (D0) 전에 혈청에서 RT-qPCR PRRSV 음성이 발견되었고, T01 그룹의 모든 돼지는 공격 때까지 그렇게 유지되었다. 대조적으로, T02 그룹 (IM 백신접종)의 8/16 (50%) 돼지새끼 및 T03 그룹 (IN 백신접종)의 1/19 (5.3%) 돼지새끼는 공격시 (백신접종 후 67 일) RT-qPCR PRRSV 양성이었다.

[0273] 공격 후, T01 그룹의 돼지 100%는 D70일 시점(공격 후 3 일에 바이러스혈증이 되어, 연구가 끝날 때(DC+10)까지 양성을 유지했다. 백신접종 군 (T02 및 T03)에서, 모든 돼지는 PRRSV 양성으로 최소 1 회 검출되었고; 그러나, 연구가 끝날 때까지 (DC+10), T02 돼지 11/16(68.8%)만이 여전히 바이러스혈증이였다. 대조적으로, 한 마리를 제외한 모든 T03 돼지는 공격-후 모든 샘플링 시점에서 양성이었다.

[0274] T02 그룹의 돼지는 공격-후 모든 샘플링 시점에 T01 대조군의 돼지보다 혈청 내 바이러스 부하가 유의적으로 낮았다. DC+3 및 DC+10 시점에서, T02 그룹의 바이러스 부하도 T03 그룹보다 또한 유의적으로 낮았다. T01과 T03 군간에 유의한 차이는 없었다.

[0275] 표 17은 공격-후 10 일 동안의 바이러스혈증 결과를 요약한다.

표 17

표 17. 그룹 별 및 연구 일별의 바이러스 혈증 결과 요약(공격-후 데이터)

그룹	연구 일짜	N	최소 제곱 평균	SE	Log ₁₀ RNA 복사체/혈청 ml			바이러스 혈증성 동물 %
					범위	하부(L ower) 95% CB	상부(U pper) 95% CB	
T01	D67 (DC)	18	1.65	0.20	1.70 내지 1.70	1.24	2.05	0.0
T02	D67 (DC)	16	2.25	0.36	1.70 내지 3.84	1.53	2.97	50.0
T03	D67 (DC)	19	1.82	0.29	1.70 내지 3.80	1.25	2.40	5.3
T01	D70 (DC+3)	18	6.60	0.20	5.23 내지 7.66	6.20	7.01	100.0
T02	D70 (DC+3)	16	2.87	0.36	1.70 내지 6.59	2.15	3.59	50.0
T03	D70 (DC+3)	19	6.30	0.29	1.70 내지 8.10	5.72	6.87	94.7
T01	D73 (DC+6)	18	6.39	0.20	4.87 내지 7.44	5.99	6.80	100.0
T02	D73 (DC+6)	16	5.18	0.36	1.70 내지 7.00	4.45	5.90	93.8
T03	D73 (DC+6)	19	5.80	0.29	1.70 내지 7.70	5.22	6.37	94.7
T01	D75 (DC+8)	18	5.32	0.20	3.32 내지 7.21	4.92	5.73	100.0
T02	D75 (DC+8)	16	4.18	0.36	2.25 내지 6.22	3.46	4.90	100.0
T03	D75 (DC+8)	19	5.07	0.29	1.70 내지 7.13	4.50	5.65	94.7
T01	D77 (DC+10)	18	5.29	0.20	3.51 내지 6.47	4.89	5.70	100.0
T02	D77 (DC+10)	16	2.96	0.36	1.70 내지 5.86	2.23	3.68	68.8
T03	D77 (DC+10)	19	5.42	0.29	2.16 내지 7.08	4.85	6.00	100.0

N: 숫자; SE: 표준 오차; CB: 신뢰 한계; D= 연구일짜; DC: 공격 일짜; RT-qPCR 양성: > 1.7
log₁₀ RNA 복사체/ml.

[0276]

[0277] 바이러스혈증 및 흘림

[0278] 통계 분석 전에 RT-qPCR 데이터를 적절한 대수 변환을 사용하여 변형시켰다. 변환된 데이터는 일반적인 선형 반복 측정 혼합 모델을 사용하여 분석되었다. 시간 대 상호 작용 효과에 의한 치료 또는 치료가 유의할 경우

($P \leq 0.05$) 매 시점마다 쌍별 치료 비교가 이루어졌다. 치료 최소 제곱 평균과 95% 신뢰 구간이 다시 발표를 위해 역-변형되었다. 바이러스혈증/홀림 일수의 백분율을 또한 산출하였다. 각 샘플은 > 50 PRRSV RNA 복사체/mL인 경우 양성으로 결정되었으며, 이는 기술의 검출 한계의 반에 해당한다 (100 PRRSV RNA 복사체/mL). 또한 동물이 일차 $\leq$ DC (공격 전) 및 일차 $>$ DC (공격 후) 경우, 바이러스혈증이거나 홀리는 지 여부가 결정되었다.

[0279] 본 연구의 목적은 1 일령의 새끼 돼지에게 근육 내 (IM, 그룹 T02) 또는 비내 (IN, 그룹 T03) 경로에 의해 투여될 때 EU PRRS MLV의 효능에 대한 모체-유도 항체 (MDA)의 영향을 평가하는 것이었다. 효능은 호흡기 공격용으로 병원성 유전자형 1 PRRSV 분리주를 접종한 1-일령의 백신접종된 혈청양성 돼지에서 평가되었다. T01 그룹에서 혈청 중화 시험 (SNT)에 의해 검출된 MDA의 수준이 탐지될 수 없을 때 (67일차) 동물을 공격하였다.

[0280] 효능을 결정하는 주요 변수는 T01 돼지와 비교하여, 치료 그룹 T02 및 T03의 혈청 (바이러스혈증)에서의 바이러스 부하였다. 폐 병변, 직장 온도, 홀림 (shedding), 임상 증상 및 체중을 이차 변수로 비교하였다.

[0281] 백신접종 기간 동안 모든 T01 돼지가 PRRSV 바이러스 (viro)-음성으로 남아 있었기 때문에, 이 검사가 유효했으며, 교란 질환 인자는 발견되지 않았다.

[0282] T01과 T02 그룹 간의 혈청 내 바이러스 부하를 비교할 때 IM 백신접종의 보호 효과가 관찰되었고; IM 경로에 의해 IVP로 백신접종된 그룹은 공격-후 모든 샘플링 시점에서 대조군 T01과 비교하여 유의하게 낮은 바이러스 역가를 가졌다. T01과 T03 그룹 간에는 바이러스 역가에 차이가 탐지되지 않았으므로, 공격-후 바이러스 부하에 대한 IN 백신접종의 보호 효과는 없음을 나타낸다. T03 그룹에서의 효능의 결핍은 또한 공격-후 3 일 및 10 일째에 T02 그룹과 비교하여 이 그룹에서 관찰된 유의적으로 높은 바이러스 부하에 의해 입증되었다.

[0283] IM 백신접종 (T02 그룹) 후에 부여된 보호는 대조군 T01과 관련하여 T02 그룹의 코 및 구강 분비물에서 검출된 바이러스 양 뿐만 아니라 코-홀림 돼지 비율의 유의적인 감소에 의해 뒷받침되었다. 바이러스혈증에서 관찰된 것과 유사하게, T01과 T03 그룹간에 차이가 발견되지 않았기 때문에, IN 경로 (T03 그룹)에 의해 IVP가 투여되었을 때 바이러스 홀림에서 백신접종의 긍정적인 효과는 관찰되지 않았다. 실제로, T03 그룹에서 검출된 비강 및 구강 경로에 의한 바이러스 홀림량도 T02보다 유의하게 높았다.

[0284] IM 경로에 의한 백신접종은 직장 온도에 긍정적인 영향을 미쳤다. 공격 이전 (D67) 직장 평균 온도는 T01 군과 T03 군에 비해 T02 군에서 유의하게 낮았다; 그러나, 어떤 그룹의 돼지도 그 당시 발열 ($RT \geq 40.5$)을 보이지 않았고, D67 시점에서 직장 온도는 공격 단계를 위한 동물의 혼합 전에 섞이기 때문에, 이러한 차이는 아마 처음 평가된 동물의 스트레스에 기인한다고 결론지을 수 있다. 공격-후 기간 동안, T01, T02 및 T03 그룹에서 최소한 1 회 이상 발열이 있었던 돼지의 비율은 각각 61%, 31% 및 42%였다. 대조군 (T01)은 70 일째 시점 (공격-후 3일)에 IVP로 백신접종된 돼지 (T02 및 T03 그룹)보다 현저하게 높은 직장 온도를 가졌다; 그러나, DC+10 시점에서 T03 군의 직장 온도는 T01 군과 T02 군보다 유의적으로 높았다. 직장 온도가 상승한 것 외에도, PRRSV 감염과 양립가능한 다른 임상 징후는 관찰되지 않았다. 체중과 관련하여, 그룹간에 유의한 차이가 없기 때문에, 백신접종 효과는 관찰되지 않았다.

[0285] 부검 시점에서, 대조군 T01의 13/18 마리의 돼지 (72%)는 양성의 폐 시각적 점수를 보였다. T02와 T03 그룹에서 7/16 (44%)와 13/19 (68%) 돼지도 양성을 보였다. 처리 군간의 비교에서 병변을 가진 폐의%에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나, 대조군 T01과 IM 경로 (T02)에 의해 IVP로 백신접종된 군간에 관찰된 차이는 유의적 수준 ($p = 0.092$)에 가까웠다.

[0286] 모든 돼지는 ELISA (S/P 비율 ≥ 0.4)로 측정된 백신접종 전에 PRRSV-특이적 항체를 보유하였으며, 이는 포함 기준을 부응하였다. 공격 전 (백신접종 후 67 일), 대조군에서 39%의 돼지는 항체 양성 반응을 보였으며, 이는 그 시점에 남아있는 MDA가 있음을 나타냈다 (평균 S/P 비율: 0.279). 그러나, 대조군의 모든 돼지에서 공격-후 바이러스혈증이 발생 되었고, 13/18 돼지도 부검시 양성 폐 점수를 보였다는 것은 ELISA에 의해 검출된 나머지 MDA는 공격을 간섭하지 않았다는 것을 나타낸다. 실제로, PRRSV-특이적 중화 항체의 수준이 SNT에 의해 이들 돼지에서 결정될 때, 공격-전 (52 일)의 모든 T01 돼지에서 음성 결과가 탐지되었다. IM 경로로 IVP로 백신접종을 받은 그룹에서, 9/16 마리의 돼지는 백신접종 당일에서 백신접종 후 67 일차까지 ELISA로 검출된 항체 수치가 증가했고, 이들 모두는 공격전 혈청양성이었으며 (평균 S/P 비율: 1.803), 이는 MDA에 직면하더라도 IM 백신접종에 따른 항체 반응의 발달을 의미한다. 대조적으로, IN 경로에 의해 IVP로 백신접종된 2/19 마리의 돼지만이 백신접종에서부터 공격까지 PRRS 항체의 증가를 보였고, 그리고 단지 32%만이 D67 시점에 혈청양성이었으며 (평균 S/P 비율: 0.328), 이는 MDA에 의한 백신의 중화로 인해 체액성 면역 반응이 다른 17 마리의 돼지에서 유도되지 않음을 나타낸다. 공격 후 (D77), 처리 그룹과 상관없이 모든 돼지는 혈청양성이었고, 그룹간에 ELISA

역가에 유의적인 차이는 발견되지 않았다.

- [0287] EMA/CVMP/WP/439467/2007 지침서 "Reflection paper on the demonstration of a possible impact of maternally derived antibodies on vaccine efficacy in young animals"에서는 MDA 존재 하에 백신을 접종한 동물에서 백신의 효능은 정상적인 생물학적 변이에도 불구하고, 동일한 연령의 동물에서 MDA가 없는 경우 백신 접종에서 수득된 것과 유사해야 한다고 명시한다. 이러한 기준을 토대로 본 연구에서 관찰된 효능은 이전 연구 (C/394/13)에서 얻은 효능과 유사해야 하며, 이때 OOI는 1-일령에서 IN 및 IM 경로에 의해 백신접종된 혈청음성 동물에서 평가되었다.
- [0288] EU PRRS MLV가 IM 경로에 의해 투여되었을 때, 두 연구 모두에서 바이러스혈증 (주요 변수)의 유의적인 감소가 관찰 되었기 때문에, 효능은 돼지의 혈청학적 상태에 관계없이 입증될 수 있을 것이다. IM 백신접종의 보호 효과는 두 경우에서 모두 코-홀름 및 직장 온도에서도 또한 설명되었다. 또한, MDA+돼지의 IM 백신접종 후에, 경구-홀름도 현저히 감소되었고, 병변을 가진 폐의%에서 유의적인 차이에 근접하였다. 전체적으로, 이 데이터는 IM 경로에 의해 1-일령의 새끼 돼지에게 백신이 투여될 때, 백신 효과를 갖는 MDA의 간섭이 없음을 설명한다.
- [0289] EU PRRS MLV가 IN 경로에 의해 투여되었을 때, 효능은 혈청음성 동물에서 관찰된 바이러스혈증 및 코-홀름의 유의적인 감소에 의해 알 수 있듯이, MDA 부재시에만 입증될 수 있었다. MDA+돼지에서, IN 백신접종은 평가된 임의의 매개 변수에서 유의한 차이가 없기 때문에, 보호를 유도하지 못했다.
- [0290] 따라서, IM 경로에 의해 $2.5 \log_{10}$ CCID₅₀의 투여량을 함유하는 실험적 EU PRRSV MLV 백신을 1-일령의 돼지에게 단일 투여로 백신접종하면 PRRSV에 대해 예방적이었는데, 이는 백신접종 후 67일 시점(9.6주)에 병원성 EU PRRS 균주로 공격을 한 후 혈청에서 검출된 바이러스 부하의 유의한 감소에 의해 볼 수 있었다. 효능은 또한 공격의 직장 온도뿐만 아니라 경구-홀름의 유의 한 감소로 뒷받침되었다. 또한, 폐 병변의 평균 백분율의 차이는 유의성에 근접하였다($p=0.09$). IN 경로에 의해 $2.5 \log_{10}$ CCID₅₀의 투여량을 함유하는 EU PRRSV MLV 백신을 1-일령의 혈청양성 돼지에게 단일 투여로 백신접종하면 PRRSV 공격에 대해 예방적이지 못하였다. 본 연구의 결과는 1-일령에서 백신을 근육 내로 투여했을 때, 모체에서 유래된 백신 효과를 가진 항체의 간섭이 없음을 설명한다. 백신을 IN 경로로 투여했을 때, 대부분의 돼지 (17/19)는 ELISA로 측정된 백신접종 후 면역 반응을 생성하지 못했다. 이것은 MDA에 의한 백신의 중화를 나타내며, 이는 집단 수준에서 백신의 효능을 손상시킬 수 있다.
- [0291] 실시예 6 1일령의 돼지에게 변형된 LIVE EU PRRSV 백신 96V198 클론 1 MSV+3의 일회 투여량, 반복된 투여량 및 과다투여량의 투여의 파급, 확장 및 안전성
- [0292] 이 연구의 목적은 IM 및 IN 경로를 통하여 1 일령의 돼지에게 투여된 변형된 PRRSV 생백신 96V198 클론 1의 반복 투여량 및 과다투여량의 안전성, 및 1 회 투여의 파급, 확산 및 안전성을 평가하는 것이다. 시험은 백신의 배치(batch)에 존재하는 최소 감쇠된 계대 수준 인 MSV+3 (8 페이지 참고, MSV+5는 표준 계대 49임을 참고)를 사용하여 수행되었다.
- [0293] 시행중인 유럽 법률에 따르면, 마케팅 허가를 얻기 위해 백신의 안전성을 입증하는 것이 필수적이다. 이 경우 프로토콜은 유럽 약전(European Pharmacopoeia)을 고려하여 개발되었고; 지시 2009/9/EC 및 VICH GL44 지침-백신의 의도된 동물의 제안된 경로 및 범주인, 1-일령의 새끼 돼지에서 IN 및 IM 경로에 의한 1 회 복용량, 반복 투여량 및 과용량의 안전성을 입증하기 위함.
- [0294] 안전성은 수의학 백신용에 대한 유럽 약전 권고, 즉, 직장 온도의 평가 및 접종 후 적어도 14 일까지 국소 및 전신 반응에 대한 평가에 따라 평가되었다. 백신 균주의 퍼짐은 백신접종 (1 회 투여량)을 받은 돼지에서부터 백신접종을 하지 않은 초보 돼지로의 퍼짐이 평가되었다; 홀름 (코, 침 및 배설물) 및 백신접종된 동물(1회 투여량)의 조직에서의 파급에 대해서도 조사하였다.
- [0295] 이 연구는 해당 OCDE 지침 및 유럽 약전 7.7 04/2013:50206 (수의학 백신 및 면역혈청의 안전성 평가)의 요구 사항에 따라 우수실험실관리기준(GLP) 규정에 따라 수행되었다.
- [0296] 시험 제품은 2L IN 또는 IM 투여량으로 $105.2 \text{ TCID}_{50}/2 \text{ ml}$ 의 최대 방출 역가에서 EU PRRS MLV (96V198 클론 1), 최소 감쇠 계대 수준 MSV+3이었고, 더 낮은 계대 (감쇠가 덜됨)는 안전의 더 나은 척도로 선택되었다. 시험 시스템을 위하여, 이 프로토콜은 유럽 약전(European Pharmacopoeia)을 고려하여 개발되었고; 지시 2009/9/EC 및 VICH GL44 지침-백신의 의도된 동물의 제안된 범주인, 1-일령의 새끼 돼지에서 IN 및 IM 경로에 의한 1 회 복용량, 반복 투여량 및 과용량의 안전성을 입증하기 위함.
- [0297] 충분한 수의 암돼지 ($n = 11$)을 사용하여 연구 수행에 필요한 새끼 돼지를 얻었다 (최소 $n = 80$). 이 설계는

IM, IN 두 경로 모두에 대한 백신의 안전, 보급 및 홀림에 대한 적절한 설명을 허용한다. 암태지는 PRRSV 음성 농장 (첨부 I)의 실험 농장에 도착했다. 암태지는 시설에서 격리된 11 개의 상자에 배치되었다. 실험 농장에서, 암태지는 분만 전 출혈하였고, 상용 ELISA (PRRS X3 Ab Test:Ref. 99-4095, IDEXX Laboratories;) (첨부 I)를 사용하여 PRRSV-특이적 항체의 존재에 대하여 다시 분석했다. Ceftiofur 나트륨 (13ml/암태지;)의 IM 투여는 예방적 치료로 행해졌다.

[0298] 수정후 대략 111-113 일(분만과 동시)에 D-Cloprostenol (Galapan, INVESA;) (첨부 XVI) 1ml의 투여로 동시에 암태지의 분만이 있었다. 새끼돼지들은 그 다음 40 시간 이내에 태어났다 (4 월 9 일과 10 일). 백신접종은 이날 10 일에 시작되었고, 이 날은 모든 새끼 돼지의 나이는 대략 ≤ 24 시간 (1 일령)이 되는 날이다.

[0299] 십자-교배(Cross-fostering)는 한배 새끼의 균형을 유지하고, 이 새끼들을 동질화하기 위해 출산 후 첫날 (백신 접종 전)에 수행되었다. 결국, 각 그룹에서 10마리 암태지와 이들의 총 새끼돼지의 수는 유럽 약전에서 수립된 안전성 시험을 수행하기 위한 최소 샘플 크기와 동등하거나 그보다 많은 양이다. 전체 수: 80마리 새끼돼지; IN 및 IM 각 경로에 있어서 40마리 새끼돼지; (실험 산물로 백신접종된 28마리-투여량, 반복 투여량, 과다투여량, 대조군 8마리 동물, 그리고 감시병병으로 4마리).

[0300] 여분의 30 마리의 새끼 돼지는 T01에서 T12까지의 모든 그룹에 예비로 배부되었는데, 이는 일부 그룹에서 돼지의 사망 또는 배제(첨부 II 및 첨부 XIV; 수정 2)로 인하여 필요한 최소한의 새끼 돼지 수에 도달하지 못했을 때만 연구에 포함되었고, 이들 새끼 돼지의 초벌 데이터는 (S)로 표시된 초벌 데이터 추가-노트(13 번에서 24 번까지의 노트)에 기록되었다. 결국 10 마리의 암태지가 사용되었고, 각각 11 마리의 새끼 돼지가 유지되었다.

[0301] 실험 가설

[0302] 이 연구는 아래에 기술된 모든 매개 변수에 대해 백신 희석제 (음성 대조군)를 접종한 대조군과 비교하여, 실험 조건하에 1 일령의 돼지 (96V198 클론 1)에서 백신 EU PRRS MLV의 안전성을 입증하기 위해 고안되었다, 그러나, 온도는 백신접종 전 각 돼지의 기저 온도를 대조 값으로 고려하여 분석되었다. 백신에 기인한 원인의 심한 국소 반응이나 전신 반응이 관찰되지 않으면 이 백신은 안전하다고 간주되었고, 백신접종 전 그룹의 모든 돼지의 평균 온도 상승은 백신접종 전 기저 평균 온도와 비교하여 1.5℃를 초과하지 않았고, 실험군의 새끼 돼지는 백신접종 전의 각 돼지의 기저 온도와 비교하여 2℃ 이상의 온도 상승을 나타내지 않았고, 백신 군주의 전파 및 파급은 보초병 돼지에서 백신 군주의 존재를 조사하는 것으로 평가되었다. 혈액, 비강, 구강 및 직장 샘플과 조직에서 바이러스의 양을 조사하여 백신접종한 동물에서의 파급을 평가했다.

[0303] 직장 온도-비강내 및 근육내 경로.

[0304] 온도에 관해서는, 얻어진 결과가 수의학 백신에 대한 유럽 약전 권장 사항을 달성하기 때문에, 평가된 모든 프로토콜 (경로, 적정 및 투여 횟수)에 있어서 백신이 안전하다고 결론지을 수 있다.

[0305] 국소 반응

[0306] 비강내 경로 국소 반응은 관찰되지 않았다.

[0307] 근육내 경로.

[0308] 부검에서, T12에서 2 마리의 새끼 돼지 (IM 경로에 의한 최대 역가) 만 육안으로 경미한 병변을 보였다. 현미경적으로 병변은 T10 그룹의 4 마리 돼지에서만 관찰되었다; 병변은 단핵 세포 염증 세포 침윤의 매우 경미한 국소 또는 다 초점 존재로 특징되었다.

[0309] 전신 반응 및 이상 반응

[0310] 비강내 경로: 백신접종과 관련된 전신 반응 및 임상 증상의 부재는 백신이 안전하다는 것을 나타낸다.

[0311] 근육내 경로.

[0312] 백신투여 후 이상 반응은 IM 경로 (그룹 T12)에 의해 가장 높은 역가 (x10 최대 방출 역가)를 받은 그룹에 속하는 8 마리의 새끼 돼지 중 2 마리에서만 관찰되었다. 이 사건은 4 시간이 안되어 사라졌고, 새끼 돼지는 완전히 회복되었다. 매일 임상 평가와 관련하여, 파행(lameness)의 경우는 백신 투여와 관련된 현상으로 간주될 수 없다; 대조군의 새끼 돼지에서도 파행이 관찰되었다. 연구 중에 관찰된 유일한 사망 외의 원인은 좁은 공간에 몰려있는 것(crushing) 때문이었고, 따라서 이 사망은 백신 투여와 관련이 없는 것으로 간주되어야 한다. 요약하면, IM 경로에 의한 백신 군주 96V198 CLONE 1은 가장 높은 역가 (x10)에 대해 기술된 이상 반응을 제외하고는

완전히 안전한 것으로 간주되어야 한다.

[0313]

체중

[0314]

비강내 경로

[0315]

체중 증가의 방법을 비교할 때, T07은 0 일부터 14 일까지 대응하는 대조군 (T02)보다 낮은 값을 보였다 ($p < 0.05$). 그러나, 체중 증가가 14 일에서 28 일까지, 특히 0 일에서 28 일까지의 모든 연구가 고려되었을 때 이 차이는 사라졌다. 따라서, 비강 경로에 의해 백신접종된 새끼 돼지의 체중 증가는 투여된 투여량과는 별개로 영향을 받지 않았다.

[0316]

근육내 경로.

[0317]

같은 방식으로, T11은 0 일부터 14 일까지 대응하는 대조군 (T04)보다 낮은 값을 보였다 ($p < 0.05$). 이 차이는 14에서 28 일 사이의 기간을 분석했을 때 사라졌지만, 0 일에서 28 일까지 모든 연구를 고려할 때, 다시 출현했다. T11에서 3 마리의 새끼 돼지의 체중 증가는 28 일째에 부검된 모든 새끼 돼지들을 포함하여 산물, 역가 및 투여 경로와 독립적으로 가장 낮은 것들 이었기 때문에 이러한 차이가 설명될 수 있다(T02, T04, T07 및 T11을 의미함). 위에서 언급한 3 마리의 새끼 돼지를 제외하면, 0 일에서 28 일까지의 모든 체중 증가는 5.5kg과 같거나 더 높았다 (각각 $n = 99$, 202 및 205의 새끼 돼지에 대한 체중 증가는 차례로 4.08, 2.89 및 3.05kg임). 흥미롭게도, 이 새끼 돼지들은 가장 오랜 기간 동안 파행을 겪었다. 결론적으로, T04와 T11 체중 증가 사이에 관찰된 차이가 파행이나 백신접종에 의한 것인지 구별할 수 없다.

[0318]

파급(Dissemination)

[0319]

비강내 및 근육내 경로. 바이러스의 파급은 백신접종된 동물에서 평가된 거의 모든 조직에서 사용된 경로와 관계없이 백신 균주의 존재에 의해 입증되었다. 폐, 편도선 및 기관지 림프절 뿐만 아니라 비강 및 장간막 림프절에서 높은 것으로 간주될 수 있는 역가에서 96V198 CLONE 1의 존재는 이 백신 균주의 완전한 유기 파급을 암시한다.

[0320]

퍼짐(Spread)

[0321]

비강내 및 근육내 경로. 비록 구강 액과 직장 면봉법에서의 백신 균주의 검출은 백신접종된 새끼 돼지로부터 동일하지 않았지만, 그것은 비강 면봉법에서 일정하고 높았으며; 백신 균주 검출의 빈도 분포는 시간에 따라 감소했다. 이 결과는 모든 감시병 동물 돼지의 혈액 샘플에서 백신 균주의 검출과 함께 96V198 CLONE 1이 백신 접종 후 일찍 적극적으로 그리고 지속적으로 흘러나왔음을 보여준다. 또한, 감시병 새끼 돼지의 조직 및 혈액 샘플에 백신 균주가 존재한다는 사실은 백신접종된 새끼 돼지에서 퍼진 바이러스가 활성화되어 있었음을 지적하고; 그것은 감시병 동물을 감염시킬 수 있으며, 복제할 수 있고; T09의 IM 감시병 돼지 한 마리도 PRRS와 양립되는 폐 병변 및 IHC에 대한 양성 결과가 있었다. 결론적으로, 위에서 언급한 결과는 96V198 CLONE 1이 최소한 백신접종 후 초기 기간 동안 백신접종된 새끼 돼지로부터 백신접종을 하지 않은 새끼 돼지에서 지속적으로 전달될 수 있음을 나타낸다.

[0322]

폐 병변

[0323]

비강내 및 근육내 경로. PRRS (간질 성 폐렴)와 양립 가능한 거대 및 현미경적 병변을 가지고, PRRSV IHC에 대한 양성 결과를 가진 9 마리의 돼지는 모두 IM 군이었다. 따라서, IN 경로는 안전하다고 결론을 내릴 수 있지만, IM 경로는 각 그룹(T09에서 T12로)의 적어도 한 마리 돼지에서 PRRSV와 양립되는 폐 병변을 유발할 수 있다.

[0324]

실시에 7 PRRSV 혈청양성 임신 암퇘지에게 변형된 EU PRRSV 생백신의 투여시, 단일 투여량의 반복 투여의 안전성

[0325]

본 연구는 임신 후반기 (임신 87 일)에 혈청양성 암퇘지에서 EU PRRS MLV를 단일 투여량의 반복 투여한 경우의 안전성을 입증하기 위해 고안되었다. 첫 번째 또는 두 번째 투여 후에 백신접종 후 전신 반응이 관찰되지 않았다. 또한 모든 관찰 기간 동안 모든 암퇘지에서 기록된 임상적 관찰은 없었다.

[0326]

직장 온도와 관련하여, 백신접종 후 어느 시점에서도 암퇘지 중 어느 것도 열이 나지 않았다 ($RT \geq 40.1^{\circ}C$). 또한 백신접종 직후의 직장 평균 온도는 백신접종 전 평균 직장 온도+1.5°C를 초과하지 않았으며, 백신접종 전 고유의 직장 온도+2°C를 초과한 암퇘지는 없었다.

- [0327] 제 1 투여 및 제 2 투여에서 시험 항목으로 백신접종을 받은 암태지의 63%와 50%에서 주사 부위의 국소 반응이 관찰되었다. 반응은 만저지는 및/또는 눈으로 보이는 부어오름 (0.4에서 2.8 cm 직경) 으로 구성되며, 일에서 6 일 사이에 사라졌다. 임의의 투여 후 투여부위에서 붉어짐, 국소 열 또는 통증의 증가를 보이는 암태지는 없었다.
- [0328] 번식력과 관련하여 낙태 또는 조산 분만은 기록되지 않았다. 또한, 사산, 미라 (mummies), 낮은 생존율의 새끼 돼지 및 젖떼기 전 사망률에 대해 백신접종의 명백한 효과는 관찰되지 않았다. 백신접종은 태어날 때 모은 혈청 시료와 새끼 돼지 젖떼때 취한 취한 혈액에서 검출된 RT-qPCR 음성 결과에서 볼 수 있듯이 태반 감염을 일으키지 않았다. 결론적으로, 백신의 반복된 투여는 임신 후반기에 혈청양성 암태지에서 안전하다.
- [0329] 여기에 사용된 약어는 다음과 같다: BHK-21, 아기 햄스터 신장 클론 21; BRP, 배치 방출 프로토콜(Batch Release Protocol); CCID50; 세포 배양 감염성 투여량 50%; CP, 대조군 산물; D, 일짜; DRAC, 일일 검토 동물 관리; ID, 식별; GLP, 좋은 실험 실습; IF, 면역형광; IV, 정맥내; MLV, 변형된 생백신; MSV, 마스터 씨드 바이러스; NA, 적용불가; P, 계대; PBS, 인산염 완충된 염수; PI, 접종-후; PRRSV, 돼지 생식기 및 호흡기 증후군 바이러스; RT, 직장 온도; RT-qPCR, 정량적 역-전사 중합효소 체 반응; SOP, 표준 작업 과정; S/P, 양성 샘플; TBD, 결정되어야 함; TI, 시험 목록, 그리고 VICH, 국제적 수의학 회의 협약(Veterinary International Conference on Harmonization).
- [0330] 학습 목표 및 정당화
- [0331] EU PRRSV 변형된 생백신 (MLV)은 PRRS 오염 환경에서 암태지 및 새끼 암태지의 적극적인 면역화를 위해, 유럽의 PRRS 바이러스 군주 감염에 의한 바이러스혈증, 태반 감염 및 낙태를 줄이기 위한 것이다. 시행중인 법률에 따르면, 마케팅 허가를 얻기 위해 백신의 안전성을 입증하는 것이 필수적이다. 이 연구는 유럽 약전 7.7:04/2013/50206-수의학 백신 및 면역 혈청 및 VICH GL44의 안전성 평가-수의사 생백신 및 비활성 백신접종에 대한 목표 동물 안전-지침에 따라 기획되었다. 이 연구의 목적은 임신 후반기에 혈청양성 암태지에서 EU PRRS MLV의 반복 투여 (1x+1x)의 안전성을 평가하는 것이다. 테스트된 물질은 2mL/근육 내 5.2 log10CCID50의 용량으로 EU PRRSV, 96v198c1 군주 (MSV+3) 6.6 log10CCID50/바이알이었다. RT qPCR
- [0332] 표준 절차에 따라 시행된 역전사 (RT) qPCR를 사용하여 바이러스혈증 (혈청 내 PRRSV 부하)을 측정했다. 요약하면, 정제된 바이러스 RNA를 주형으로 사용하여 50°C에서 30 분 동안 역전사시키고, 95°C에서 5 분 동안 변성시켰다. 반응의 PCR 프로그램은 95°C에서 20 초 동안 변성시키고, 53°C에서 40 초 동안 어닐링하는 40회 사이클로 구성된다. qRT-PCR은 7500 실시간 PCR 시스템 터모사이클러에서 수행되었다.
- [0333] 프라이머 및 프로브의 서열은 다음과 같다 (연속적으로 서열 번호 6-8):
- [0334] 포워드 프라이머 (Lelystad F): 5'-GCACCACCTCACCCAGAC-3' (최종 농도 0.5 μM).
- [0335] 역 프라이머 (Lelystad R): 5'-CAGTTCCTGCGCCTTGAT-3' (최종 농도 0.5 μM).
- [0336] 프로브 (Lelystad S): 5'-6-FAM-CCTCTGCTTGCAATCGATCCAGAC -TAMRA-3' (최종 농도 0.6 μM).
- [0337] 혈청학
- [0338] IDEXX PRRS X3 ELISA를 사용하여 제조사의 지시에 따라 백신접종 전 수거된 혈청에서 PRRSV에 대한 항체 검사를 실시하였다. 요약하면, 혈청 샘플을 재조합 PRRSV 항원으로 코팅된 96-웰 플레이트에서 1:40으로 희석하고, 18-26°C에서 30 분 동안 배양하였다. 세척 후, 항-돼지 양고추냉이 과산화효소 접합체를 첨가하고 플레이트를 18-26°C에서 30 분 동안 추가로 배양하였다. 결합되지 않은 접합체가 씻겨져서, TMB 기질이 웰에 첨가되었다. 발색은 650 nm에서 측정되었다. S/P 값은 각 샘플에 대해 기록되었다. S/P 비율이 ≥ 0.4인 경우, 샘플은 PRRS 항체에 대하여 양성으로 분류되었다. S/P 비가 < 0.4인 경우, 샘플은 음성으로 분류되었다. ELISA 지침은 연구 파일에 포함되어 있다.
- [0339] 임상 관찰
- [0340] 백신접종 후 (D0에서 D28까지) 모든 암태지에 대해 비정상적인 임상 관찰은 기록되지 않았다.
- [0341] 직장 온도
- [0342] 직장 온도를 연구하기 위해 두 가지 기준을 따랐다:
- [0343] a) 전체 그룹의 백신접종 후 평균 직장 온도는 백신접종 전 평균 직장 온도+1.5°C를 초과해서는 안된다.

- [0344] 1st 백신접종:백신접종-후(D0+4h, D1, D2, D3 또는 D4 시점에서) 평균 직장 온도≤ [백신접종-전 평균 직장 온도 (평균 D-1/D0)]+1.5℃
- [0345] 2nd 백신접종: 백신접종-후 (D14+4h, D15, D16, D17 또는 D18) 평균 직장 온도 ≤ [백신접종-전 평균 직장 온도 (평균 D13/D14)]+1.5℃
- [0346] b) 각 암태지의 백신접종-후 직장 온도는 백신접종-전(Pre-vac) 온도+2℃를 초과해서는 안된다.
- [0347] 1st 백신접종:백신접종-후 (D0+4h, D1, D2, D3 또는 D4) 개별 직장 온도≤ [백신접종-전 개별 직장 온도 (개별 평균 D-1/D0)]+2.0℃
- [0348] 2nd 백신접종: 백신접종-후 (D14+4h, D15, D16, D17 또는 D18) 개별 직장 온도 ≤ [백신접종-전 개별 직장 온도 (개별 평균 D13/D14)]+2.0℃
- [0349] T01과 T02 그룹 모두에서 백신접종-후 평균 RT는 백신접종-전 평균+1.5℃를 초과하지 않았다. 또한, 각 암태지의 백신접종-후 RT는 T01 또는 T02 그룹의 암태지에서 동일한 암태지의 백신접종-전 직장 온도+2℃를 초과하지 않았다. 첫 번째 투여 후, RT의 최대 증가는 T01 그룹에서 0.81℃ (2 일째)와 T02 그룹에서 0.76℃ (0 일째+4h 번째)였다. 두 번째 투여 후, 17 일째 시점에서 T01 (0.81℃)과 T02 (0.47℃) 그룹에서 모두에서 최대 증가가 관찰되었다. T01 또는 T02 그룹의 암태지는 백신접종-후 모든 시점에서 직장 온도가 상승 (≥40.1 ℃)하지 않았다.
- [0350] 백신접종-후 전신 반응
- [0351] T01 또는 T02 군의 암태지에서 백신접종-후 전신 반응이 관찰되지 않았다.
- [0352] 주사 부위의 국소 반응
- [0353] 백신접종-전, 모든 암태지는 주사 부위의 국소 반응 평가를 방해할 수 있는 기존 접종으로 인해 목 부위에 국소 반응이 있는지 검사했다. T01 그룹 (1802와 2259)의 2 마리와 T02 (1663)의 한 마리, 총 3 마리 암태지는 이전 접종으로 인해 오른쪽 목에 오래된 반응이 있었다. 그러나, 이 모든 반응은 아래에 위치하고, 각각의 접종 점으로부터 멀리 떨어져있었다. 두 번째 백신접종-전에 왼쪽 목이 검사되었을 때, T01 그룹2 마리 (316 및 1802)와 T02 그룹의 2 마리 (2547 및 2842), 총 4 마리의 암태지에서도 오래된 반응이 관찰되었다. 오른쪽 목에서 관찰된 바와 같이, 이들 반응은 접종 부위 아래에 위치한다. 모든 경우 (오른쪽 목과 왼쪽 목 모두), 오래된 반응은 백신접종-후 국소 반응의 평가를 잠재적으로 방해하지 않는 것으로 간주되었다. CP (T01 그룹)로 백신접종한 암태지는 백신접종 후 모든 시점에서 국소 반응을 보이지 않았다. T02 그룹에서 백신접종 후 관찰된 국소 반응은 17에 요약되어 있다.
- [0354] 첫 번째 백신접종 후, T02 암태지의 63% (5/8)는 오른쪽 목의 주사 부위에서 눈으로 확인되는 멍/또는 만져지는 부기를 나타내었다. 관찰된 최대 부기는 직경 2.8cm (점수 3에 해당)의 반응으로써, 6 일 동안 지속되었다. 투여부위에서 붉어짐, 국소 열 또는 통증의 증가를 보이는 암태지는 없었다.
- [0355] 두 번째 백신접종 후, T02 암태지의 50% (4/8)에서 눈으로 확인되는 만져지는 부기 (왼쪽 목)가 관찰되었다. 관찰된 모든 반응은 점수 1 또는 2 (직경 1cm 최대)로 채점되었으며, 최대 5 일 동안 지속되었다. 1차 백신접종-후 관찰되는 바와 같이, 주사 부위에서 붉어짐, 국소 열 또는 통증의 증가를 보이는 암태지는 없었다.

표 18

표 18. T02 그룹의 국소 반응 요약

목 측면	눈으로 보이는 붉어짐	눈으로 보이는 부기(swelling)	부기 점수 범위	지속 범위 (일자)	만져지는 부기	통증 반응	열 증가
우측	0/8 (0%)	4/8 (50%)	1-3	1-6	3/8 (38%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)
왼쪽	0/8 (0%)	4/8 (50%)	1-2	1-5	4/8 (50%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)

[0356]

- [0357] 주사 부위의 사후 검사
- [0358] 거시적인 검사에서, 두 그룹의 여러 암태지이 목 근육에 병변을 갖고 있었으며, 주로 목 부위 전체에 퍼져있는 여러 가지 소낭 모양의 결절로 구성되어 있었다. 이 병변은 주사 부위에서 발견되지 않았기 때문에 오래된 주사에 기인한 것이다.
- [0359] T02 암태지의 접종 부위를 검사했을 때, 1/8은 오른쪽 목에 가시적 반응을, 왼쪽 목에는 3/8가 반응을 보였다. T01 그룹에서는 한 마리 암태지 (1/7)가 첫 번째 접종 부위 (오른쪽 목)에서 눈에 보이는 반응을 보였다. 모든 반응은 대부분 바늘 궤적을 따라 열은 근육 섬유로 존재로 묘사되었는데, 측정할 수 있는 정도는 아니다. 또한, T02의 두 암태지에서 다수의 결절이 관찰되었다 (좌측 접종 점).
- [0360] 생식 상태:
- [0361] 어떠한 치료군에서도 낙태 또는 조기 분만이 기록되지 않았다. 임신 기간은 T01 군에서 114 일 내지 117 일 사이, T02 군에서 114 일 내지 119 일 사이였다. 각 암태지에서 건강하게 태어난 돼지는 귀 식별표로 식별되었고, 이것은 유지되었다.
- [0362] 현재 연구에서, EU PRRS MLV의 단일 투여량의 반복 투여의 안전성은 혈청양성 암태지에서 임신 후반 (임신 87 일)에 평가되었다. 안전 매개 변수에는 백신접종에 대한 전신 반응, 백신접종-후 직장 온도, 임상 관찰, 주사 부위의 국소 반응, 생식 능력 및 주사 부위의 사후 검사가 포함된다.
- [0363] 첫 번째 또는 두 번째 투여 후에 백신접종 후 전신 반응이 관찰되지 않았다. 또한 전체 연구 동안 모든 암태지에서 기록된 전반적인 임상적 관찰은 없었다.
- [0364] 직장 온도와 관련하여, 백신접종 후 어느 시점에서도 암태지 중 어느 것도 열이 나지 않았다 ($RT \geq 40.1^{\circ}C$). 또한 백신접종 직후의 직장 평균 온도는 백신접종 전 평균 직장 온도+1.5°C를 초과하지 않았으며, 백신접종 전 고유의 직장 온도+2°C를 초과한 암태지는 없었다.
- [0365] 제 1 투여 및 제 2 투여에서 T02의 63%와 50%에서 주사 부위의 국소 반응이 관찰되었다. 제1 백신접종-후, 관찰된 최대 부기는 직경이 2.8cm인 반응으로써, 최대 6 일 동안 지속되었다. 제 2 백신접종-후, 최대 부종은 직경 1cm이었고 최대 지속 기간은 5 일이었다. 임의의 투여 후 투여부위에서 붉어짐, 국소 열 또는 통증의 증가를 보이는 암태지는 없었다.
- [0366] 사후 검사에서 백신접종 지점에서 보이는 반응은 백신접종된 암태지 중 3/8에서만 관찰되었다. 이들 중 2 마리 (15 및 1663)는 국소 반응의 평가에서 주어진 가장 높은 종기 점수 (각각 2 개와 3 개)에 상응하며; 거시적으로, 병변은 바늘 궤적을 따라 열은 근육 섬유로 묘사되었고, 근육 섬유와 관련된 중등도의 육아근염으로 진단되었다. 암태지 15의 경우, 병변 내부에 백신 액적이 관찰되었고, 이 병변은 검사 물품의 투여 결과로 유도되었다는 사실을 뒷받침했다. 가시적인 반응을 보인 다른 T02 암태지 (2547)의 경우, 병변은 바늘 궤적에 따라 얇은 근육 섬유로 묘사되었지만, 이 경우에는 소포성 물질을 함유한 다수의 결절도 있었다. 조직 병리학적 분석에서, 이 병변은 중증의 육아종성 근염으로 진단되었으나 국소적이지만 광범위한 괴사가 있었다. 접종 부위가 아닌 목 부위에 다수의 결절이 8/8 T02와 5/7 T01 암태지에서도 관찰되었기 때문에, 암태지 2547에서 관찰된 병변이 검사 물품에 의한 것이라기 보다는 이전 주사에 의해 유발되었을 가능성이 있다. 이것은 국부적인 반응의 생체내 평가 도중, 이 암태지가 5 일간 지속된 직경의 <0.5 cm의 부기만 있었다는 사실에 의해 뒷받침될 것이다.
- [0367] PRRSV-관련 생식 장애는 조산 분만, 후기 낙태, 사산 또는 저 생존 새끼 돼지 및 미이라 태아의 증가를 특징으로 한다. 현재 연구에서 낙태 또는 조기 분만은 기록되지 않았다. 또한, 사산, 미라 (mummies), 또는 낮은 생존율의 새끼에 대해 백신접종의 명백한 효과는 관찰되지 않았다. PRRSV 감염은 또한 젖떼기 전 사망률을 증가시킬 수 있다. 현재 연구에서, T01과 T02 그룹에서 젖떼기 전 사망률의 평균%는 차례로 6.0과 5.3으로써, 백신접종이 돼지 생존에 미치는 영향은 없었다.
- [0368] 마지막으로, 출생시 또는 T01과 T02 암태지에서 태어난 새끼 돼지의 젖빨 시기에 채취한 모든 혈청 시료는 RT-qPCR에 의해 PRRSV 음성이었고, 이는 백신접종 후 태반 감염이 없음을 나타낸다.
- [0369] 따라서, 임신 87 일 시점에 EU PRRSV MLV 단일 투여분량을 PRRSV 혈청양성 암태지에 반복 투여하는 것은 비정상적인 전신 반응(아나필락시 성 쇼크, 구토 증후군)을 일으키지 않았고; 백신접종-후 14 일 동안 어떠한 임상 관찰을 유도하지 않았고; 백신접종-후 비정상적인 직장 온도를 유도하지 않았고; 1 차 및 2 차 백신접종 후 암태지의 63%와 50%에서 주사 부위의 국소 반응을 일으켰으며, 이때 이러한 반응은 1 일 내지 6 일 사이에 사라지는

만져지는 밋/또는 눈에 보이는 부기(0.4 내지 2.8 cm 직경)으로 구성되며; 생식 변수에 영향을 미치지 않았고; 그리고 태반 감염을 일으키지 않았다.

도면

도면1a

서열 번호: 5에 대한 완전한 게놈 서열

>96V198c1p49 완전한 게놈 계대 49 (서열 번호: 5)

```

ATGATGTGTAGGGTATTCCCCCTACATACACGACACTTCTAGTGTTTGTG
TGCCTTGGAGGCGTGGGTATAGCCCCGCCCCACCTCTTGGCCCCGTTCCT
AGCCCCAACAGGTATCCTTCTCTCTCGGGGCGAGCGCGCCGCTGCTGCTC
CCTTGCAGCAGGAAGGACCTCCCGAGTATTCCGGAGAGCACCTGCTTTA
CGGGATCTCCACCCCTTTAACCATGTCTGGGACGTTCTCCCGGTGCATGTG
CACCCCGGCTGCCCGGGTATTTTGGAGCGCCGGCCAAAGTCTATTGCACAC
GGTGTCTCAGTGCACGGTCTCTTCTCTCTCCGGAGCTTCAGGACACTGAC
CTCGCTGCAATTGGCTTGTTTTACAAGCCTAAAGACAAGCTTCACTGGAA
AGTCCCCTATCGGCATCCCTCAGGTGGAGTGTACTCCGTCCGGGTGCTGTT
GGCTCTCAGCCATCTTCCCCTTGGCGCGCATGACCTCCGGCAATCACAAAC
TTTCTCCAACGACTTGTGAAGTTGCTGATGTTTTGTACCGTGACGGCTG
CTTGGCACCTCGACACCTTCGCGAACTCCAAGTTTACGAGCGCGGCTGCA
ACTGGTACCCGATCACGGGGCCCGTGCCCGGGATGGGTTTGTACGCGAAC
TCCATGCACGTGTCCGACCAACCGTTCCCTGGTGCCGCTTATGTGTTAAC
GAACTCACCTCTGCCCTCAGCAGGCTTGTGACAGCCGTTTTGTCCATTTG
AGGAGGTTCAATCCGACGTATACAGGTGGAAGAAATTCGTGATTTTTGTG
GATTCTCTTCTGACGGCCGATCTCGCATGATGTGGACACCAGGATCCGA
CGACTCGGCTGCCCTAGAAGTATTGCCACCTGAAGTAGAATGTCGAGTCG
AAATCCTCGTTCGGAGTTTTCTCTGCCACCACCCTGTGACATACCAAC
TGGGAGCTCACTGAGTCCCCTGAGCACGGTTTTTCTCTCAGCACGCTCTCA
TTCTTGTTGGTTACCTTGCCCAAGACCCCTGACGTGTTTGATGGTAAAGTGT
GGCTTTCTTGCTTTTTTGGGCCCTGCCGACCGAAGTGTGGCGTCATGAGGAG
CATCTAGCTAACGCCCTTCGGTTACCAACCAAGTGGGGCGTGCATGGTAA
GTACCTCCAGCGCAGGCTTCAGGTCCGCGGCATGCGTGCTGTAGTTGATC
CTGATGGTCCCATCCACGTTGAAGCGCTGTCTTGCCCCAGTCTTGGATC
AGGCACCTGACTCTAAATGATGACGTACCCCCAGGATTTGTTGCGCTAAC
ATCCCTTCGCATTGAGCCGAACACAGAGCCTACTACTTTCCGGATCTTTC
GGTTTGGAGCGCATAAAGTGGTATGGCGCTGCCGCAAACGGGCTCGTGCT
AAGCGTGCCGCTAAAGGTGAGAAGAATTCAGCTCCACCCCCCAAGGTCGC
CCTGCCGGTCCCCACCTATGGAATTACCACCTACTCTCCACCGACAGACG
GGTCTTGTTGGTTGGCATGTCTTGCCGCCATAATGAACCGGATGATAAAT
GGTGACTTCACGTCCCCTCTGACTCCGTACAACAGACCAGAGGATGATTG
GGCTTCTGATTATGATCTTGCTCAGGCAATCCAATGTCTACAACCTGCCTG

```

도면1b

서열 번호: 5에 대한 완전한 게놈 서열

>96V198c1p49 완전한 게놈 계대 49 (서열 번호: 5)

CTACCGTGGTCCGGAGTCGCGCCTGTCCCAACGCCAAGTACCTCATAAAA
CTCAACGGAGTCCACTGGGAGGTAGAGGTGAGGTCAGGAATGGCTCCTCG
CTCTCTTTCTCGTGAATGTGTGGTTGGCGTTTGCTCTGAAGGTTGTGTTG
CACCGCCTTATCCAGCAGACGGGCTACCAGAACGAGCACTCGAGGCCTTG
GCGTCTGCTTACAGGTTACCCTCTGATTGTGTTAGCTCTGGCATTGCTGA
CTTTCTTGCTAACCCACCTCCTCAGGAATTCTGGACCCTCGACAAAATGT
TGACCTCCCCGTACCCAGAGCGGTCCGGCTTCTCTAGTTTGTATAAATTA
CTATTAGAGGTTGTTCCGCAAAAATGCGGTGCCACGGAAGGGGCTTTTCGT
CTATGCTGTTGAGAGAATGTTGAAGGATTGTCCGAGCTCCAAACAGGCCA
TGGCCCTTCTGGCAAAAATTAAGTTCCATCCTCAAAGGCCCGCTCTGTG
TCCCTTGACGAGTGTTTCCCTACGGATGTTTCAGCCGACTTCGAGCCAGC
ATCTCAGGAAAGGCCCAAAGTTCCGGTGCTGCTGTTGTCTGTGTTTAC
CGGAAGTAAAAGAGTTTCGAAGAAGCAGCCCCAGAAGAAGTTCAAGAGAGT
GGCCATAAGGTCGCGCGCTCTGCATTTGTTGCCGAGGGTCCTAACAAATGA
ACAGGTACCGATGGCTGCCGGCGAGCAACTGAAGCCCGGTGGTCGCGTTT
TGGCGGTGCGGAATGCTCATGAAGGTGTTCTGGCCTCAACTAGTTGACCC
AACCTGATAGGCGGGAACCTCCCCCTTCAGACTCCATGAAAGAGAGCAT
GCTCAATAGCTGGGAAGACGAACCACTGGATTTGTCCCAACCGGCACCAG
CTGTTACAATGACCCCTTGTGAGAGAGCAAACACCCGACAACCTGGGTCTT
GATGCCGGTGCCCTCCCCGTCACCGTTCGAAAATTTGTCCCGACAGGGCC
TACACTCCGTCATGTTGAGCACTGCGGCACGGAGTCAGGCGACAGCAGTT
CGCCCTTGGATCTGTCTTATGCGCAAAACCTGGACCAGCCTTAAATCTA
TCCTTGGCCGCTTGGCCAGTGAGGGCCACCGCGTCTGACCTGGCTGGGT
CCACGGTAGGCGTGAGCCTATCTTTGTGAAGCCTCGAGATGCTTTCTCTG
ACGGCGATTACGCCCTTCAGCTCGGGGAGCTGTCTGAATCCGGCTCCGTC
ATCGAGTTTGACCGGACAAGAAATGCTCCGGCGGTGACGCCCCCTGTTGA
CTTGACGGCTTCGAACAAGGCCCTCTCTGTGGTTGATCCTTTTGAATTTG
CCGAACTCAAGCGCCCGCGTTTTTCCGCACAAGCCTTAATTGACCGAGGC
GGTCCACTTGCCGACGTCCATGCAAAAATAAAGAACCAGGTATATGAACA
GTGCCCTCCAGGCTTGTGAGCCTGGCAGTCGCGCAACCCAGCCACCAAGA
AGTGGCTCGATAAAATGTGGGATAGGGTGGACATGAAGACTTGGCGCTGT
ACCTCGCAGTTCCAAGCTGGTCGCATTCTTGCCTCCCTTAAATTCCTCCC

도면1c

서열 번호: 5에 대한 완전한 게놈 서열

>96V198c1p49 완전한 게놈 계대 49 (서열 번호: 5)

TGACATGATTTCAGGACACACCACCTCCTGTTCTTAGGAAGAATCGGGCTA
GTGATAATGCCGGCCTGAAGCGACTGGTGGCGCAGTGGGACAGAAAATTG
AGTGCAACCCCCCTTCAAAACCGGTTGGACCAACACTTGACCAAATTGT
CCCTTCGCCCCACGGGTACCCAGCAAGAAGATGTCACCTCCTCCGATGGGC
CATCTCATGCGCCGGATCCTCCTAGTCGAATGAGCAGAGTGGGAGTTGG
AAGGGCCTTGTGCTCTCTGGTACCCGTCTCGCGGGGTCCATTAGTCAGCA
TTTCATGACATGGGTTTTTGGAGTTTTCTCCCATCTCCAGCTTTTGAC
TCACACTTTTCTCGCCGAGGGGCTCTATGGCTTCAGGTGATTGGATGTTT
GCAGGTGTTGTTTTACTTGCTCTCCTGCTCTGTCTGTTCTTACCCAGTATT
CGGGTGCCCTCCCTTATTGGGTGTCCTTTCTGGCTCTGTGCGGCGGTTCT
GTCTGGGGGTTTTTGGTTCTTGGATGGCTTTCGCTGTATTTTATTCTCG
ACTCCATCCAACCCAGTCCGTTCTTCTTGTGACCAGATTCCGCCGAGTG
TCATGCTGAGCTTTTGGCTCTTGAGCAGCGCCAACCTTGGGAACCTGTGC
GCGGCCCTTGTGGTGGGCCCTCGGGCCTCTTATGTGTCAATTCTTGGCAAG
CTACTCGGTGGGTACGTTATCTCTGGCATGTTTTCTTACGTTTATGCAI
GCTTGACAGATTTGGCCCTTTCTCTTGTATTATGTGGTGTCCAGGGGCGTT
GTCACAAGTGTGGGGAAAGTGTATAAGAACAGCTCCGGCGGAGGTGGCT
CTCAATGTGTTCCCTTTCTCGCGCGCTACCCGTAGCTCTCTTGTGTCCTT
GTGCGATCGGTTCCAAGCGCCAAAAGGGGTTGATCCTGTGTACTTGGCAA
CGGGTTGGCGCGGGTGTGGTGTGGTGGAGTCCCATTCATCAACCGCAC
CAAAAACCCATAGCTTATGCTAATCTGGATGAAAAGAAAATATCTGCCCA
AACGGTGGTTGCTGTCCACACGATCCAGTCAGGCCATCAAGTGCCTGA
AAGTTTTGCAGGCGGGAGGAGCCATCGTGGACCAGCCACACCTGAGGTC
GTCCGTGTATCCGAAATCCCTTCTCAGCCCCATTTTCCCAAAAGTTCC
AGTCAACCCAGATTGTAAGTTGTGGTGGATTCCGACACTTTTGTGGCTG
CGGTTGCTGCGGCTACTCGACAGCACAACTGGTCTTAGGCCAGGGCAAC
TTTGCCAAGTTAAATCAGATTCCCTCAGGAGCTCTATCTCCACCAAAGC
GATTGGCGGGGCTCTTACACCTTGCTGTGGCTCAAGTTTCTGTGTGGA
CTCTTGTTCACCTCATCCTCGGTCTTTGGTTACGTACCCCAAGTGTGT
GGCCGAGGAACCTCTGACTCATGGTGTCAAATCCTTTTTCATACCCTAC
CTATGGCCCCGGGTTGTGTGCTCCTCTCGACTTTGTGTGTCTGCCGACG
GGGTCACTCTACCATTGTTCTCAGCCGTGGCTCAACTCTCCGGTAGAGAG

도면1d

서열 번호: 5에 대한 완전한 게놈 서열

>96V198c1p49 완전한 게놈 계대 49 (서열 번호: 5)

GTGGGGATTTTTATTTTGGTACTCGTCTCCTTGATGGCTTTGGCCCACCG
CATGGCCCTTAAGGCAGACATGTTGATGGTCTTTCTGGCTTTTTGTGCTT
ACGCCTGGCCCATGAGCTCCTGGTTGATTGCTTCTTCTACACTCTTG
AAGTGGGTACCCCTCCACCCCTTACTATGCTTTGGGTGCACTCATTCTT
GGTGTTTTGTCTGCCAGCAGCCGGCATCCTCTCACTAGGGATAACTGGCC
TTCTTTGGGCGGTTGGCCGCTTACTCAGGTTGCCGGAATTATTACACCT
TATGACATCCACCACTACACCTCTGGGCCACGTGGCGCTGCAGCTGTGGC
CACAGCCCCAGAAGGCACCTTATATGGCCGCCGTCCGGAGAGCTGCTTTAA
CTGGGCGAACTTTAATCTTCACCCCGTCTGCAGTTGGATCCCTTCTCGAA
GGAGCTTTCAGGACTCATAAACCTTGTCTTAACACCGTAAATGTTGTAGG
CTCTCCCTTGGTTCCGGCGGGGTTTTCACTATTGACGGCAGAAAAATTG
TTGTCACTGCTGCCCATGTGTTGAACGGCGACACAGCTAGAGTCACCGGC
GACTCCTACAACCGCATGCATACTTTCAAGACCAATGGTGATTATGCCTG
GTCCCATGCTGATGACTGGCGGGGCGTTGCCCTGCGGTCAAGGTTGCGA
AGGGGTACCGCGGTCGTGCCCTACTGGCAAACATCAACTGGCGTCGAACCC
GGTGTATTGGGGAAGGGTTCGCCTTCTGTTTCACCACCTGTGGCGATTCT
GGGGTCACCCGTCATCTCAGAATCCGGTGATCTCATTGGAATCCATACCG
GTTCAAATAAACTTGGTTCTGGTCTTGTGACAACCCCTGAAGGGGAGACA
TGTACCATCAAAGAAACCAAGCTCTCTGACCTCTCCAGACATTTGCGAGG
CCCAAGCGTTCCTCTTGGGGATATTAAATTGAGTCCAGCCATCATCCCTG
ATATAACATCCATTCCGAGTGAATTGGCATCGCTCCTATCCTCCGTCCTT
GTAGTGGAAGCGGCCTCTCGACCGTTCAACTTTTGTGTGCTTTTTCCT
ACTTTGGCGCATGATGGGCCATGCCTGGACTCCCATGTTGCCGTGGGTT
TCTTTTACTGAATGAAATTCTTCAGCAGTTTGGTCCGAGCCGTGTTT
TCTTTTGCATTTTGTGCTTGCATGGGCCACCCCTGGTCTGCACAGGT
GTTGATGATTAGACTCCTCACGGCATCTCTCAACCGCAATAAGCTTTCTC
TGGCGTTCTACGCACTCGGGGGGGTCGTCCGTTTGGCCGCTGAAATCGGG
ACTTTTGCTGGCAAATTGCCCTGAATTGTCTCAAACCCCTTTCGACATACTG
CTTCTTACCTAGGGTCCCTTGCTATGACCAGTTGTGTTCCACCATCATCA
TTGGTGGACTCCATGCCCTCGGTGTAATTCTGTGTTGTTCAAATACCGG
TGCTCCACAACATGCTCGTTGGTGATGGGAGTTTTTCAAGCGCCTTCTT

도면1e

서열 번호: 5에 대한 완전한 게놈 서열

>96V198c1p49 완전한 게놈 계대 49 (서열 번호: 5)

```
CCTACGGTATTTTGCAGAGGGTAATCTCAGAAAAGGTGTTTCGCAGTCCT
GTGGCATGAATAACGAGTCCCTGACGGCTGCTTTGGCTTGCAAGTTGTCA
CGGGCTGACCTTGATTTTTTGTCCAGCTTAACGAACTTCAAGTGCTTTGT
ATCTGCTTCGAATATGAAAAATGCTGCCGGCCAGTACATTGAAGCGGCGT
ATGCCAAGGCCCTGCGCCAAGAGTTGGCGTCTCTAGTTTCAAGTTGACAAA
ATGAAAGGAGTTTTGTCCAACTCGAGGCCTTTGCTGAAACAGCTACTCC
GTCCCTTGACATAGGTGACGTGATTGTTCTGCTTGGGCAACATCCACACG
GATCTATCCTTGATATTAATGTGGGGACTGAGAGGAAAACTGTGTCCGTG
CAAGAGACCCGGAGCCTAGGCGGTTCCAAATTCAAGTGTGTTGTTACTGTCGT
GTCTAACACACCCGTGGACGCCCTTAACCGGCATCCCACTCCAGACACCAA
CCCCCTCTTTTGAAGAATGGTCCGCGTCATCGCAGCGAAGAAGACGATCTT
AAAGTCGAGAGGATGAAGAAACACTGTGTGCCCTCGGCTTCCACAACAT
CAATGGCAAAGTTTACTGCAAGATTGGGACAAGTCCACCGGTGACACCT
TTTACACGGATGATTCCCGGTATACCCACGACCATGCTCTTCAGGACAGG
TCAGCCGACTACAGAGACAGGGACTATGAGGGTGTGCAAACCGCCCCCA
ACAGGGATTTGATCCAAAGTCTGAAACCCCTGTCCGCACTGTTGTGATCG
GCGGTATTACGTATAACAGGTATCTGACTAAGGGTAAGGAGGTTCTGGTT
CCCAAGCCCGACAATTGCCCTGAAGCTGCCAAGCTGTCTCTTGAGCAAGC
TCTCGCTGGGATGGGCCAACTTGCGACCTTACAGCTGCCGAGGTGGAAA
AGTTAAAGCGCATCATCAGTCAACTCCAAGGTTTGACCACTGAACAGGCT
TTAAACTGCTAGCCGCTAGCGGCTTGACCCGCTGTGGCCGCGCGGCTTA
GTTGTTACTGAAACGGCGGTAAAAATTGTAAGATACCACAGCAGAACTTT
CACCTTGGGGCCCTTTGGACCTAAAAGTCGCTTCTGAGGTGGAGGTGAAGA
GATCAACTGAGCAGGGCCACGCTGTTGTGGCAAACCTATGTTCTGGTGT
GTATTGATGAGACCTCACCCACCGTCCCTTGTGACGTTCTTCTGAAACC
CGGACTTGACACAACACCCGGCATTCAACCGGGGCATGGGGCCGGGAATA
TGGGCGTGGACGGTTCATTGGGATTTGAAACCGCACCCACAAAGGCA
GAGCTCGAGTTGTCCAGGCAAATAATCCAAGCATGTGAAGTCAGGCGCGG
GGATGCCCCGAACCTCCAACCTCCCTTACAAGCTCTGTCCAGTTAGGGGGG
ATCCTGAGCGGCATAAAGGCCGCTTATCAATACCAGGTTTGGAGATTTG
CCTTACAAGACTCCTCAAGACACCAAGTCCGCAATCCACGCGGCTTGTG
CCTGCACCCCAACGGGGCTCCCGTGTCTGATGGTAAATCCACATTAGGCA
```

도면1f

서열 번호: 5에 대한 완전한 게놈 서열

>96V198c1p49 완전한 게놈 계대 49 (서열 번호: 5)

```
CCACTCTTCAACACGGTTTTCGAGCTTTATGTCCCTACTGTGCCCTATAGT
GTCATGGAGTACCTTGATTACGCCCCTGACACCCCCTTTATGTGTACCAA
ACATGGTACCCCCGAGGCTGCTGCAGAGGACCTTCGAAAATATGACTTAT
CCACCCAAGGGTTTGTCTGCTGGGGTCTACGTCTAGTACGCAGATTCT
ATCTTTGGCCATATTTGGTAAGGCACCGCCACTGTTCCCTCCCATCACTTA
TCCCGCCAAGAATCTATGGCAGGGATCAATGGCCAGAGGTTCCCAACAA
AAGACGTTTCAGAGCATACCTGAAATTGATGAAATGTGTGCCCGCGCTGTC
AAAGAGAATTGGCAAACTGTGACGCCTTGACCCCTCAAAAAACAGTATTG
TTCCAAGCCTAAAACCAGGACCATCCTTGGTACCAACAACCTTCATTGCCT
TGGCTCACAGGTCGGCACTCAGCGGTGTCACTCAGGCGTTCATGAAAAA
GCCTGGGAAGTCCCCGATCGCCTTGGGGAAAAACAAATTTAAGGAGTTGCA
CTGCACTGTGCGCGGTAGGTGCCTCGAGGCCGACTTGGCCTCTTGTGATC
GCAGCACCCCGGCCATCGTGAGGTGGTTTGTGTGCCAACCTCCTGTACGAA
CTTGCGGGTTGTGAAGAGTACTTGCCAAGCTATGTGCTCAATTGTTGCCA
TGACCTGGTGGCAACGCAAAATGGCGCCTTCACAAAACGTGGTGGCCTGT
CATCTGGAGACCCCGTTACCACTGTGTCCAACACAGTGTATTCACTGGTG
ATTTATGCTCAGCACATGGTGCTGTGCGCTTTGAAGATGGGTCATGAAAT
CGGCCTCAAGTTCCTCGAGGAACAGCTTAAGTTCGAGGACCTTCTCGAAA
TCCAGCCTATGTTGGTATATTCTGATGACCTTGTATTGTATGCTGAAAGA
CCCACCTTCCCCAATTACCATGGTGGGTGAGCACCTTGACCTGATGCT
GGGTTTTAAGACAGACCCAAAAAAGACTGTCATAACTGACAAACCCAGCT
TTCTTGCTGTAGAATCGAAGCGGGGCGCAACTGGTTCCAGTCGCGAC
CGCATTTCTGGCTGCTCTTGCAATATCACATGAAGGCGCAGAACGCCTCAGA
GTATTATGCGTCTGCTGCCGCGATTCTGATGGACTCGTGTGCTTGCATTG
ACCACGATCCTGAGTGGTATGAGGACCTCATCTGCGGCATTGCTCGATGC
GCCCCCAGGATGGCTACAGTTTCCCAGGCCCGCGTTCTTCATGTCCAT
GTGGGAGAAGCTGAAAAGTCACAATGAAGGCAAGAAATTCGCCCACTGTG
GCATTTGTGACGCCAAGGCCGATCATGCGTCCGCGCTGTGGGCTTGATTTA
TGTCGTTCCTACTCGCACTTTCATCAACACTGCCCTGTTACTCTGAGCTG
CGGCCATCATGCCGGTTCAAAAGAATGCCACAGTGTGAGTCACCTGTTG
GAGCTGGTAAATCCCCCTTGATGCAGTGCTGAAACAAATCCCGTACAAA
CCCCCTCGTCTGTATCATGAAGGTGGACAATAAAACAACGACCCTTGA
```

도면 1g

서열 번호: 5에 대한 완전한 게놈 서열

>96V198c1p49 완전한 게놈 계대 49 (서열 번호: 5)

```

CCCCGGAAGGTATCAGTCCCGTCGAGGTCTTGTTGCTGTCAAGAGGGGTA
TTGCAGGCAATGAGGTGTGATCTCGCTGATGGAGACTATCAGGTGGTGCCC
CTTTTGCCAACTGCAAAGACATAAACATGGTGAAGGTGGCTGTCAATGT
GCTACTCAGCAAGTTCATAGTGGGGCCGCCAGGTTCCGGCAAGACGACCT
GGCTACTGAGTCAAGTTCAGGATGATGATGTCTATACACCTACCCAT
CAGACCATGTTTCGACATAGTCAATGCCCTCAAAGTCTGTAGGTATTCCAT
CCCAGTGGCTTCAGGGCTCCCTTTCCACCGCCCGCagatctggaCCGT
GGGTTAGGCTCGTTGCTAGCGGGCACATCCCTGGCCGAATATCATACCTT
GACGAGGCCGGATATTGCAATCATCTGGATATTCTCAGACTGCTTTCTAA
GACACCTCTTGTTGTTTGGGTGACCTTCAGCAACTTCACCCTGTCCGGCT
TTGACTCTTACTGTTATGTTTTTGATCACATGCCTCATAAGCAGCTGACC
ACTATTTATAGATTTGGCCCCAATATCTGTTCTGCCATTCAACCTTGTTA
CAGGGA AAAA CTGAATCTAAGGCCAGGAACACTAGGGTGGTTTTTACTG
CCCGGCCCGTGGCTTTTGGTCAGGTGTTGACGCCATATCATAAAGACCGC
ACCGGCTCAGCTATAACCATAGATTTCATCCAGGGAGCCACCTTTGATGT
TGTGACGCTGCATTTGCCGTCGCCAGATTCCCTGAACAAATCCCGGGCTC
TTGTAGCTATCACTCGGGCAAGGCATGGGTTGTTTCATCTATGACCCTCAT
AACCAACTCCGGAAGTTTTTCAACTTAACACCTGAGCGCACTGATTGCAA
CCTCGTGTCAACCGCGGGGACGAGTTGGTAGTTTTGAATGCAGATAATG
CAGTCACGACTGTGGCTAAGGTTCTGGAGGCGGGCCCGTCTCGGTTTCGA
GTATCAGATCCAAGGTGCAAGTCTCTTTAGCCGCTTGCTCGGCCAGTCT
GGAAGGAGGCTGCATGCCACTGCCGCAAGTGGCACATAATCTGGGGTTTT
ACTTCTCTCCAGATAGTCCAGCATTTGCACCTCTGCCAAAAGAGCTGGCA
CCACATTGGCCGGTTTGTACTAGTCAGAACAAACCAGGCATGGCCCCGACCG
ACTTGTGCGCTAGTATGCGGCCAGTTGATGCCCGCTACAGCAAGCCTATGG
TCGGTGCAGGGTATGTGGTTGGGCCATCCACTTTCCTTGGCACTCCTGGT
GTGGTGTACATACTATCTCACGCTGTACATCAGGGGTGAGCCCCAGGCCTT
GCCGGAGACACTCGTCTCAACGGGACGTATAGCTACTGATTGTGAGAGT
ATCTCGACGCAGCTGAGGAAGAAGCAGCTAAAGAACTCCCTCACGCATTTC
ATTGGCGATGTCAAAGGTACTACAGTGGGGGGGTGTCACCACATTACGTC
AAAATACCTTCCCAGGTCTTGGCCAAAGGACTCCGTTGCCGTGGTCGGAG
TGAGTTCCGCCGGCAAGGCTGCCAAAGCCGTGTGTACTCTCACCGATGTG

```

도면 1h

서열 번호: 5에 대한 완전한 게놈 서열

>96V198c1p49 완전한 게놈 계대 49 (서열 번호: 5)

TATCTTCCCGAGCTCCGGCCATATTGCAACCGGAAACAGCATCGAAATG
CTGGAAACTTAAACTAGACTTCAGGGATGTCAGACTGATGGTCTGGAAAG
GAGCCACCGCATATTTCCAACCTGGAGGGGCTCACATGGTCAGCGCTGCCC
GACTATGCCAGGTTCAATTCAGCTACCAAAAGATGCCGTTGTGTACATTGA
TCCGTGCATAGGACCGGCAACAGCCAACCGTAAGGTTGTGAGAACTACAG
ATTGGCGAGCTGACCTGGCAGTGACACCGTACGACTACGGTGCTCAGAGC
ATTTTGACTACAGCCTGGTTCGAGGACCTTGGGCCGAGTGGAAGATTTT
AGGGTTGCAACCCCTTCAAGCGGGCATTGGCTTTGAAAACACTGAGGATT
GGGCGATCCTTGCACGTCGCATGAACGACGGCAAGGACTACACTGACTAT
AACTGGAAATTGTGTTTCGACAACGCCACATGCCATCTACGGACGTGCCCG
TGACCATACGTATCACTTTGCCCTGGCACTGAACTGCAAGTAGAGCTAG
GTAAACCTCGGCTACCGCTGAGCAAGTACCGTGAATCTAGAGTGATGCA
ATGGGGTCACTGTGGAGTAAATCAGTCAACTGTTTCGTGGATGCCCTTCAC
TGAGTTCTTGTGTAGTGTGGTTGATATTGTCATCTTCTTGCCATACTGT
TTGGGTTCAACGTTGCGAGGTGGTTACTGGTCTTTTTTCTCAGAGTGGTT
TGCTCCGCGCTTCTCCGTTTCGCGCTCTGCCATTCACTCTTCCGAACTATC
GAAGGTCCTATGAGGGCTTGCTACCTAATTGCAGACCGGATGTTCCACAA
TTCGCATTCAAGCACCCATTGGGTATGTTTGGCACATGCGAGTTTCCCA
CTTAATTGACGAAATGGTCTCTCGCCGCATTTATCAGACCATGGAACATT
CAGGTCAAGCGGCTTGAAGCAGGTGGTTAGTGAAGCTACTCTCACAAGA
CTGTCAAAGCTCGACATAGTTCTCCACTTCCAACACCTGGCCGCAATAGA
GGCGGATTCTTGCCGCTTCCCTCAGCTCAGCACTGTGATGCTGAAAAATC
TTGCTGTTGGCAATATGAGCCTACAGTACAACACCAGTTGGACCGCGTT
GAGCTCATCTTCCCAACACCAGGTACGAGGCCCAAATTGACCGATTTTAG
ACAATGGCTCGTCAGTGTGCACGCTTCTATTTTTCTCTCTGTGGCCTCAT
CAGTTACCTTGTTTCATAGTGCTTTGGCTTCGAATTCAGCTCTACGCTAT
GTTTTTGGTTTCCATTGGCCACCGGCAACACATCATTCGAGCTAACCATC
AATTACTCTATATGTAAGCCCTGTCTCACCAGTCAAGCGGCTCGACAAAG
GCTCGAACCCGGTCGCAACATGTGGTGCAAAATAGGGCACACCACGTGTG
AGGAGCGTGACCAIGATGAGTTGTCAATGACCATTCCGTCGGGTACGAT
AACCTCAAACCTTGAGGGTTATTACGCTTGGCTGGCTTTTTTGTCTTTTC
TTACGCAGCCCAATTTTCATCCAGAGTTGTTTCGGAATAGGAATGTGTAC

도면1i

서열 번호: 5에 대한 완전한 게놈 서열

>96V198c1p49 완전한 게놈 계대 49 (서열 번호: 5)

```
GCGTCTTCGTGGATAAACGGCACCAGTTCATCTGTGCCGAGCACGACGGA
CAAAATTC AACCGTATCCACCGAACATAATATTTCCGCATTGTATGCGGC
GTACTACCACCACAGGTAGACGGGGGCAATTGGTTCCACCTGGAATGGC
TGCGGCCTTTCTTTCTCCTGGCTAGTACTCAATATTTTCATGGTTTCTG
AGGCGTTTCGCCTGCAAGCCCTGTTTCTCGACGCATTATCAGATATTGAG
ACCAACACGACCGCGGCTGCCGGTTTCATGGTCCTTCAGGACATCAACTG
TTTCCACAGTGGCTCAGAGGCACAAACGACTGGTCCCATCAGAAAAGTCGT
CCCAATGCCGTGAAGCCGTCCGCACTCCCCAGTACATCAAGATAACGGCC
AATCTGACCGACGAATCATACTTGTACAACCGCGGACTTGCTGATGCTTTC
TGCGTGCCCTTTTCTACGCCCTCAGAGATGAGCGAGAAAAGGCTTTAAAGTCA
TTTTTGGAATGTCTCTGGCGTTGTCTCCGCTTGTTGCAATTTTACAGAT
TATGTGGCCCATCTGACCCAAACATACCCAGCAGCATCATTGGTAACCAA
TCACATTCGGTTTGCTACATTTCCCTGACACCATCAGCGATGAGGTGGGCTA
CAACCATTGCTTTGTTTGTTCGCCATTCTCTTGGCGATATGAGATGTTCTC
ACAAATCGGGGTGTTTCTTGACTCCGCACTCTTGCTTTTGGTGGTTTTTT
TTGCTGTGTACCGCTTGCTCCTGGTCCTTTGCCGATGGCAACGGCGACAG
CTCGACATACCAATATATATATAAATTGACGATATGCGAGCTGAATGGGA
CCGAATGGCTGTCTGACCATTTTAATTGGGCAGTCGAGACTTTTGTGCTC
TACCCAGTGGCGACTCATATCCTCTCACTGGGTTTCCTCACGACAAGTCA
TTTCTTGATGCGTTTCGGTCTTGGAGCTGTGTCAATTACAGGGTTTGTG
GCGGGCGGTACGTGCTCAGCAGCGGTACGGCGCTTGTCACCTAGCAGCG
CTCGTATGTTTTGTTATCCGTGCTGCCAAAAATTGTATGGCTTGCCGCTA
TGCTCGTACCCGTTTACCAACTTCATTGTGGATGACCGGGGGAGAATCC
ATCGGTGGAGGTCTCCAATAGTGGTGGAAAAATTAGGTAAAGCTGACGTC
GGCGGCGACCTTGTACCATCAAACATGTCATCCTCGAAGGAGTCAAAGC
TCAACCCTTGACGAGGACTTCGGCCGAGCAATGGGAGGCCTAGATAATTT
CTGCAACGATCCCAACCGCCGACAAAAGCTTGTGCTAGCCTTTAGCATCA
CGTATACACCCATCATGATATACGCCCTTAAGGTGTACGCGGCCGACTC
TTGGGGTTGTTGACATCTTGATATTTCTGAAGTGTCTTTTACGTTGCG
ATACATGACATATATGCAATTTGAATCCACCAACCGTGTGCGGCTTACCA
TGGGGGGCGTTGTGCGCCCTTCTGTGGGGCGTTTATAGTTTCATAGAGTCA
TGGAAGTTTATCACTTCCAGATGCAGATTGTGTTGCCTAGGCCGGCGATA
```

도면1j

서열 번호: 5에 대한 완전한 게놈 서열

>96V198c1p49 완전한 게놈 계대 49 (서열 번호: 5)

```
CATTCTGGCCCCCTGCCACACGCTAGAAAGTGCTGCAGGCCTCCATCCGA
TCCCAGCGTCTGGTAACCAAGCATACGCTGTGAGAAAGCCCGGACTAACA
TCAGTGAACGGCACTCTGGTACCAGGACTTCGAGGCCTCGTGCTGGGCGG
CAAACGAGCTGTTAAACGAGGAGTGGTTAACCTCGTCAAGTATGGCCGGT
AAAAACAGAGCCAGAAGAAAAAGAAAAATCCAGCTCCAATGGGGAATGG
CCAGTCAGTCAATCAACTGTGCCAGCTGTGGGCACAATGATAAAGTCCC
AGCGCCAGCGACCCAGGGGAGGACAGGCTAAAAAGAAAAAGCCTGAGAAG
CCACATTTCCCCCTGGCTGCTGAAGATGACGTCCGGCACCATCTCACCCA
GACCGAGCGCTCCCTTTGCTTGCAATCGATCCAGACGGCTTTTAATCAAG
GCGCAGGAAGTGCCTCGCTTTCATCCAGCGGGAAGATCGGTTTTTCAGGTT
GAGTTTATGCTACCGGTTGCTCATACAGTGGCCTGATTGCGGTGACTTC
TACATCCGCCCGGTGAGGATGCAAATTAATTTGATAGTCAGGTGAATGGCC
GCGATTGGCGTGTGGCCTCTGAGTCACCTATTCAATTAGGGCGATCACAT
GGGGGTCAGACTTAATTAGGCAGGAACCATGTGACCGAAATT
```

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Zoetis Services LLC
 Calvert, Jay Gregory
 Balasch, Monica
 Fort, Maria
 Pearce, Douglas S.
 Keith, Marcia L.

<120> EFFECTIVE VACCINATION AGAINST EUROPEAN STRAINS OF PORCINE
 REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME (PRRS) VIRUS PRIOR TO
 WEANING

<130> ZP000148A PCT

<150> 62/434,144

<151> 2016-12-14

<160> 8

<170> Patent In version 3.5

<210> 1

<211> 15092

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<

220><223> PRRS virus isolate 96V198 - passage 0

<400> 1

atgatgtgta gggattatccc cctacataca cgacacttct agtgtttgtg tgccttggag	60
gcgtgggtac agccccgccc cacctcttgg ccctgttct agccaacag gtatccttct	120
ctctcggggc gagcgcgcgc cctgtctctc ccttcagca ggaaggacct cccgagtatt	180
tccggagagc acctgcttta cgggatctcc accctttaac catgtctggg acgttctccc	240
ggtgcatgtg cccccggct gcccggtat ttggaacgc cggccaagtc ttttcacac	300
ggtgtctcag tgcgcggtct cttctctctc cggagcttca ggacactgac ctgctgcaa	360
ttggcttgtt ttacaagcct aaagacaagc ttacttgga agtcctatc ggcatccctc	420
aggtggagtg tactccgtcc ggggtctgtt ggctctcagc catcttcccc ttggcgcgca	480
tgacctcgg caatcacaac tttctccaac gacttgtgaa ggttctgat gttttgtacc	540
gtgacggctg ctiggcacct cgacaccttc gcgaactcca agtttacgag cgcggctgca	600
actgttacc gatcacgggg ccctgcccc ggatgggttt gtacgcaac tccatgcacg	660
tgccgacca accgtttcct ggtgccactc atgtgttaac gaactcacct ctgcctcagc	720

aggcttgtcg acagccgttt tgtccatttg aggaggttca ttccgacgta tacaggtgga 780

agaaattcgt gatTTTTgtg gattcctctt ctgacggccg atctcgcatg atgtggacac 840

caggatccga cgactcggct gccttagaag tattgccacc tgaactagaa tgtcgagtcg 900

aaatcctcgt tcggagtttt cctgcccacc accctgtcga catcaccaac tgggagctca 960

ctgagtcgcc tgagcacggt ttttccttca gcacgtctca ttcttgtggt taccttgccc 1020

aaaacctga cgtgtttgat ggtaagtgtt ggctttcttg ctttttgggc ctgccgaccg 1080

aagtgtggcg tcatgaggag tatctagcta acgcttcgg ttaccaaacc aagtggggcg 1140

tgcattgtaa gtacctccag cgcaggcttc aggtccgcgg catgcgtgct gtagttgatc 1200

ctgatggtcc catccacgtt gaagcgtgt cttgccccca gtcttggatc aggcacctga 1260

ctctaaatga tgacgtcacc ccaggatttg ttgcctaac atcccttcgc attgagccga 1320

acacagagcc tactactttc cggatctttc ggtttggagc gcataagtgg tatggcgtg 1380

ccggcaaacg ggctcgtgct aagcgtgccg ctaaaggtag gaagaattca gctcccacc 1440

ccaaggtcgc cctgccggtc cccacctgtg gaattaccac ctactctcca ccgacagacg 1500

ggtcttgtgg ttggcatgtc cttgccgcca taatgaaccg gatgataaat ggtgacttca 1560

cgtccctct gactccgtac aacagaccag aggatgattg ggcttctgat tatgatcttg 1620

ctcaggcaat ccaatgtcta caactgctg ctaccgtggt ccggagtcgc gcctgtccta 1680

acgccaagta cctcataaaa ctcaacggag tccactggga ggtagaggtag aggtcaggaa 1740

tggctcctcg ctctctttct cgtgaatgtg tggttggcgt ttgctctgaa ggttgtgttg 1800

caccgcctta tccagcagac gggctaccag aacgagcact cgaggccttg gcgtctgctt 1860

acaggttacc ctctgattgt gttagctctg gcattgctga ctttcttgct aacccacctc 1920

ctcaggaatt ctggaccctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccagag cggtcgggt 1980

tctctagttt gtataaatta ctattagagg ttgttccgca aaaatgcggt gccacggaag 2040

gggctttcgt ctatgctgtt gagagaatgt tgaaggattg tccgagctcc aaacaggcca 2100

tggcccttct ggcaaaaatt aaagtccat cctcaaagge cccgtctgtg tcccttgacg 2160

agtgtttccc tacggatgtt tcagccgact tcgagccagc atctcaggaa aggccccaaa 2220

gttccggtgc tgcgttgttc ctgtgttcac cggaagtaaa agagttcgaa gaagcagccc 2280

cagaagaagt tcaagagagt ggccacaagg tgcgccgctc tgcatttgtt gccgagggtc 2340

ctaacaatga acaggtaccg atggctgccg gcgagcaact gaagcccggg ggtcgcgttt 2400

tggcggtcgg gaatgctcat gaaggtgttc tggcctcaac tagtccgact aacctgatag 2460

gcgggaaactt ccccccttca gactccatga aagagagcat gctcaatagc tgggaagacg 2520

aaccactgga tttgtcccaa ccggcaccag ctgttacaat gacccttgtg agagagcaaa 2580

cacccgacaa cctgggtcct gatgccgtg ccttccccgt caccgttcga aaatttgtcc 2640

cgacagggcc tacactcct catgttgagc actgcggcac ggagtcaggc gacagcagtt 2700

cgcccttgga tctgtcttat gcgcaaacc tggaccagcc tttaaactta tccttggccg 2760

cttggccagt gagggccacc gcgtctgacc ctggctgggt ccacggtagg cgcgagccta 2820

tctttgtaaa gcctcgagat gctttctctg acggcgattc agcccttcag ttcggggagc 2880

tgtctgaatc cggtctctgc atcgagtttg accggacaag aaatgctccg gcggtcgacg 2940

cctctgttga cttagcggct tcgaacgagg cctctctctg ggttgatcct ttcgaatttg 3000

ccgaactcaa gcgccccgt tttccgcac aagccttaat tgaccgaggc ggtccacttg 3060

ccgacgtcca tgcaaaaaa aagaaccggg tatatgaaca gtgcctccag gcttgtgagc 3120

ctggcagtcg cgcaacccca gccaccaagg agtggctcga taaaatgtgg gatagggtgg 3180

acatgaagac ttggcgtctg acctcgcagt tccaagctgg tcgcattctt gcgtccctta 3240

aattcctccc tgacatgatt caggacacac cacctcctgt tcttaggaag aatcgggcta 3300

gtgataatgc cgccctgaag cgactgggtg cgcagtgagg cagaaaattg agtgcaaccc 3360

ccccctcaaa accggttgga ccaacacttg accaaattgt ccttcgccc acgggtaccc 3420

agcaagaaga tgtcacttcc tccgatgggc catctcatgc gccggatcct cctagtcgaa 3480

tgagcacgag tgggagttgg aagggccttg tgctctctgg taccgtctc gcgggggtcca 3540

ttagtcagca tttcatgaca tgggtttttg aggttttctc ccatctccca gcttttgac 3600

tcacactttt ctgcgcagg ggctctatgg ctccaggtga ttggatgttt gcagggtttg 3660

ttttacttgc tctcctgctc tgctgttctt acccagtact cgggtgcctt cccttatagg 3720

gtgtcctttc tggtctctg cggcgcgttc gtctgggggt ttttggttct tggatggctt 3780

tcgtgtatt tttattctcg actccatcca acccagtcgg ttcttcttgt gaccacgatt 3840

cgccggagtg tcatgtgag cttttggctc ttgagcagcg ccaactttgg gaacctgtgc 3900

gcggccttgt ggtcggcccc tcgggcctct tatgtgtcat tcttggcaag ctactcggtg 3960

ggtcacgtta tctctggcat gttttcttac gtttatgcat gcttcagat ttggcccttt 4020

ctcttgttta tgttgttcc caggggcgtt gtcacaagtg ttggggaaag tgtataagaa 4080

cagctccggc ggaggtggct ctcaatgtgt tccctttctc gcgcgctacc cgtagctctc 4140

ttgtgtcctt gtgcgatcgg ttccaagcgc caaaaggggt tgatcctgtg tacttggcaa 4200

cgggttggcg cgggtgttgg tgttgtgaga gtccattca tcaaccgcac caaaaaccca 4260

tagcttatgc taatttggat gaaaagaaaa tatctgcca aacggtggtt gctgtccac 4320

acgatcccag tcaggccatc aagtgcctga aagttttgca ggcgggagga gccatcgtgg 4380
accagcccac acctgaggtc gtccgtgtat ccgaaatccc cttctcagcc ccatttttcc 4440
caaaagtacc agtcaaccca gattgtaagg ttgtggtgga ttcggacact tttgtggctg 4500
cggttcgtg cggtcactcg acagcacaac tggtcctagg ccagggaac tttgccaagt 4560

taaatcagat tcccctcagg agctccatct ccaccaaagc gattggcggg gcctcttaca 4620
cccttgctgt ggtcaagtt tctgtgtgga ctctgttca cttcatctc ggtctttggt 4680
tcacgtcacc ccaagtgtgt ggccgaggaa cctctgacct atggtgttca aatccttttt 4740
catacctac ctatggcccc ggggttgtgt gctcctctcg actttgtgtg tctgccgacg 4800
gggtcactct accattgttc tcagccgtgg ctcaactctc cggtagagag gtggggattt 4860
ttattttggt gctcgtctcc ttgatggctt tggcccaccg catggccctt aaggcagaca 4920
tgttgatggt ctttctggct ttttgtctt acgcctggcc catgagctcc tggttgattt 4980

gcttctttcc tacactcttg aagtgggtta cctccaccc tcttactatg ctttgggtgc 5040
actcattctt ggtgttttgt ctgccagcag ccggcatcct ctactaggg ataactggcc 5100
ttctttgggc ggttggccgc tttactcagg ttgccggaat tattacacct tatgacatcc 5160
accagtacac ctctgggcca cgtggcgcag cagccgtggc cacagcccca gaaggcactt 5220
atatggccgc cgtcaggaga gctgttttaa ctggcggaac tttaactctc acccgtctg 5280
cagttggatc cttctcgaa ggagctttca ggactcataa accttgtctt aacaccgtaa 5340
atgtttagg ctcttccctt ggttccggcg ggtttttcac tattacggc agaaaaattg 5400

ttgtcactgc tgcccatgtg ttgaacggcg acacagctag agtcaccggc gactcctaca 5460
accgcatgca tactttcaag accaatggtg attatgcctg gtcccatgct gatgactggc 5520
ggggcggtgc ccttgcggtc aaggttgcga aggggtaccg cggtcgtgcc tactggcaaa 5580
catcaactgg cgtcgaaccc ggtgttattg gggaagggtt cgcttctgt ttcaccacct 5640
gtggcgattc ggggtcaccg gtcactcag aatccggtga tctcattgga atccataccg 5700
gttcaataa acttggttct ggtcttgtga caaccctga aggggagaca tgtaccatca 5760
aagaaaccaa gctctctgac ctttcagac atttcgagg cccaagcgtt cctcttgggg 5820

atattaaatt gattccagcc atcatccctg atgtaacatc cattccgagt gacttggcat 5880
cgctcctatc ctccgtccct gtagtggaag gcggcctctc gaccgttcaa cttttgtgtg 5940
tcttttccct acttggcg atgatgggc atgcctggac tccattgtt gccgtgggtt 6000
tcttttact gaatgaaatt cttccagcag ttttggccg agccgtgttt tcttttgac 6060
tttttgtct tgcattggcc acccctggt ctgcacagg gttgatgatt agactcctca 6120
cggcatctct caaccgcaac aagctttctc tggcgttcta cgcactcggg ggggtcgtcg 6180

gtttggccgc tgaatcggg acttttctg gcaaattgcc tgaattgtct caaacccctt 6240

cgacatactg ctctttacct agggctcctg ctatgaccag ttgtgttccc accatcatca 6300

ttggtggact ccatgccctc ggtgtaattc tgtggttggt caaataccgg tgcctccaca 6360

acatgctcgt tggatgatgg agtttttcaa gcgccttctt cctacgggat ttgacagagg 6420

gtaatctcag aaaaggtgtt tcgcagtcct gtggcatgaa taacgagtc ctagcggctg 6480

ctttagcttg caagtgtca caggetgacc ttgatttttt gtccagctta acgaacttca 6540

agtgccttgt atctgcttcg aatatgaaaa atgctgccgg ccagtlacatt gaagcggcgt 6600

atgccaaggc cctgcgcca gagttggcat ctctagtcca gattgacaaa atgaaaggag 6660

ttttgtccaa actcagagcc ttgtctgaaa cagctactcc gtcccttgac ataggtagc 6720

tgattgttct gcttgggcaa catccacacg gatctatcct tgatattaat gtggggactg 6780

agagggaaaac tgtgtccgtg caagagaccc ggagcctagg cggttccaaa ttcagtgttt 6840

glactgtcgt gtctaacaca cccgtggacg ccttaaccgg catcccactc cagacaccaa 6900

cccctctttt tgagaatggt ccgcgtcatc gcagcgaaga agacgatctt aaagtcgaga 6960

ggatgaagaa aactgtgtg tccctcggtt tccacaacat caatggcaaa gtttactgca 7020

agatttggga caagtccacc ggtgacacct ttacacgga tgattcccg tataccacg 7080

accatgcttt tcaggacagg tcagccgact acagagacag ggactatgag ggtgtgcaaa 7140

ccgccccca acagggatit gatccaaagt ctgaaacccc tgtcggcact gttgtgatcg 7200

gcggtattac gtataacagg tatctgacta agggtaagga ggttctggtt cccaagcccc 7260

acaattgcct tgaagctgcc aagctgtctc ttgagcaagc tctcgtggg atgggcaaaa 7320

cttgcgacct tacagctgcc gaggtggaaa agttaaagcg catcatcagt caactccaag 7380

gtttgaccac tgaacaggt ttaactgct agccgctagc ggcttgacc gctgtggccg 7440

cggcggttta gttgttactg aaacggcgggt aaaaattgta agataccaca gcagaacttt 7500

caccttgggc ctttggacc taaaagtcgc ttctgaggtg gagtgaaga gatcaactga 7560

gcagggccac gctgttgtgg caaacctatg ttctggtgtt gtattgatga gacctaccc 7620

accgtccctt gttgacgttc ttctgaaacc cggacttgac acaacaccg gcattcaacc 7680

ggggcatggg gccgggaata tggcggtgga cggttccatt tgggattttg aaaccgcacc 7740

cacaaaggca gaactcgagt tgtccaagca aataatccaa gcatgtgaag tcaggcgcgg 7800

ggatgccccg aacctccaac tcccttaca gctctgtcca gttagggggg atcctgagcg 7860

gcataaaggc cgccttatca ataccaggtt tggagatttg cttacaaga ctctcaaga 7920

caccaagtcc gcaatccacg cggcttgttg cctgcacccc aacggggctc ccgtgtctga 7980
 tggtaaatcc acattaggca ccactcttca acacggtttc gagctttatg tccctactgt 8040
 gccctatagt gtcatggagt accttgattc acgccctgac acccccttta tgtgtaccaa 8100
 acatggctact cccgaggctg ctgcagagga ccttcgaaaa tatgacttat ccaccaagg 8160
 gtttgcctg cctggggctc tacgtctagt acgcagattc atctttggcc atattggtaa 8220
 ggacccgcca ctgttccctc catcaactta tcccgcgaag aactctatgg cagggatcaa 8280
 tggccagagg ttcccaacaa aagacgttca gagcatacct gaaattgatg aaatgtgtgc 8340

 ccgcgtgtc aaagagaatt ggcaaaactgt gacgccttgc accctcaaaa aacagtattg 8400
 ttccaagcct aaaaccagga ccatccttgg taccaacaac ttcatgtcct tggctcacag 8460
 gtccgactc agcgggtgtca ctgaggcgtt catgaaaaaa gcctggaagt ccccgatcgc 8520
 ctgggggaaa aacaaattta aggagtgtca ctgcactgtc gccggtaggt gcctcgaggc 8580
 cgacttggcc tcttgtgac gcagcacccc ggccatcgtg aggtggtttg ttgccaacct 8640
 cctgtacgaa ctgcccgggt gtgaagagta ctgccaagc tatgtgtca attgttgcca 8700
 tgacctggtg gcaacgcaaa atggcgctt caaaaacgt ggtggcctgt catctggaga 8760

 ccccgttacc agtgtgtcca acacagtgt ttcactggtg atttatgtc agcacatggt 8820
 gctgtcggct ttgaagatgg gtcatgaaat cggcctcaag ttctctgagg aacagcttaa 8880
 gttcgaggac ctctcgaaa tccagcctat gttggtatat tctgatgacc ttgtattgta 8940
 tgctgaaaga cccaccttc ccaattacca ttggtgggt gagcaccttg acctgatgct 9000
 gggttttaag acagaccaa aaaagactgt cataactgac aaaccagct ttcttggtg 9060
 tagaatcgaa gcggggcgac aactggttcc caatcgcgac cgattcttg ctgctcttgc 9120
 atatcacatg aaggcgaga acgcctcaga gtattatgcg tctgtgccg cgattctgat 9180

 ggactcgtgt gcttgcatg accacgatcc tgagtgtat gaggacctca tctgcggcat 9240
 tgctcgatgc gcccgccagg atggctacag ttcccaggc cggcgttct tcatgtccat 9300
 gtgggagaag ctgaaaagtc acaatgaagg caagaaattc cgccactgtg gcatttgtga 9360
 cgccaaggcc gatcatgct cgcctgttg gcttgattta tgtctgttcc actcgactt 9420
 tcatcaacac tgcctgtta ctctgagctg cggccatcat gccggttcaa aagaatgccc 9480
 acagtgtcag tcacctgtg gagctggtaa atccccctt gatgcagtgc tgaacaaat 9540
 cccgtacaaa cccctcgtc ctgtcatcat gaaggtggac aataaaacaa cgaccttga 9600

 cccgggaagg tatcagtcct gtcgaggtct tgtgtgtgc aagaggggta ttgcaggcaa 9660
 tgaggttgat ctgctgatg gagactatca ggtagtcccc cttttgcaa cctgcaaaga 9720
 cataaacatg gtgaagggtg ctgtcaatgt gctactcagc aagttcatag tggggccgcc 9780

aggttccggc aagacgacct ggctactgag tcaagttcag gatgatgatg tcatctatac	9840
acctacccat cagaccatgt tgcacatagt caatgccctc aaagtctgta ggtattccat	9900
cccagtggct tcagggctcc ctttcccacc gcccgccaga tctggaccgt gggttaggct	9960
cgttgctagc gggcacatcc ctggccgaat atcatacctt gacgaggccg gatattgcaa	10020
tcatctggat attctcagac tgttttctaa gacacctctt gtgtgtttgg gtgaccttca	10080
gcaacttcac cctgtcggct ttgactctta ctgttatgtt tttgatcaaa tgcctcataa	10140
gcagctgacc actatttata gatttggccc caatatctgt tctgccattc aaccttgta	10200
cagggaaaaa ctgcaatcta aggccaggaa cactagggtg gtttttactg cccggcccg	10260
ggcttttgggt cagggtgtga cgccatatca taaagaccgc accggctcag ctataacat	10320
agattcatcc caggagacca cctttgatgt tgtgacgtg catttgccgt cgccagattc	10380
cctgaacaaa tcccgggctc ttgtagctat tactcgggca aggcattgggt tgttcattca	10440
tgacctcat aaccaactcc ggaagttttt caacttaaca cctgagcgca ctgattgcaa	10500
cctcgtgttc aaccgcgggg acgagttggt agttttgaat gcagataatg cagtcacgac	10560
tgtggctaag gttttggagg cgggcccgtc tcggtttcga gtatcagatc caaggtgcaa	10620
gtctctttta gccgcttctt cggccagtct ggaaggaggc tgcattgccac tgccgcaagt	10680
ggcacataat ctggggtttt acttctctcc agatagtcca gcatttgcac ctctgccaaa	10740
agagctggca ccacattggc cgggtggttac tagtcagaac aaccaggcat ggcccggaccg	10800
acttgcgct agtatgcggc cagttgatgc ccgtacagc aagcctatgg tcggtgcagg	10860
gtatgtggtt gggccatcca ctttccttgg cactcctggt gtagtgtcat actatctcac	10920
gctgtacatc aggggtgagc cccaggcctt gccggagaca ctctctcaa cgggacgtat	10980
agctactgat tgtcgagagt atctcgacgc agctgaggaa gaagcagcta aagaactccc	11040
tcacgcattc attggcgatg tcaaaggtag tacagtgggg gggtgtcacc acattacgtc	11100
aaaatacctt cccaggctct tgcccaagga ctccgttgcc gtggtcggag tgagttcgcc	11160
cggcaaggct gccaaagccg tgtgtactct caccgatgtg tatcttccg agctccggcc	11220
atatttgcaa ccggaaacag catcgaaatg ctggaaactt aaactagact tcagggatgt	11280
cagactgatg gtctggaaag gagccaccgc atatttccaa ctggaggggc tcacatggtc	11340
agcgtgccc gactatgcca ggttcattca gctacaaaa gatgccgttg tgtacattga	11400
tccgtgcata ggaccggcaa cagccaaccg taaggttgtg agaactacag attggcgagc	11460
tgacctggca gtgacaccgt acgactacgg tgctcagagc attttgacta cagcctggtt	11520
cgaggacctt gggccgcagt ggaagatttt agggttgcaa ccttcaagc gggcatttgg	11580
ctttgaaaac actgaggatt gggcgatcct tgcacgtcgc atgaacgacg gcaaggacta	11640

cactgactat aactggaatt gtgttcgaca acgcccacat gccatctacg gacgtgcccc	11700
tgaccatacg tatcactttg cccctggcac tgaactgcaa gtagagctag gtaaaccctg	11760
gctaccgcct gagcaagtac cgtgaatcta gagtgatgca atggggtcac tgtggagtaa	11820
aatcagtcaa ctgttcgtgg atgccttcac tgagttcttc gttagtgtgg ttgatattgt	11880
catcttctct gccatactgt ttgggttcac cgttgcaggg tggttactgg tctttttttt	11940
cagagtgggt tgctccgcgc ttctccgttc gcgctctgcc attcactctt ccgaactatc	12000
gaaggctcta tgagggttg ctacctaatt gcagaccgga tgttcacaa ttcgcagtca	12060
agcaccattt gggatatactt tggcacatgc gagtttccca cttaatgac gaaatggctt	12120
ctcgccgcat ttaccagacc atggaacatt cagggtcaagc ggcctggaag cagggtgtta	12180
gtgaagctac tctcacaaga ctgtcaaagc tcgacatagt tctccacttc caacacctgg	12240
ccgcaataga ggcggtattt tgccgttcc tcagctcacg acttgtgatg ctgaaaaatc	12300
ttgccgttgg caatatgagc ctacagtaca acaccagtt ggaccgcgtt gagctcatct	12360
tcccaacacc aggtacgagg cccaaattga ccgattttag acaatggctc gtcagtgtgc	12420
acgttctat ttttctctt gtggctcat cagttacctt gttcatagtg ctttggttc	12480
gaattccagc tctacgtat gtttttgggt tccattggcc caggcaaca catcattcga	12540
gctaaccatc aattaccta tatgtaagcc ctgtctcacc agtcaagcgg ctgcacaaag	12600
gctcgaacc ggctcgaaca tgtgttgcaa aataggacac accacgtgtg aggagcgtga	12660
ccatgatgag ttgtcaatga ccattccgtc cgggtacgat aacctcaaac ttgagggtta	12720
ttacgttgg ctggcttttt tgctcttttc ttacgcagcc caatttcac cagagtgtt	12780
cggaaatagg aatgtgtcac gcgtcttcgt ggataaacgg caccagttca tctgtgccga	12840
gcacgacgga caaaattcaa ccgtatccac cgaacataat atttccgcat tgtatcggc	12900
gtactaccac caccaggtag acgggggcaa ttggttcac ctggaatggc tgcggccttt	12960
cttttctcc tggctaglac tcaatatttc atggtttctg aggcgttcgc ctgcaagccc	13020
tgtttctcga cgcatttate agatattgag accaacacga ccgcggctgc cggtttcatg	13080
gtccttcagg acatcaactg tttccacagt ggctcagagg cacaacgac tgggtccatc	13140
agaaagtcgt cccaatgccg tgaagccgtc ggcaactccc agtacatcaa gataacggcc	13200
aatgtgaccg acgaatcata cttgtacaac gcggacttgc tgatgtttc tgcgtgcctt	13260
ttctacgct cagagatgag cgagaaaggc tttaaagtca tttttgggaa tgtctctggc	13320
gttgtctccg cttgtgtcaa ttttacagat tatgtggccc atgtgacca acataccag	13380

cagcatcatt tggtaatcaa tcacattcgg ttgctacatt tcctgacacc atcagcaatg 13440
 aggtgggcta caaccattgc ttgtttgttc gccattctct tggcgatatg agatgttctc 13500
 acaaatcggg gtgtttcttg actccgcact cttgcttctg gtggcttttt ttgctgtgta 13560
 ccggcttgtc ctggtccttt gccgatggca acggcaacag ctcgacatac caatatatat 13620
 ataacttgac gatatgcgag ctgaatggga ccgaatggct gtccgaccat ttaattggg 13680
 cagtcgagac ttttgtgtc taccagtggt cgactcatat cctctcactg ggtttcctca 13740
 cgacaagtca tticcttgat gcgttcggtc ttggagctgt gtcagttaca gggttttgtg 13800

 gcgggcggtta cgtgctcagc agcgtgtacg gcgcttgtgc actagcagcg ctctgatgtt 13860
 ttgttatccg tgctgccaaa aattgtatgg cttgccgcta tgctcgtacc cggtttacca 13920
 acttcattgt ggatgaccgg gggagaatcc atcgggtggag gtctccaata gtggtggaaa 13980
 aattaggtaa agctgacgtc ggccggcgacc ttgtcaccat caaacatgtc atcctcgaag 14040
 gagtcaaagc tcaacccttg acgaggactt cggccgagca atgggaggcc tagataattt 14100
 ctgcaacgat cccaccgccg cacaaaagct tgtgctagcc tttagcatca catatacacc 14160
 catcatgata tacgccctta aggtgtcacg cggccgactc ttggggttgt tgcacatctt 14220

 gatatttctg aactgttctt tcacgttcgg atacatgaca tataatgcatt ttgaatccac 14280
 caaccgtgtc gcgtttacca tggggggcgt tgtcgccctt ctgtggggcg tttatagttt 14340
 catagagtca tggaagtta tcacttcag atgcagattg tgttccttag gccggcgata 14400
 cattctggcc ctgcccacc acgtagaaag tgctgcaggc ctccatccga tcccagcgtc 14460
 tggtaaccaa gcatacgtg tgagaaagcc cggactaaca tcagtgaacg gcactctggt 14520
 accaggactt cgaggcctcg tgctgggcgg caaacgagct gttaaagagc gagtggttaa 14580
 cctcgtcaag tatggccggt aaaaaccaga gccagaagaa aaagaaaaat ccagctccaa 14640

 tggggaatgg ccagtcagtc aatcaactgt gccagctgct gggcacaatg ataaagtccc 14700
 agcgccagcg acccagggga ggacaggcta aaaagaaaaa gcctgagaag ccacatttcc 14760
 ccctggctgc tgaagatgac gtccggcacc atctcacca gaccgagcgc tccctttgct 14820
 tgcaatcgat ccagacggct tttaatcaag gcgcaggaac tgcgtcgtt tcateccagc 14880
 ggaagatcgg ttttcaggtt gagtttatgc taccggttgc tcatacagt gcctgattc 14940
 gcgtgacttc tacatccgcc ggtcaggatg caaattaatt tgatagtcag gtgaatggcc 15000
 gcgattggcg tgtggcctct gagtcacctt ttcaattagg gcgatcacat gggggtcaga 15060

 cttaattagg caggaacat gtgaccgaaa tt 15092

<210> 2

<211> 15092

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRRS virus isolate 96V198 - passage 1

<400> 2

atgatgtgta gggatttccc cctacataca cgacacttct agtgtttgtg tgccttggag	60
gcgtgggtac agccccgccc cacctcttgg cccctgttct agcccaacag gtatccttct	120
ctctcggggc gagcgcgccc cctgctgtct ccttgcagca ggaaggacct cccgagtatt	180
tccggagagc acctgcttta cgggatctcc accctttaac catgtctggg acgtttctcc	240
ggatgcatgtg cccccggct gcccggtat tttggaacgc cggccaagtc ttttgcacac	300
ggtgtctcag tgcgcggtct cttctctctc cagagcttca ggacactgac ctgcctgcaa	360
tcggcttggt ttacaagcct aaagacaagc ttacttgga agtccctatc ggcatccctc	420
aggtggagtg tactccgtcc ggggtctgtt ggctctcagc catcttcgtc ttggcgcgca	480
tgacctccgg caatcacaac ttcccccaac gacttgtgaa ggttgcctgat gttttgtacc	540
gtgacggctg cttggcacct cgacaccttc gcgaactcca agtttacgag cgcggctgca	600
actggtaacc gatcacgggg cccgtgcccg ggatgggttt atacgcgaac tctatgcatg	660
tgtecgacca accgtttcct ggtgccacc atgtgttgac gaactcacct ctgcctcagc	720
aggcttgtcg acagccgttt tgteccattg aggaggttca ttccgacgta tacaggtgga	780
agaaattcgt gatTTTTgtg gattctcttt ctgacggccg atctcgcatg atgtggacac	840
caggatccga cgactcggtt gccttagaag tatgtccacc tgaactagaa tgtcgagtcg	900
aaatcctcgt tcggagtttt cctgcccacc accctgtcga catcaccaac tgggagctca	960
ctgagtcacc tgagcacggt ttttcttca gcacgtctca ttcttgggt taccttgccc	1020
aaaaccctga cgtgtttgat ggtaagtgtt ggctttcttg ctttttgggc ctgccgaccg	1080
aagtgtggcg tcatgaggag tatctagcta acgccttcgg ttaccaaacc aagtggggcg	1140
tgcattgtaa gtacctccag cgcaggcttc aggtccgcgg catgcgtgct gtagttgatc	1200
ctgatggtec catccaggtt gaagcgctgt cttgccccca gtcttggatc aggcaacctga	1260
ctctaaatga tgacgtcacc ccaggatttg ttgcctaac atcccttcgc attgagccga	1320
acacagagcc tactactttc cggatcttcc ggtttggagc gcataagtgg tatggcgctg	1380
ccggcaaacc ggctcgtgct aagcgtgccg ctaaagggtga gaagaattca gctcccacc	1440
ccaaggtcgc cctgccggtc cccacctgtg gaattaccac ctactctcca ccgacagacg	1500
ggtcttgtgg ttggcatgtc cttgccgcca taatgaaccg gatgataaat ggtgacttca	1560
cgtccctctt gactccgtac aacagaccag aggatgattg ggcttctgat tatgatcttg	1620

ctcaggcaat ccaatgtcta caactgcctg ctaccgtggg cggagtcgc gcctgtccta	1680
acgccaagta cctcataaaa ctcaacggag tccactggga ggtagagggt aggtcaggaa	1740
tggctcctcg ctctctttct cgtgaatgtg tggttggcgt ttgctctgaa ggttgtgttg	1800
caccgcctta tccagcagac gggctaccag aacgagcact cgaggccttg gcgtctgctt	1860
acaggttacc ctctgattgt gttagctctg gcattgctga ctttcttgct aaccacctc	1920
ctcaggaatt ctggaccctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccagag cggtecggt	1980
tctctagttt gtataaatta ctattagagg ttgttccgca aaaatgcggt gccacggaag	2040
gggctttcgt ctatgctgtt gagagaatgt tgaaggattg tccgagctcc aaacaggcca	2100
tggcccttct ggcaaaaatt aaagtccat cctcaaaggc cccgtctgtg tcccttgacg	2160
agtgtttccc tacggatgtt tcagccgact tcgagccagc atctcaggaa agggcccaaa	2220
gttccggtgc tgctgttgct ctgtgttcac cggaagtaaa agagttcgaa gaagcagccc	2280
cagaagaagt tcaagagagt ggccacaagg tcgcccgcctc tgcatittgt gccgagggtc	2340
ctaacaatga acaggtaccg atggctgccg gcgagcaact gaagcccgtt ggtcgcgttt	2400
tggcggtcgg gaatgctcat gaaggtgttc tggcctcaac tagttcgact aacctgatag	2460
gcgggaactt cccccctca gactccatga aagagagcat gctcaatagc tgggaagacg	2520
aaccactgga tttgtccaa ccggcaccag ctgttacaat gacccttggt agagagcaaa	2580
caccgcacaa cctgggtcct gatgccgttg cttccccgt caccgttcga aaatttgctc	2640
cgacagggcc tacactcgt catgttgagc actgccgcac ggagtcaggc gacagcagtt	2700
cgcccttgga tctgtcttat gcgcaaaccc tggaccagcc tttaaatcta tccttgccg	2760
cttggccagt gagggccacc gcgtctgacc ctggctgggt ccacggtagg cgtgagccta	2820
tctttgtaaa gcctcgagat gctttctctg acggcgattc agcccttcag ctcggggagc	2880
tgtctgaatc cggtccgtc atcgagtttg accggacaag aaatgctccg gcggtcgacg	2940
cccctgttga cttagcggct tcgaacgagg cctctctgt ggttgatcct ttcgaatttg	3000
ccgaactcaa gcgcccgcgt tttccgcac aagccttaat tgaccgagc ggtccacttg	3060
ccgacgtcca tgcaaaaata aagaaccggg tatatgaaca gtgcctccag gcttgtagc	3120
ctggcagtcg cgcaaccaca gccaccaagg agtggctcga taaaatgtgg gatagggtgg	3180
acatgaagac ttggcgtgt acctcgcagt tccaagctgg tcgcattctt gcgtccctta	3240
aattcctccc tgacatgatt caggacacac cacctcctgt tcctaggaag aatcgggcta	3300
gtgataatgc cggcctgaag cgactggtgg cgagtgggga cagaaaattg agtgcaaccc	3360
ccccttcaaa accggttgga ccaacacttg accaaattgt ccttcgccc acgggtaccc	3420
agcaagaaga tgtcacttcc tccgatgggc catctcatgc gccggtacct cctagtcgaa	3480

tgagcacgag tgggagttgg aagggccttg tgctctctgg taccgtctc gcgggggtcca	3540
ttagtcagca ttcatgaca tgggtttttg aggttttctc ccatctcca gcttttgac	3600
tcacactttt ctgcgcagg ggctctatgg ctccaggtga ttggatgttt gcaggtgttg	3660
ttttacttgc tcctctgctc tgctgttctt acccagtact cgggtgcctt cccttatagg	3720
gtgtcctttc tggtctgtg cggcgcgttc gtctgggggt ttttggttct tggatggctt	3780
tcgtgtatt tttattctg actccateca acccagtcgg ttcttcttgt gaccacgatt	3840
cgcggagtg tcatgtgag cttttggctc ttgagcagcg ccaactttgg gaacctgtgc	3900
gcggccttgt ggtcggcccc tcgggcctct tatgtgtcat tcttggaag ctactcgtg	3960
ggtcacgtta tcctggcat gttttcttac gtttatgcat gcttgcat ttggcccttt	4020
ctcttgttta tgtggtgtcc caggggcgtt gtcacaagtg ttggggaaag tgtataagaa	4080
cagctccggc ggaggtggct ctcaatgtgt tccctttctc gcgcgtacc cgtagctctc	4140
ttgtgtcctt gtgcgatcgg ttccaagcgc caaaaggggt tgatcctgtg tacttggcaa	4200
cgggttggcg cgggtgttgg tgtggtgaga gtccattca tcaaccgcac caaaaacca	4260
tagcttatgc taatttggat gaaaagaaaa tatctgcca aacggtggtt gctgtccac	4320
acgatcccag tcaggccatc aagtgcctga aagttttgca ggccggaggga gccatcgtgg	4380
accagccac acctgaggtc gtccgtgtat ccgaaatccc cttctcagcc ccatttttc	4440
caaaagtcc agtcaacca gattgtaagg ttgtgtgga ttcggacct tttgtggctg	4500
cggttcgtg cggtactcg acagcacaac tggctctagg ccagggaac ttgccaagt	4560
taaatcagat tcccctcagg agctccatct ccaccaaagc gattggcggg gcctcttaca	4620
cccttctgt ggctcaagtt tctgtgtgga ctctgttca cttcactctc ggtctttgtt	4680
tcacgtcacc ccaagtgtgt ggccgaggaa cctctgacct atggtgttca aatcctttt	4740
cataccctac ctatggcccc ggggttgtgt gctcctctcg actttgtgtg tctgccgacg	4800
gggtcactct accattgttc tcagccgtgg ctcaactctc cggtagagag gtggggattt	4860
ttatttttgt gctcgtctcc ttgatggctt tgcccaccg catggccctt aaggcagaca	4920
tgttgatgtt ctttctggct ttttgtgctt acgcctggcc catgagctcc tggttgattt	4980
gcttctttcc tacactcttg aagtgggtta cctccaccc tcttactatg ctttgggtgc	5040
actattctt ggtgttttgt ctgccagcag ccggcatcct ctcaataggg ataactggcc	5100
ttctttgggc ggttggccgc ttactcagg ttccggaat tattacacct tatgacatcc	5160
accagtacac ctctgggcca cgtggcgtg cagctgtggc cacagcccca gaaggcactt	5220

atatggccgc cgtccggaga gctgctttaa ctgggcgaac tttaatcttc accccgtctg 5280

 cagttggatc ccttctcgaa ggagctttca ggactcataa accttgtctt aacaccgtaa 5340
 atgttgtagg ctcttccctt gggtccggcg gggttttcac tattgacggc agaaaaattg 5400
 ttgtcactgc tgcccatgtg ttgaacggcg acacagctag agtcaccggc gactcctaca 5460
 accgcatgca tactttcaag accaatggtg attatgcctg gtcccatgct gatgactggc 5520
 ggggcgttgc ccttgcggtc aaggttgcca aggggtaccg cggtcgtgcc tactggcaaa 5580
 catcaactgg cgtcgaaccc ggtgttattg gggaagggtt cgccttctgt ttcaccacct 5640
 gtggcgattc ggggtcaccc gtcactcag aatccggtga tctcattgga atccataccg 5700

 gticaaataa acctggttct ggtcttgtga caaccctga aggagagaca tgtgcatca 5760
 aagaaaccaa gctctctgac cttccagac atttcgcagg cccaagcgtt cctcttgggg 5820
 atattaaatt gactccagcc atcatccctg atgtaacatc cattccgagt gacttggcat 5880
 cgctcctatc ctccgtccct gtagtgggaag gcggcctctc gaccgttcaa cttttgtgtg 5940
 tcttttctc actttggcgc atgatgggcc atgctggac tccattgtt gccgtgggtt 6000
 tctttttact gaatgaaatt cttccagcag ttttggtcg agccgtgttt tcttttgac 6060
 tttttgtgt tgcatgggcc acccctggt ctgcacaggt gttgatgatt agactcctca 6120

 cggcatctct caaccgcaac aagctttctc tggcgttcta cgcactcggg ggggtcgtcg 6180
 gtttgccgc tgaatcggg acttttctg gcaattgcc tgaattgtct caaaccttt 6240
 cgacatactg cttcttacct agggctcttg ctatgaccag ttgtgttccc accatcatca 6300
 ttggtggact ccatgccctc ggtgtaattc tgtggttgtt caaataccgg tgcctccaca 6360
 acatgctcgt tggatgagg agtttttcaa gcgccttctt cctacggtat ttgcagagg 6420
 glaactcag aaaaggtgtt tcgcagtcct gtggcatgaa taacgagtc ctgacggctg 6480
 ctttagcttg caagttgtca cagctgacc ttgatttttt gtcagctta acgaacttca 6540

 agtgctttgt atctgcttcg aatatgaaaa atgctgccgg ccaglacatt gaagcggcgt 6600
 atgccaaggc cctgcgcaa gagttggcat ctctagtcca gattgacaaa atgaaaggag 6660
 ttttgccaa actcgaggcc ttgtctgaaa cagctactcc gtcccttgac ataggtagc 6720
 tgattgttct gcttgggcaa catccacacg gatctatcct tgatattaat gtggggactg 6780
 agagggaaaac tgtgtccgtg caagagaccc ggagcctagg cggttccaaa ttcagtgttt 6840
 gfactgtcgt gttaacaca cccgtggacg ccttaaccgg catcccactc cagacaccaa 6900
 cccctctttt tgagaatggt ccgcgtcatc gcagcgaaga agacgatctt aaagtcgaga 6960

ggatgaagaa acactgtgtg tccctcggct tccacaacat caatggcaaa gtttactgca 7020
 agatttggga caagtcacc ggtgacacct ttacacgga tgattcccgg tataccacg 7080
 accatgcttt tcaggacagg tcagccgact acagagacag ggactatgag ggtgtgcaaa 7140
 ccgccccca acagggattt gatccaaagt ctgaaacccc tgtcggcact gttgtgatcg 7200
 gcggtattac gtataacagg tatctgacta agggtaagga ggttctggtt cccaagcccc 7260
 acaattgcct tgaagctgcc aagctgtctc ttgagcaagc tctcgtggg atgggcaaaa 7320
 cttgcgacct tacagctgcc gaggtggaaa agttaagcg catcatcagt caactccaag 7380

 gtttgaccac tgaacaggct ttaaactgct agccgctagc ggcttgacc gctgtggccg 7440
 cgggcgctta gttgttactg aaacggcggg aaaaattgta agataccaca gcagaacttt 7500
 caccttgggc ctttggacc taaaagtcgc ttctgagggt gaggtgaaga gatcaactga 7560
 gcagggccac gctgttggg caaacctatg ttctggtgtt gtattgatga gacctcacc 7620
 accgtccctt gttgacgttc ttctgaaacc cggacttgac acaacaccg gcattcaacc 7680
 ggggcatggg gccgggaata tgggcgtgga cggttccatt tgggattttg aaaccgcacc 7740
 cacaaggca gaactcgagt tgtccaagca aataatccaa gcatgtgaag tcaggcgccg 7800

 ggatgccccg aacctccaac tcccttaca gctctgtcca gttagggggg atcctgagcg 7860
 gcataaaggc cgccttatca ataccagggt tggagatttg ccttacaaga ctctcaaga 7920
 caccaagtc gcaatccacg cggttgttg cctgcacccc aacggggctc ccgtgtctga 7980
 tggtaaatcc acattagga ccactcttca acacggtttc gagctttatg tcctactgt 8040
 gccctatagt gtcatggagt accttgattc acgccctgac acccccttta tgtgtacaa 8100
 acatggtact ccgaggctg ctgcagagga cttcgaaaa tatgacttat ccaccaagg 8160
 gtttgcctg cctggggctc tacgtctagt acgcagattc atctttggcc atattggtaa 8220

 ggcaccgcca ctgttctcc catcaactta tcccgccaag aactctatgg cagggatcaa 8280
 tggccagagg ttccaacaa aagacgttca gagcatacct gaaattgatg aaatgtgtgc 8340
 ccgcgtgtc aaagagaatt ggcaaaactgt gacgccttg accctcaaaa aacagtattg 8400
 ttccaagcct aaaaccagga ccatccttgg taccaacaac ttcattgcct tggctcacag 8460
 gtcggcactc agcgggtgca ctcaggcgtt catgaaaaa gcctggaagt ccccgatcgc 8520
 cttggggaaa acaaaattta aggagtgtca ctgcactgtc gccggtaggt gcctcaggc 8580
 cgacttggcc tcttgtgac gcagacccc ggccatcgtg aggtggtttg ttgccaacct 8640

 cctgtacgaa cttgcgggtt gtgaagagta cttgccaagc tatgtgtca attgttgcca 8700
 tgacctggtg gcaacgcaaa atggcgctt caaaaacgt ggtggcctgt catctggaga 8760
 ccccgctacc agtgtgtcca acacagtgt ttcactggtg atttatgtc agcacatggt 8820

gctgtcggct ttgaagatgg gtcattgaaat cggcctcaag ttctctgagg aacagcttaa	8880
gttcgaggac ctctctgaaa tccagcctat gttggtatat tctgatgacc ttgtattgta	8940
tgctgaaaga cccaccttcc ccaattacca ttggtgggtt gagcaccttg acctgatgct	9000
gggttttaag acagacccaa aaaagactgt cataactgac aaaccagct ttcttggtctg	9060
tagaatcgaa gcggggcgac aactggttcc caatcgcgac cgcattcttg ctgctcttgc	9120
atatcacatg aaggcgaga acgcctcaga gtattatgcg tctgctgccg cgattctgat	9180
ggactcgtgt gcttgcatg accacgatcc tgagtggat gagcacctca tctgcggcat	9240
tgctcgatgc gcccgcagg atggctacag ttcccaggc ccgcccgttct tcatgtccat	9300
gtgggagaag ctgaaaagtc acaatgaagg caagaaattc cgccactgtg gcatttgtga	9360
cgccaaggcc gatcatgctt ccgcctgtgg gcttgattta tgtctgttcc actcgactt	9420
tcatcaacac tgcctgtta ctctgagctg cggccatcat gccggttcaa aagaatgcc	9480
acagtgtcag tcacctgtg gagctggtaa atccccctt gatgcagtgc tgaaacaaat	9540
cccgtacaaa cccctctgc ctgtcatcat gaaggtggac aataaaaca cgaccttga	9600
ccgggaagg tatcagtc ctcgaggtct tgttctgtc aagaggggta ttgcaggcaa	9660
tgaggttgat ctgctgatg gagactatca ggtagtccc cttttgcaa cctgcaaaga	9720
cataaacatg gtgaagggtg ctgtcaatgt gctactcagc aagtcatag tggggccgcc	9780
aggttccggc aagacgacct ggctactgag tcaagttcag gatgatgat tcatctatac	9840
acctacccat cagaccatgt tcgacatagt caatgccctc aaagtctgta ggtattccat	9900
cccagtggct tcagggtcc ctttccacc gcccgcaga tctggaccgt gggtaggct	9960
cgttgctagc gggcacatcc ctggccgaat atcatacctt gacgaggccg gatattgcaa	10020
tcatctggat attctcagac tgctttctaa gacacctctt gtgtgttgg gtgacctca	10080
gcaacttcac cctgtcggt ttgactctta ctgttatgtt tttgatcaaa tgcctcataa	10140
gcagctgacc actatttata gatttggccc caatatctgt tctgccattc aaccttgta	10200
cagggaataa ctggaatcta aggccaggaa cactagggtg gtttttactg cccggccgt	10260
ggcttttggc cagggtgtga cgccatatca taaagaccgc accggctcag ctataacct	10320
agattcatcc caggagacca ctttgatgt tctgacgtg catttgccgt cgccagattc	10380
cctgaacaaa tccgggtctc ttgtagctat tactcgggca aggcattgggt tttcatcta	10440
tgacctcat aaccaactcc ggaagttttt caacttaaca cctgagcgca ctgattgcaa	10500
cctcgtgttc aaccgcgggg acgagttgtt agttttgaat gcagataatg cagtcacgac	10560
tgtggctaag gttttggagg ggggcccgtc tcggtttcga gtatcagatc caaggtgcaa	10620
gtctctttta gccgcttctt cggccagtct ggaaggaggc tgcatgccac tgccgcaagt	10680

ggcacataat ctggggtttt acttctctcc agatagtcga gcatttgac ccttgccaaa 10740

agagctggca ccacattggc cgggtggttac tagtcagaac aaccaggcat ggcccggaccg 10800

acttgctgct agtatgcggc cagttgatgc ccgctacagc aagcctatgg tcggtgcagg 10860

glatgtggtt gggccatcca ctttccttgg cactcctggt gtagtgtcat actatctcac 10920

gctgtacatc aggggtgagc cccaggcctt gccggagaca ctcgtctcaa cgggacgtat 10980

agctactgat tgtcgagagt atctcgacgc agctgaggaa gaagcagcta aagaactccc 11040

tcacgcattc attggcgatg tcaaaggtag tacagtgggg gggtgtcacc acattacgtc 11100

aaaatacctt ccaggtcct tgcccaagga ctccgttgcc gtggtcggag tgagttcgcc 11160

cggcaaggct gccaaagccg tgtgtactct caccgatgtg tatcttccc agctccggcc 11220

atatttgcaa ccggaacag catcgaaatg ctggaaactt aaactagact tcagggatgt 11280

cagactgatg gtctggaag gagccaccgc atatttccaa ctggaggggc tcacatggtc 11340

agcgtgccc gactatgcca ggttcattca gctacaaaa gatgccgttg tgtacattga 11400

tccgtgcata ggaccggcaa cagccaaccg taaggttgtg agaactacag attggcgagc 11460

tgacctggca gtgacaccgt acgactacgg tctcagagc attttgacta cagcctggtt 11520

cgaggacctt gggccgcagt ggaagatttt agggttgcaa ccctcaagc gggcatttgg 11580

ctttgaaaac actgaggatt gggcgatcct tgcacgtgc atgaacgacg gcaaggacta 11640

cactgactat aactggaatt gtgttcgaca acgcccacat gccatctacg gacgtgcccg 11700

tgaccatacg tatcatttg cccctggcac tgaactgcaa gtagagctag gtaaaccg 11760

gtacccgct gagcaagtac cgtgaatcta gattgatgca atggggtcac tgtggagtaa 11820

aatcagtcaa ctgttcgtgg atgccttcac tgagttctc gttagtgtgg ttgatattgt 11880

catcttctt gccatactgt ttgggttcac cgttcagggt tggttactgg tcttttttt 11940

cagagtgggt tctccgcgc ttctccgttc gcgctctgcc attcactctt ccgaactatc 12000

gaaggctcta tgagggttg ctacctaatt gcagaccgga tgtccacaa ttcgcagtca 12060

agcaccatt gggtatactt tggcacatgc gattttccca cttaattgac gaaatggtct 12120

ctcgccgat ttaccagacc atggaacatt caggtaagc ggcctggaag cagggtggtta 12180

gtgaagctac tctcacaaga ctgtcaaagc tcgacatagt tctccacttc caacacctgg 12240

ccgcaataga ggcggattct tgccgttcc tcagctcacg acttgtgatg ctgaaaaatc 12300

ttgccgttgg caatatgagc ctacagtaca acaccagtt ggaccgcgtt gagctcatct 12360

tcccaacacc aggtacagg cccaaattga ccgattttag acaatggctc gtcagtgtgc 12420

acgtttctat tttttcctct gtggcctcat cagttacctt gttcatagtg ctttggcttc	12480
gaattccagc tctacgctat gtttttgggt tccattggcc cacggcaaca catcattcga	12540
gctaaccatc aattacacta tatgtaagcc ctgtctcacc agtcaagcgg ctcgacaaag	12600
gtcgaaccc ggicgcaaca tgttggtgcaa aataggacac accacgtgtg aggagcgtga	12660
ccatgatgag ttgtcaatga ccattccgtc cgggtacgat aacctcaaac ttgagggtta	12720
ttacgcttgg ctggcttttt tgctcttttc ttacgcagcc caatttcac cagagtgttt	12780
cggaataggg aatgtgtcac gcgtcttcgt ggataaacgg caccagttca tctgtgccga	12840
gcacgacgga caaaattcaa ccgtatccac cgaacataat atttccgcat tgtatgcggc	12900
gtactaccac caccaggtag acgggggcaa ttgggtccac ctggaatggc tgcggccttt	12960
cttttctcc tggctagtag tcaatatttc atggtttctg aggcgttcgc ctgcaagccc	13020
tgtttctcga cgcatttate agatattgag accaacacga ccgcggctgc cggtttcatg	13080
gtccttcagg acatcaactg tttccacagt ggctcagagg cacaacacgac tgggccatc	13140
agaaagtcgt cccaatgccg tgaagccgtc ggcaactccc agtacatcaa gataacggcc	13200
aatgtgaccg acgaatcata ctgtgtacaac gcggacttgc tgatgctttc tgcgtgcctt	13260
ttctacgcct cagagatgag cgagaaaggc tttaaagtca tttttgggaa tgtctctggc	13320
gttgtctccg cttgtgtcaa ttttacagat tatgtggccc atgtgacca acataccag	13380
cagcatcatt tggtaatcaa tcacattcgg ttgctacatt tctgacacc atcagcaatg	13440
aggtgggcta caaccattgc ttgtttgttc gccattctct tggcgatatg agatgttctc	13500
acaaatcggg gtgtttcttg actccgcaact ctgtctctg gtggcttttt ttgtgtgta	13560
ccggcttgtc ctggctcttt gccgatggca acggcaacag ctcgacatac caatatatat	13620
ataacttgac gatatgcgag ctgaatggga ccgaatggct gtccgacat ttaattggg	13680
cagtcgagac ttttgtctc taccagtggt cgactcatat cctctcactg ggtttcctca	13740
cgacaagtca tttccttgat gcgttcggtc ttggagctgt gtcagttaca gggttttgtg	13800
gcgggcggta cgtgctcagc agcgtgtacg gcgcttgtgc actagcagcg ctctgtatgtt	13860
ttgttatccg tctgccaata aattgtatgg ctgtccgcta tctctgtacc cggtttacca	13920
acttcattgt ggatgaccgg gggagaatcc atcgggtggag gtctccaata gtggtggaaa	13980
aattaggtaa agctgacgtc ggccggcgacc ttgtcaccat caaacatgtc atcctcgaag	14040
gagtcaaagc tcaacccttg acgaggactt cggccgagca atgggaggcc tagataattt	14100
ctgcaacgat cccaccgccg caaaaagct tgtctagcc tttagcatca catatacacc	14160
catcatgata tacgccctta aggtgtcacg cggccgactc ttggggttgt tgcacatctt	14220
gataattctg aactgttctt tcacgttcgg atacatgaca tataatgcatt ttgaatccac	14280

caaccgtgtc gcgccttacca tggggggcgt tgcgcctt ctgtggggcg tttatagttt 14340
catagagtca tggaagtta tcaattccag atgcagattg tgttccttag gccggcgata 14400
cattctggcc cctgcccacc acgtagaaag tgcctgcaggc ctccatccga tcccagcgtc 14460
tggttaaccaa gcatacgtg tgagaaagcc cggactaaca tcagtgaacg gcactctggt 14520

accaggactt cgaggcctcg tgctggggcg caaacgagct gttaaagcag gagtggttaa 14580
cctcgtcaag tatggccggt aaaaaccaga gccagaagaa aaagaaaaat ccagctccaa 14640
tggggaatgg ccagtcagtc aatcaactgt gccagctgct gggcacaatg ataaagtccc 14700
agcggcagcg acccagggga ggacaggcta aaaagaaaaa gcctgagaag ccacatttcc 14760
ccctggctgc tgaagatgac gtccggcacc atctcaccca gaccgagcgc tccctttgct 14820
tgcaatcgat ccagacggct tttaatcaag gcgcaggaac tgcgtcgctt tcatccagcg 14880
ggaagatcgg ttttcaggtt gaggtttatgc taccggttgc tcatacagtg cgcctgattc 14940

gcgtgacttc tacatccgcc ggtcaggatg caaattaatt tgatagtcag gtgaatggcc 15000
gcgattggcg tgtggcctct gaggcaccta ttcaattagg gcgacacat gggggtcaga 15060
cttaattagg caggaacat gtgaccgaaa tt 15092

<210> 3
<211> 15092
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PRRS virus isolate 96V198 - passage 9
<400> 3

atgatgtgta gggatttccc cctacataca cgacacttct agtgtttgtg tgccttggag 60
gcgtgggtat agccccgcc cactcttgg ccctgttct agccaacag gtatccttct 120

ctctcggggc gagcgcgccg cctgtgtct ccttcagca ggaaggacct cccgagtatt 180
tccggagagc acctgcttta cgggatctcc accctttaac catgtctggg acgttctccc 240
ggtgcatgtg caccceggct gcccgggtat tttggagcgc cggccaagtc tattgcacac 300
ggtgtctcag tgcacggctt cttctctct cggagcttca ggacactgac ctgcgtgcaa 360
ttggcttgtt ttacaagcct aaagacaagc ttactggaa agtcctatc ggcatccctc 420
aggtggagtg tactccgtcc ggggtctgtt ggtctcagc catcttcccc ttggcgcgca 480
tgacctccgg caatcacaac tttctccaac gacttgtgaa ggttgctgat gttttgtacc 540

gtgacggctg cttggcacct cgacaccttc gcgaactcca agtttacgag cgcggtgca 600
actggtacct gatcacgggg cccgtgcccg ggatgggttt gtacgcgaac tccatgcacg 660

tgccgacca accgtttcct ggtgccgctc atgtgttaac gaactcacct ctgcctcagc	720
aggctttgtcg acagccgitt tgccatttg aggaggttca ttccgacgta tacaggtgga	780
agaaattcgt gatttttgtg gattcctctt ctgacggccg atctcgcatg atgtggacac	840
caggatccga cgactcggct gccttagaag tattgccacc tgaactagaa tgtcgagtcg	900
aaatcctcgt tcggagtttt cctgcccacc accctgtcga catcaccaac tgggagctca	960
ctgagtcctc tgagcacggt ttttccttca gcacgtctca ttcttgtggt taccttgccc	1020
aagacctga cgtgtttgat ggtaagtgtt ggctttcttg ctttttgggc ctgccgaccg	1080
aagtgtggcg tcatgaggag tatctagcta acgccttcgg ttaccaaacc aagtggggcg	1140
tgcattgtaa gtacctcag cgcaggcttc aggtccgagg catgcgtgct gtagttgatc	1200
ctgatgttc catccacgtt gaagcgctgt cttgccccca gtcttggatc aggcacctga	1260
ctctaaatga tgacgtcacc ccaggatttg ttgcctaac atcccttcgc attgagccga	1320
acacagagcc tactactttc cggatctttc ggtttggagc gcataagtgg tatggcgctg	1380
ccggcaaacg ggctcgtgct aagcgtgccg cttaaaggta gaagaattca gctccaccc	1440
ccaaggtcgc cctgcgggtc cccacctatg gaattaccac ctactctcca ccgacagacg	1500
ggtcttgtgg ttggcatgtc cttgccgcca taatgaaccg gatgataaat ggtgacttca	1560
cgtccctct gactccgtac aacagaccag aggatgattg ggcttctgat tatgatcttg	1620
ctcaggcaat ccaatgtcta caactgcctg ctaccgtggt ccggagtcgc gcctgtccta	1680
acgccaagta cctcataaaa ctcaacggag tccactggga ggtagaggta aggtcaggaa	1740
tggctcctcg ctctctttct cgtgaatgtg tggttggcgt ttgctctgaa ggttgtgttg	1800
caccgcctta tccagcagac gggctaccag aacgagcact cgaggccttg gcgtctgctt	1860
acaggttacc ctctgattgt gttagctctg gcattgtgta ctttcttgct aaccacctc	1920
ctcaggaatt ctggaccctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccagag cggtcgggt	1980
tctctagttt gtataaatta ctattagagg ttgttccgca aaaatgcggt gccacggaag	2040
gggctttcgt ctatgctgtt gagagaatgt tgaaggattg tccgagctcc aaacaggcca	2100
tggcccttct ggcaaaaatt aaagtccat cctcaaagge cccgtctgtg tcccttgacg	2160
agtgtttccc tacggatgtt tcagccgact tcgagccagc atctcaggaa agggcccaaa	2220
gttccggtgc tgctgttgc ctgtgttcac cggaagttaa agagttcgaa gaagcagccc	2280
cagaagaagt tcaagagagt ggccacaagg tcgcccgtc tgcatgtgtt gccgagggtc	2340
ctaacaatga acaggtaccg atggctgccg gcgagcaact gaagcccgtt ggtcgcgttt	2400
tggcggtcgg gaatgctcat gaaggtgttc tggcctcaac tagttcgact aacctgatag	2460
gcgggaactt cccccctca gactccatga aagagagcat gctcaatagc tgggaagacg	2520

aaccactgga ttgttccaa ccggcaccag ctgttacaat gacccttgat agagagcaaa	2580
cacccgacaa cctgggtcct gatgccgttg ccttccccgt caccgttcga aaatttgtcc	2640
cgacagggcc tacactccgt catgttgagc actgcggcac ggagtcaggc gacagcagtt	2700
cgcccttgga tctgtcttat gcgcaaacc tggaccagcc tttaaata tcttggccg	2760
cttggccagt gagggccacc gcgtctgacc ctggctgggt ccacggtagg cgtgagccta	2820
tctttgtaa gctcagat gctttctctg acggcgattc agcccttcag ctgggggagc	2880
tgtctgaatc cggctccgtc atcagtttg accggacaag aaatgctccg gcggtcgacg	2940
ccctgttga cttgacggct tcgaacaagg cctctctgt ggttgatcct ttcgaatttg	3000
ccgaactcaa gcgcccgcgt tttccgcac aagccttaat tgaccgaggc ggtccacttg	3060
ccgacgtcca tgcaaaaata aagaaccggg tatatgaaca gtgcctccag gcttgtgagc	3120
ctggcagtcg cgcaaccca gccaccaaga agtggctcga taaaatgtgg gatagggtgg	3180
acatgaagac ttggcgctgt acctcgcagt tccaagctgg tcgattctt gcgtccctta	3240
aattcctccc tgacatgatt caggacacac cactcctgt tcctaggaag aatcgggcta	3300
gtgataatgc cggcctgaag cgactgggtg cgcagtggga cagaaaattg agtgcaaccc	3360
cccttcaaa accggttgga ccaacacttg accaaattgt ccttcgccc acgggtaccc	3420
agcaagaaga tgtcacttcc tccgatgggc catctcatgc gccggatcct cctagtcgaa	3480
tgagcacgag tgggagttgg aaggcccttg tgctctctgg taccgtctc gcggggtcca	3540
ttagtcagca ttcatgaca tgggtttttg aggttttctc ccatctcca gcttttgac	3600
tcacactttt ctgcgcagg ggctctatgg ctccagtgat ttggatgttt gcagggtttg	3660
ttttacttgc tctctgctc tgctgttctt acccagttat cgggtgcctt cccttattgg	3720
gtgtccttcc tggtctgtg cggcgcttc gtctgggggt ttttggttct tggatggctt	3780
tcgtgtatt tttattctg actccatcca acccagtcgg ttcttcttgt gaccacgatt	3840
cgcgggagtg tcatgtgag cttttggctc ttgagcagcg ccaactttgg gaacctgtgc	3900
gcggccttgt ggtcggcccc tcgggcctct tatgtgtcat tcttgcaag ctactcgtg	3960
ggtcacgtta tctctggcat gttttcttac gtttatgcat gcttcagat ttggcccttt	4020
ctcttgttta tgttggtgcc cagggcgctt gtcacaagtg ttggggaaag tgtataagaa	4080
cagctccggc ggaggtggct ctcaatgtgt tccctttctc gcgcgtacc cgtagctctc	4140
ttgtgtcctt gtgcgatcgg ttccaagcgc caaaagggtg tgatcctgtg tacttggcaa	4200
cgggttggcg cgggtgttgg tgtgtgaga gtccattca tcaaccgcac caaaaacca	4260

tagcttatgc taatctggat gaaaagaaaa tatctgcca aacggtggtt gctgtccac	4320
acgatcccag tcaggccatc aagtgcctga aagttttgca ggcgggagga gccatcgtgg	4380
accagccac acctgaggtc gtccgtgtat ccgaaatccc cttctcagcc ccatttttc	4440
caaaagtcc agtcaacca gattgtaagg ttgtggtgga ttcggacact tttgtggctg	4500
cggttcgtg cggctactcg acagcacaac tggctctagg ccagggaac tttgccaagt	4560
taaatcagat tcccctcagg agctccatct ccaccaaagc gattggcggg gcctcttaca	4620
cccttctgt ggctcaagtt tctgtgtgga ctcttgttca cttcatctc ggtctttggt	4680
tcacgtcacc ccaagtgtgt ggccgaggaa cctctgactc atggtgttca aatcctttt	4740
cataccctac ctatggcccc ggggttgtgt gctcctctcg actttgtgtg tctgccgacg	4800
gggtcactct accattgttc tcagccgtgg ctcaactctc cggtagagag gtggggattt	4860
ttattttggt gctcgtctcc ttgatggctt tggcccaccg catggccctt aaggcagaca	4920
tgttgatggt ctttctggct ttttgtctt acgcctggcc catgagctcc tggttgattt	4980
gcttctttcc tacactcttg aagtgggtta cctccaccc tcttactatg ctttgggtgc	5040
actattctt ggtgttttgt ctgccagcag ccggcatcct ctactaggg ataactggcc	5100
ttctttgggc ggttggccgc tttactcagg ttgccgaat tattacacct tatgacatcc	5160
accagtacac ctctgggcca cgtggcgtg cagctgtggc cacagcccca gaaggcactt	5220
atatggccgc cgtccggaga gctgcttta ctgggcgaac tttaatcttc accccgtctg	5280
cagttggatc cttctcgaa ggagctttca ggactcataa accttgtctt aacaccgtaa	5340
atgttgtagg ctcttccctt ggttccggcg gggttttcac tattgacggc agaaaaattg	5400
ttgtcactgc tgcccatgtg ttgaacggcg acacagctag agtcaccggc gactcctaca	5460
accgcatgca tactttcaag accaatggtg attatgctg gtcccatgct gatgactggc	5520
ggggcgttgc cctgcggtc aaggttgca aggggtaccg cggtcgtgcc tactggcaaa	5580
catcaactgg cgtcgaaccc ggtgttattg gggaagggtt cgccttctgt ttcaccacct	5640
gtggcgattc ggggtcaccc gtcctctcag aatccggtga tctcattgga atccataccg	5700
gttcaaataa acttggttct ggtcttgtga caaccctga aggggagaca tgtaccatca	5760
aagaaaccaa gctctctgac ctctccagac atttcgagg cccaagcgtt cctcttgggg	5820
atattaaatt gactccagcc atcatcctg atataacatc cattccgagt gacttggcat	5880
cgctctatc ctccgtccct gtagtgggaag gcggcctctc gaccgttcaa cttttgtgtg	5940
tcttttctt actttggcgc atgatgggcc atgctggac tccattgtt gccgtgggtt	6000

tctttttact gaatgaaatt cttccagcag ttttgggccg agccgtgttt tcttttgac	6060
tttttgctgc tgcatgggcc accccctggt ctgcacaggt gttgatgatt agactcctca	6120
cggcatctct caaccgcaat aagctttctc tggcggttcta cgcactcggg ggggtcgtcg	6180
gtttggccgc tgaatcggg acttttgctg gcaaattgcc tgaattgtct caaacccctt	6240
cgacatactg cttcttacct agggtccttg ctatgaccag ttgtgttccc accatcatca	6300
ttggtggact ccatgccctc ggtgtaattc tgtggttggt caaataccgg tgcctccaca	6360
acatgctcgt tggatgagg agtttttcaa gcgccttctt cctacggtat ttgcagagg	6420
glaatctcag aaaaggtgtt tgcagtcct gtggcatgaa taacgagtcc ctgacggctg	6480
ctttggcttg caagtgtca cgggctgacc ttgatttttt gtccagctta acgaacttca	6540
agtgccttgt atctgcttcg aatatgaaaa atgctgccgg ccagtacatt gaagcggcgt	6600
atgccaaggc cctgcgcca gagttggcgt ctctagtcca gattgacaaa atgaaaggag	6660
ttttgtccaa actcgaggcc ttgtctgaaa cagctactcc gtcccttgac ataggtagc	6720
tgattgttct gcttgggcaa catccacacg gatctatcct tgatattaat gtggggactg	6780
agaggaaaac tgtgtccgtg caagagacc ggagcctagg cggttccaaa ttcagtgttt	6840
glactgtcgt gtctaacaca cccgtggacg ccttaaccgg catcccactc cagacaccaa	6900
cccccttttt tgagaatggt ccgcgtcatc gcagcgaaga agacgatctt aaagtcgaga	6960
ggatgaagaa aactgtgtg tccctcggtt tccacaacat caatggcaaa gtttactgca	7020
agatttggga caagtcacc ggtgacacct ttacacgga tgattcccgg tataccacg	7080
accatgctct tcaggacagg tcagccgact acagagacag ggactatgag ggtgtgcaaa	7140
ccgccccca acagggatit gatccaaagt ctgaaacccc tgtcggcact gttgtgatcg	7200
gcggtattac gtataacagg tatctgacta agggtaagga ggttctggtt cccaagccc	7260
acaattgcct tgaagctgcc aagctgtctc ttgagcaagc tctcgtggg atgggcaaaa	7320
cttgcgacct tacagctgcc gagtggaaga agttaaagcg catcatcagt caactccaag	7380
gtttgaccac tgaacaggt ttaaactgct agccgctagc ggcttgacce gctgtggccg	7440
cggcggttta gttgttactg aaacggcggg aaaaattgta agataccaca gcagaacttt	7500
caccttgggc ctttggacc taaaagtcgc ttctgaggtg gagtgaaga gatcaactga	7560
gcagggccac gctgttggtg caaacctatg ttctggtgtt gtattgatga gacctaccc	7620
accgtccctt gttgacgttc ttctgaaacc cggacttgac acaacaccg gcattcaacc	7680
ggggcatggg gccgggaata tggcggtgga cggttccatt tgggattttg aaaccgcacc	7740
cacaaaggca gaactcgagt tgtccaagca aataatccaa gcatgtgaag tcaggcgagg	7800
ggatgccccg aacctccaac tcccttaca gctctgtcca gttagggggg atcctgagcg	7860

gcataaaggc cgccttatca ataccagggtt tggagatttg ccttacaaga ctctcaaga 7920
 caccaagtcc gcaatccacg cggcttggtt cctgcacccc aacggggctc ccgtgtctga 7980
 tggtaaattc acattaggca ccactcttca acacggttcc gagctttatg tccctactgt 8040
 gccctatagt gtcatggagt accttgattc acgccctgac acccccttta tgtgtaccaa 8100

acatggtact cccgaggctg ctgcagagga ccttcgaaaa tatgacttat ccaccaagg 8160
 gtttgcctg cctggggctc tacgtctagt acgcagattc atctttggcc atattggtaa 8220
 ggcccgcca ctgttctcc catcaactta tcccgccaag aactctatgg cagggatcaa 8280
 tggccagagg ttccaacaa aagacgttca gagcatacct gaaattgatg aaatgtgtgc 8340
 ccgcgtgtc aaagagaatt ggcaaaactgt gacgccttgc accctcaaaa aacagtattg 8400
 ttccaagcct aaaaccagga ccaccttggg taccaacaac ttcatgtcct tggctcacag 8460
 gtccgcactc agcgggtgtca ctcaggcgtt catgaaaaaa gcctggaagt ccccgatcgc 8520

cttggggaaa aacaaattta aggagttgca ctgcactgtc gccggtaggt gcctcgaggc 8580
 cgacttggcc tcttgtgac gcagacccc ggccatcgtg aggtggtttg ttgccaacct 8640
 cctgtacgaa ctctggggtt gtgaagagta cttgccaagc tatgtgtcga attgttgcca 8700
 tgacctggtg gcaacgcaaa atggcgcctt caaaaaacgt ggtggcctgt catctggaga 8760
 ccccgttacc agtgtgtcca acacagtgtt ttacttggtg atttatgtc agcacatggt 8820
 gctgtcggct ttgaagatgg gtcatgaaat cggcctcaag ttctcgagg aacagcttaa 8880
 gtccgaggac ctctcgaaa tccagcctat gttggtatat tctgatgacc ttgtattgta 8940

tgctgaaaga cccaccttcc ccaattacca ttggtgggtt gagcaccttg acctgatgt 9000
 gggttttaag acagacccaa aaaagactgt cataactgac aaaccagct ttcttggtg 9060
 tagaatcgaa gcggggcgac aactggttcc cagtcgcgac cgatttctgg ctgctcttgc 9120
 atatcacatg aaggcgaga acgcctcaga gtattatgcg tctgtgcg cgattctgat 9180
 ggactcgtgt gcttgcatg accacgatcc tgagtggatg gaggacctca tctgcggcat 9240
 tgctcgatgc gcccgcagg atggctacag ttcccaggc ccgccgttct tcatgtccat 9300
 gtgggagaag ctgaaaagtc acaatgaagg caagaaattc cgccactgtg gcatttgtga 9360

cgccaaggcc gatcatgctg ccgcctgtgg gcttgattta tgtctgttcc actcgactt 9420
 tcatcaaac tgcctgttta ctctgagctg cgccatcat gccggttcaa aagaatgccc 9480
 acagtgtcag tcacctgtt gagctggtaa atccccctt gatgcagtgc tgaaacaaat 9540
 cccgtacaaa cccctcgtc ctgtcatcat gaaggtggac aataaaacaa cgaccttga 9600
 cccgggaagg tatcagtccc gtcgaggtct tgttgtgtc aagaggggta ttgcaggcaa 9660
 tgaggttgat ctgctgatg gagactatca ggtggtgccc cttttgcaa cctgcaaaga 9720

cataaacatg gtgaagggtg ctgtcaatgt gctactcagc aagttcatag tggggccgcc	9780
aggttccggc aagacgacct ggctactgag tcaagttcag gatgatgatg tcatctatac	9840
acctacccat cagaccatgt tcgacatagt caatgccctc aaagtctgta ggtattccat	9900
cccagtggct tcagggctcc ctttcccacc gcccgccaga tctggaccgt gggttaggct	9960
cgttgctagc gggcacatcc ctggccgaat atcatacctt gacgaggccg gatattgcaa	10020
tcatctggat attctcagac tgctttctaa gacacctctt gtgtgtttgg gtgaccttca	10080
gcaacttcac ccgtcggct ttgactctta ctgttatgtt tttgatcaaa tgcctcataa	10140
gcagctgacc actatttata gatttggccc caatatctgt tctgccattc aaccttgta	10200
cagggaaaaa ctgcaatcta aggccaggaa cactaggggtg gtttttactg cccggcccgt	10260
ggcttttggc caggtgttga cgccatatca taaagaccgc accggctcag ctataacat	10320
agattcatcc caggagacca cttttgatgt tgtgacgtg catttgccgt cgccagattc	10380
cctgaacaaa tcccgggctc ttgtagctat cactcgggca aggcatgggt tgttcatcta	10440
tgacctcat aaccaactcc ggaagttttt caacttaaca cctgagcgca ctgattgcaa	10500
cctcgtgttc aaccgcgggg acgagtttgt agttttgaat gcagataatg cagtcacgac	10560
tgtggctaag gttttggagg cgggcccgtc tcggtttcga gtatcagatc caaggtgcaa	10620
gtctctttta gccgcttct cggccagtct ggaaggaggc tgcatgccac tgccgcaagt	10680
ggcacataat ctggggtttt acttctctcc agatagtcca gcatttgcac ctctgcaaaa	10740
agagctggca ccacattggc cggttgttac tagtcagaac aaccaggcat ggccccaccg	10800
acttgtcgt agtatgcggc cagttgatgc ccgctacagc aagcctatgg tcggtgcagg	10860
glatgtggtt gggccatcca ctttcttgg cactcctggt gtagtgtcat actatctcac	10920
gctgtacatc aggggtgagc cccaggcctt gccggagaca ctgctctcaa cgggacgtat	10980
agctactgat tgtcgagagt atctcgacgc agctgaggaa gaagcagcta aagaactccc	11040
tcacgcattc attggcgatg tcaaaggtag tacagtgggg gggtgtcacc acattacgtc	11100
aaaatacctt cccaggtctt tgcccaagga ctccgttgcc gtggtcggag tgagttcgcc	11160
cggcaaggct gccaaagccg tgtgtactct caccgatgtg tatcttccc agctccggcc	11220
atatttgcaa ccggaaacag catcgaaatg ctggaaactt aaactagact tcagggatgt	11280
cagactgatg gtctggaaa gaggccaccg atatttccaa ctggaggggc tcacatggtc	11340
agcgtgccc gactatgcca gggtcattca gctacaaaa gatgccgttg tgtacattga	11400
tccgtgcata ggaccggcaa cagccaaccg taagtttgtg agaactacag attggcgagc	11460

tgacctggca gtgacaccgt acgactacgg tgctcagagc attttgacta cagcctgggt	11520
cgaggacctt gggccgcagt ggaagatttt aggggttgca ccttcaagc gggcatttgg	11580
ctttgaaaac actgaggatt gggcgatcct tgcacgtcgc atgaacgacg gcaaggacta	11640
cactgactat aactggaatt gtgttcgaca acgcccacat gccatctacg gacgtgcccc	11700
tgaccatacg taccattttg cccctggcac tgaactgcaa gtagagctag gtaaaccctg	11760
gtaccgcct gagcaagtac cgtgaatcta gagtgatgca atggggtcac tgtggagtaa	11820
aatcagtcaa ctgttcgtgg atgccttcac tgagttcctt gttagtgtgg ttgatattgt	11880
catcttcctt gccatactgt ttgggttcac cgttcgaggg tggttactgg tctttttttt	11940
cagagtgggt tgctccgcgc ttctccgttc gcgctctgcc attcactctt ccgaactatc	12000
gaaggctcta tgagggttg ctacctaatt gcagaccgga tgttcacaa ttcgcattca	12060
agcaccattt ggttatgttt tggcacatgc gagtttccca cttaattgac gaaatggtct	12120
ctcgccgat ttaccagacc atggaacatt cagggtcaagc ggcctggaag cagggtggtta	12180
gtgaagctac tctcacaaga ctgtcaaagc tcgacatagt tctccacttc caacacctgg	12240
ccgcaataga ggcggattct tgccgcttcc tcagctcacg acttgtgatg ctgaaaaatc	12300
ttgctgttgg caatatgagc ctacagtaca acaccacgtt ggaccgcgtt gagctcatct	12360
tcccaacacc aggtacgagg cccaaattga ccgattttag acaatggctc gtcagtgtgc	12420
acgttctat ttttctct gtggcctcat cagttacctt gttcatagt ctttggttc	12480
gaattccagc tctacgtat gtttttgggt tccattggcc caggcaaca catcattcga	12540
gctaaccatc aattactcta tatgtaagcc ctgtctcacc agtcaagcgg ctgcacaaag	12600
gtcgaaccc ggtcgaaca tgtggtgcaa aataggacac accacgtgtg aggagcgtga	12660
ccatgatgag ttgtcaatga ccattccgtc cgggtacgat aacctcaaac ttgagggtta	12720
ttacgttgg ctggcttttt tgctcttttc ttacgcagcc caatttcac cagagtgtgt	12780
cggaataggg aatgtgtcac gcgtcttcgt ggataaacgg caccagttca tctgtgccga	12840
gcacgacgga caaaattcaa ccgtatccac cgaacataat atttccgat tgtatcggc	12900
gtactaccac caccaggtag acgggggcaa ttgggttcac ctggaatggc tgcggccttt	12960
cttttctcc tggctaglac tcaatatttc atggtttctg aggcgttcgc ctgcaagccc	13020
tgtttctcga cgcatttate agatattgag accaacacga ccgcggctgc cggtttcatg	13080
gtccttcagg acatcaactg tttccacagt ggctcagagg cacaacgac tgggtccatc	13140
agaaagtcgt cccaatgccg tgaagccgtc ggcaactccc agtacatcaa gataacggcc	13200
aatgtgaccg acgaatcata ctgttacaac gcggacttgc tgatgctttc tgcgtgcctt	13260
ttctacgcct cagagatgag cgagaaaggc tttaaagtca tttttgggaa tgtctctggc	13320

gttgtctccg ctgtgtcaa ttttacagat tatgtggccc atctgaccca acataccag 13380
cagcatcatt tggtaaccaa tcacattcgg ttgtacatt tcctgacacc atcagcaatg 13440
agggtgggcta caaccattgc ttgtttgttc gccattctct tggcgatatg agatgttctc 13500
acaaatcggg gtgtttcttg actccgcact ctgtcttttg gtggtttttt ttgctgtgta 13560

ccggcttgtc ctggctcttt gccgatggca acggcaacag ctcgacatac caatatatat 13620
ataacttgac gatatgcgag ctgaatggga ccgaatggct gtccgacat ttaattggg 13680
cagtcgagac ttttgtgtc taccagtgg cgactcatat cctctcactg ggtttctca 13740
cgacaagtca tttccttgat gcgttcggtc ttggagctgt gtcaattaca gggttttgtg 13800
gcgggcggta cgtgctcagc agcgtgtacg gcgcttgtgc actagcagcg ctgctatgtt 13860
ttgttatccg tgctgcaaaa aattgtatgg ctgcccgtc tgctcgtacc cggtttacca 13920
acttcattgt ggatgaccgg gggagaatcc atcgggtggag gtctccaata gtggtggaaa 13980

aattaggtaa agctgacgtc ggcgccgacc ttgtcaccat caaacatgtc atcctcgaag 14040
gagtcaaagc tcaacccttg acgaggactt cggccgagca atgggaggcc tagataattt 14100
ctgcaacgat cccaccgccg caaaaagct tgtgctagcc tttagcatca cgtatacacc 14160
catcatgata tacgccctta aggtgtcacg cggccgactc ttggggttgt tgcacatctt 14220
gatatttctg aactgttctt tcacgttcgg atacatgaca tatatgcatt ttgaatccac 14280
caaccgtgtc gcgcttacca tggggggcgt tgtcgccctt ctgtggggcg tttatagttt 14340
catagagtca tggaagtta tcacttcag atgcagattg tgttcctag gccggcgata 14400

cattctggcc cctgcccacc acgtagaaag tgtgcaggc ctccatccga tcccagcgtc 14460
tggtaaccaa gcatacgtg tgagaaagcc cggactaaca tcagtgaacg gcactctggt 14520
accaggactt cgaggcctcg tgctgggcgg caaacgagct gttaaagcag gagtggttaa 14580
cctcgtcaag tatggccggt aaaaaccaga gccagaagaa aaagaaaaat ccagctccaa 14640
tggggaatgg ccagtcagtc aatcaactgt gccagctgct gggcacaatg ataaagtccc 14700
agcgcacgag acccagggga ggacaggcta aaaagaaaaa gcctgagaag ccacatttcc 14760
ccctggctgc tgaagatgac gtccggcacc atctcaccca gaccgagcgc tccctttgct 14820

tgcaatcgat ccagacggct tttaatcaag gcgcaggaac tgcgtcgtt tcatccagcg 14880
ggaagatcgg ttttcaggtt gattttatgc taccggttgc tcatacagtg cgctgattc 14940
gcgtgacttc tacatccgcc ggtcaggatg caaattaatt tgatagtcag gtgaatggcc 15000
gcgattggcg tgtggcctct gattcaccta ttcaattagg gcgatacat gggggtcaga 15060
cttaattagg caggaacat gtgaccgaaa tt 15092

<210> 4

<211> 15092

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRRS virus isolate 96V198 - passage 14

<400> 4

atgatgtgta gggattatccc cctacataca cgacacttct agtgtttgtg tgccttggag	60
gcgtgggtat agccccgccc cacccttgg ccctgttct agcccaacag gtatccttct	120
ctctcggggc gagcgcgcgc cctgtgtctc ccttcagca ggaaggacct cccgagtatt	180
tccggagagc acctgcttta cgggatctcc accctttaac catgtctggg acgtttctcc	240
ggtgcatgtg caccctggct gcccggtat ttggagcgc cggccaagtc tattgcacac	300
ggtgtctcag tgcacggtct cttctctctc cggagcttca ggacactgac ctgctgcaa	360
ttggcttgtt ttacaagcct aaagacaagc ttcactggaa agtcctatc ggcatccctc	420
agggtgagtg tactccgtcc ggggtctgtt ggctctcagc catcttccc ttggcgcgca	480
tgacctccgg caatcacaaac tttctccaac gacttgtgaa ggttgctgat gttttgtacc	540
gtgacggctg ctggcacct cgacaccttc gcgaactcca agtttacgag cgcggctgca	600
actggtacct gatcacgggg cccgtgccg ggatgggttt gtacgcgaac tccatgcacg	660
tgtccgacca accgttccct ggtgccgtt atgtgttaac gaactacct ctgcctcagc	720
aggcttctgc acagccgttt tgtccatttg aggaggttca ttccgacgta tacaggtgga	780
agaaattcgt gatttttgtg gattcctctt ctgacggccg atctcgcatg atgtggacac	840
caggatccga cgactcggct gccttagaag tattgccacc tgaactagaa tgtcgagtcg	900
aaatcctcgt tcggagtttt cctgccacc acctgtcga catcaccaac tgggagctca	960
ctgagtcctc tgagcacggt ttttcttca gcacgtctca ttcttgtggt taccttgccc	1020
aagacctga cgtgtttgat ggtaagtgtt ggctttcttg ctttttgggc ctgccgaccg	1080
aagtgtggcg tcatgaggag catctagcta acgcttcgg ttaccaaacc aagtggggcg	1140
tgcattgtaa gtacctcag cgcaggcttc aggtccgagg catgcgtgct gtagttgac	1200
ctgatggctc catccacgtt gaagcgtgt cttgccccca gtcttgatc aggcacctga	1260
ctctaaatga tgacgtcacc ccaggatttg ttgcctaac atcccttcgc attgagccga	1320
acacagagcc tactactttc cggatctttc ggtttggagc gcataagtgg tatggcgctg	1380
ccggcaaacc ggctcgtgct aagcgtgccg cttaaaggta gaagaattca gctccaccc	1440
ccaaggtcgc cctgccggtc cccacctatg gaattaccac ctactctcca ccgacagacg	1500
ggtcttggg ttggcatgtc cttgccgcca taatgaaccg gatgataaat ggtgacttca	1560

cgccccctct gactccgtac aacagaccag aggatgattg ggcttctgat tatgatcttg 1620
ctcaggcaat ccaatgtcta caactgcctg ctaccgtggg cggagtcgc gcctgtccca 1680

acgccaagta cctcataaaa ctcaacggag tccactggga ggtagaggtag aggtcaggaa 1740
tggctcctcg ctctctttct cgtgaatgtg tggttggcgt ttgctctgaa ggttgtgttg 1800
caccgcctta tccagcagac gggctaccag aacgagcact cgaggccttg gcgtctgctt 1860
acaggttacc ctctgattgt gttagctctg gcattgctga ctttcttgct aacccacctc 1920
ctcaggaatt ctggaccctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccagag cggtcgggt 1980
tctctagttt gtataaatta ctattagagg ttgttccgca aaaatgcggt gccacggaag 2040
gggctttcgt ctatgctgtt gagagaatgt tgaaggattg tccgagctcc aaacaggcca 2100

tggcccttct ggcaaaaatt aaagttccat cctcaaaggc cccgtctgtg tcccttgacg 2160
agtgtttccc tacgatgtt tcagccgact tcgagccagc atctcaggaa agggcccaaa 2220
gttccgggtg tgctgttgtc ctgtgttcac cggaagtaaa agagttcgaa gaagcagccc 2280
cagaagaagt tcaagagagt ggccacaagg tcgccgctc tgcatttgtt gccgagggtc 2340
ctaacaatga acaggtaccg atggctgccg gcgagcaact gaagcccggg ggtcgcgttt 2400
tggcggtcgg gaatgctcat gaaggtgttc tggcctcaac tagttcgacc aacctgatag 2460
gcgggaactt cccccctca gactccatga aagagagcat gctcaatagc tgggaagacg 2520

aaccactgga ttigtccaa ccggcaccag ctgttacaat gaccttgtg agagagcaaa 2580
caccgacaa cctgggtcct gatgccgtg ctttccccgt caccgttcga aaatttgtcc 2640
cgacagggcc tacactccgt catgttgagc actgcggcac ggagtcaggc gacagcagtt 2700
cgcccttgga tcgtcttat gcgcaaacc tggaccagcc tttaaatcta tccttgccg 2760
cttgccaggt gagggccacc gcgtctgacc ctggctgggt ccacggtagg cgtgagccta 2820
tctttgtgaa gcctcgagat gctttctctg acggcgattc agcccttcag ctcggggagc 2880
tgtctgaatc cggctccgtc atcgagtgtg accggacaag aaatgctccg gcggtcgacg 2940

ccctgttga cttgacggct tcgaacaagg cctctctctg ggttgatcct ttcgaatttg 3000
ccgaactcaa gcgccccgt tttccgcac aagccttaat tgaccgaggc ggtccacttg 3060
ccgacgtcca tgcaaaaata aagaaccggg tatatgaaca gtgcctccag gcttgtgagc 3120
ctggcagtcg cgcaacccca gccaccaaga atgggtcga taaaatgtgg gatagggtgg 3180
acatgaagac ttggcgtgtg acctgcagt tccaagctgg tcgcattctt gcgtccctta 3240
aattcctccc tgacatgatt caggacacac cactcctgt ccccttcaa accggttgga 3300

ccaacacttg accaaattgt cccttcgccc acgggtaccc agcaagaaga tgtcacttcc 3360

tccgatgggc catctcatgc gccggatcct cctagtcgaa tgagcacgag tgggagttag 3420

aagggccttg tgcctctctg taccgctctc gcgggggtcca ttagtcagca tttcatgaca 3480

tgggtttttg aggttttctc ccatctccca gcttttgac tcacactttt ctgcccagg 3540

ggctctatgg cttcaggatg ttggatgttt gcagggtgtt ttttacttgc tctcctgctc 3600

tgtcgttctt acccagtatt cgggtgcctt cccttattgg gtgtccttcc tggctctgtg 3660

cggcgcttc gtctgggggt ttttggttct tggatggctt tcgctgtatt tttattctcg 3720

actccatcca acccagtcgg ttcttcttgt gaccacgatt cgccggagtg tcatgtgag 3780

cttttgctc ttgagcagcg ccaactttgg gaacctgtgc gcggccttgt ggtcggcccc 3840

tcgggcctct tatgtgtcat tcttggaag ctactcgggt ggtcacgtta tctctggcat 3900

gttttcttac gtttatgcat gcttcagat ttggcccttt ctcttggtta tttggtgtcc 3960

caggggcgtt gtcacaagt ttggggaaag tgtataagaa cagctccggc ggagggtgct 4020

ctcaatgtgt tccctttctc gcgcgtacc cgtagctctc ttgtgtcctt gtgcgatcgg 4080

ttccaagcg caaaaggggt tgatcctgtg tacttgga cgggttggcg cgggtgttgg 4140

tgtggtgaga gtccattca tcaaccgcac caaaaacca tagcttatgc taatctggat 4200

gaaaagaaaa tatctgcccc aacggtggtt gctgtccac acgatccag tcaggccatc 4260

aagtgcctga aagttttgca ggccggaggga gccatcgtgg accagccac acctgaggtc 4320

gtccgtgtat ccgaaatccc cttctcagcc ccatttttcc caaaagtcc agtcaacca 4380

gattgtaagg ttgtggtgga ttccgacact ttgttggtg cggttcgtg cggctactcg 4440

acagcacaac tggctcttag ccagggaac ttgccaagt taaatcagat tcccctcagg 4500

agctctatct ccaccaaagc gattggcggg gcctcttaca cccttgcgtt ggtcaagtt 4560

tctgtgtgga ctctgttca cttcatctc ggtcttttgt tcacgtacc ccaagtgtgt 4620

ggccgaggaa cctctgactc atggtgttca aatcctttt cataccctac ctatggcccc 4680

ggggttgtgt gctcctctcg actttgtgtg tctgccgacg gggtcactct accattgttc 4740

tcagccgtgg ctcaactctc cggtagagag gtggggatit ttatttttgt actcgtctcc 4800

ttgatggctt tggcccaccg catggccctt aaggcagaca tgttgatgtt ctttctggct 4860

ttttgtgctt acgcctggcc catgagctcc tggttgattt gcttctttcc tacactcttg 4920

aagtgggtta cctccaccc tcttactatg ctttgggtgc actcattctt ggtgttttgt 4980

ctgccagcag ccggcatcct ctactaggg ataactggcc ttctttgggc ggttgccgc 5040

ttactcagg ttgccggaat tattacacct tatgacatcc accagtacac ctctgggcca 5100
 cgtggcgctg cagctgtggc cacagcccca gaaggcactt atatggccgc cgtccggaga 5160
 gctgctttaa ctgggcgaac tttaatcttc accccgtctg cagttggatc ccttctcgaa 5220
 ggagctttca ggactcataa accttgtctt aacaccgtaa atgttgtagg ctcttcctt 5280
 ggttccggcg gggttttcac tattgacggc agaaaaattg ttgtcactgc tgcccatgtg 5340
 ttgaacggcg acacagctag agtcaccggc gactcctaca accgcatgca tactttcaag 5400
 accaatgggt attatgcctg gtcccatgct gatgactggc ggggcgttgc ccctgcggtc 5460

 aaggttgca aggggtaccg cggtcgtgcc tactggcaaa catcaactgg cgtcgaaccc 5520
 ggtgttattg gggaagggtt cgccttctgt ttcaccacct gtggcgattc ggggtcacc 5580
 gtcatctcag aatccggtga tctcattgga atccataccg gttcaaataa acttggttct 5640
 ggtcttgta caaccctga aggggagaca tgtaccatca aagaaaccaa gctctctgac 5700
 ctctccagac atttcgcagg cccaagcgtt cctcttgggg atattaaatt gagtccagcc 5760
 atcatccctg atataacatc cattccgagt gacttggcat cgctcctatc ctccgtcct 5820
 gtagtgaag gcggcctctc gaccgttcaa cttttgtgtg tcttttctt actttggcgc 5880

 atgatgggc atgcctggac tccattgtt gccgtgggtt tcttttact gaatgaaatt 5940
 ctccagcag ttttggtccg agccgtgtt tcttttgac tttttgtgt tgcattgggc 6000
 acccctggt ctgcacaggt gttgatgatt agactcctca cggcatctct caaccgcaat 6060
 aagctttctc tggcgttcta cgcactcggg ggggtcgtcg gtttggccgc tgaaatcggg 6120
 acttttctg gcaaattgcc tgaattgtct caaaccttt cgacatactg ctctttacct 6180
 aggttcttg ctatgaccag ttgtgttccc accatcatca ttggtggact ccatgcctc 6240
 ggtgtaattc tgtggttgtt caaataccgg tgcctccaca acatgctcgt tggatggg 6300

 agtttttcaa gcgccttctt cctacggtat ttgacagagg gtaatctcag aaaagtggt 6360
 tgcagtcct gtggcatgaa taatgagtc ctgacggctg ctttggcttg caagtgtca 6420
 cgggctgacc ttgattttt gtccagctta acgaacttca agtgccttgt atctgcttcg 6480
 aatatgaaaa atgctgccgg ccagtacatt gaagcggcgt atgccaaggc cctgcgcaa 6540
 gagtggcgt ctctagtcca gattgacaaa atgaaaggag ttttgtcaa actcgaggcc 6600
 tttgtgaaa cagctactcc gtcccttgac ataggtgacg tgattgttct gcttgggcaa 6660
 catccacacg gatctatcct tgatattaat gtggggactg agaggaaaac tgtgtccgtg 6720

 caagagacc ggagcctagg cggttccaaa ttcagtgtt gtactgtcgt gtctaacaca 6780
 cccgtggacg ccttaaccgg catccactc cagacaccaa cccctcttt tgagaatggt 6840
 ccgctcatc gcagcgaaga agacgatctt aaagtcgaga ggatgaagaa aactgtgtg 6900

cccctcggct tccacaacat caatggcaaa gtttactgca agatttggga caagtccacc 6960
 ggtgacacct ttacacgga tgattcccgg tataccacag accatgctct tcaggacagg 7020
 tcagccgact acagagacag ggactatgag ggtgtgcaaa ccgccccca acagggattt 7080
 gatccaaagt ctgaaacccc tgcggcact gttgtgatcg gcggtattac gtataacagg 7140

 tatctgacta agggtaagga ggttctggtt cccaagcccg acaattgcct tgaagctgcc 7200
 aagctgtctc ttgagcaagc tctcgtcggg atgggcaaaa cttgcgacct tacagctgcc 7260
 gaggtggaaa agttaaagcg catcatcagt caactccaag gtttgaccac tgaacaggct 7320
 ttaaactgct agccgctagc ggcttgaccc gctgtggccg cggcggtta gttgttactg 7380
 aaacggcggg aaaaattgta agataccaca gcagaacttt caccttgggc cttttggacc 7440
 taaaagtgcg ttctgaggtg gaggtgaaga gatcaactga gcaggccac gctgttgtgg 7500
 caaacctatg ttctggtgtt gtattgatga gacctaccc accgtccctt gttgacgttc 7560

 ttctgaaacc cggacttgac acaacacccg gcattcaacc ggggcatggg gccgggaata 7620
 tgggcgtgga cggttccatt tgggattttg aaaccgcacc cacaaggca gagctcgagt 7680
 tgtccaggca aataatccaa gcatgtgaag tcaggcggg ggatgccccg aacctccaac 7740
 tcccttaca gctctgtcca gttagggggg atcctgagcg gcataaaggc cgccttatca 7800
 ataccaggtt tggagatttg ccttacaaga ctctcaaga caccaagtcc gcaatccacg 7860
 cggttgttg cctgcacccc aacggggctc ccgtgtctga tggtaaattc acattaggca 7920
 ccactcttca acacggttgc gagctttatg tcctactgt gccctatagt gtcattggagt 7980

 accttgattc acgccctgac acccccttta tgtgtacaa acatggtacc cccgaggctg 8040
 ctgcagagga ccttcgaaaa tatgacttat ccaccaagg gtttgtcctg cctggggctc 8100
 tacgtctagt acgcagattc atctttggcc atattggtaa ggcaccgcca ctgttcctc 8160
 catcaactta tcccgcgaag aactctatgg cagggatcaa tggccagagg ttccaacaa 8220
 aagacgttca gagcatacct gaaattgatg aaatgtgtgc ccgcgctgtc aaagagaatt 8280
 ggcaaaactg gagccttgc accctcaaaa aacagtattg ttccaagcct aaaaccagga 8340
 ccatccttgg taccaacaac ttcatgtcct tggctcacag gtcggcactc agcgggtgca 8400

 ctgagcggt catgaaaaa gcctggaagt ccccgatcgc cttggggaaa aacaaattta 8460
 aggagtgtca ctgcactgtc gccgtaggt gcctcaggc cgacttgcc tcttgtgatc 8520
 gcagcaccac ggccatcgtg aggtggtttg ttccaacct cctgtacgaa cttgcgggtt 8580
 gtgaagagta cttgccaagc tatgtgtca attgttgcca tgacctggtg gcaacgcaaa 8640
 atggcgctt caaaaacgt ggtggcctgt catctggaga cccgttacc agtgtgtcca 8700
 acacagtgt ttcactggtg atttatgctc agcacatggt gctgtcggct ttgaagatgg 8760

gtcatgaaat cggcctcaag ttcctcgagg aacagcttaa gttcgaggac cttctcgaaa	8820
tccagcctat gttggtatat tctgatgacc ttgtattgta tgctgaaaga cccaccttcc	8880
ccaattacca ttggtgggtt gagcaccttg acctgatgct gggttttaag acagacccaa	8940
aaaagactgt cataactgac aaaccagct ttttggctg tagaatcgaa gcggggcgac	9000
aactggttcc cagtcgcgac cgcattctgg ctgctcttgc atatcacatg aaggcgcaga	9060
acgcctcaga gtattatgcg tctgctgccg cgattctgat ggactcgtgt gcttgcatg	9120
accacgatcc tgagtgglat gaggacctca tctgcggcat tgctcgatgc gcccgccagg	9180
atggctacag tttcccagge ccgccgttct tcatgtccat gtgggagaag ctgaaaagtc	9240
acaatgaagg caagaaattc cgccactgtg gcatttgtga cgccaaggcc gatcatgct	9300
ccgcctgtgg gcttgattta tgtctgttcc actcgcactt tcatcaacac tgcctgtta	9360
ctctgagctg cgcccatcat gccggttcaa aagaatgccc acagtgtcag tcacctgttg	9420
gagctggtaa atccccctt gatgcagtgc tgaaacaaat cccgtacaaa cccctcgtc	9480
ctgtcatcat gaaggtggac aataaaacaa cgacccttga cccgggaagg tatcagtc	9540
gtcgaggtct tgttctgtc aagaggggta ttgcaggcaa tgaggttgat ctgctgatg	9600
gagactatca ggtggtgccc cttttgcaa cctgcaaaga cataaacatg gtgaaggtgg	9660
ctgtcaatgt gctactcagc aagttcatag tggggccgcc aggttccggc aagacgacct	9720
ggctactgag tcaagttcag gatgatgatg tcatctatac acctacctat cagacctgt	9780
tcgacatagt caatgccctc aaagtctgta ggtattccat cccagtggct tcagggtcc	9840
ctttccacc gcccgccaga tctggaccgt gggttaggct cgttctagc gggcacatcc	9900
ctggccgaat atcatacctt gacgagccg gatattgcaa tcatctggat attctcagac	9960
tgtttctaa gacacctctt gtgtgtttgg gtgacctca gcaacttcac cctgtcggct	10020
ttgactctta ctgttatgtt ttgatcaca tgcctcataa gcagctgacc actatttata	10080
gatttggccc caatatctgt tctgccattc aaccttgta cagggaaaaa ctgcaatcta	10140
aggccaggaa cactagggtg gtttttactg cccggcccgt ggcttttggc caggtgttga	10200
cgccatatca taaagaccgc accggctcag ctataacctat agattcatcc caggagacca	10260
cctttgatgt tgtgacgtg catttgccgt cgccagattc cctgaacaaa tcccgggctc	10320
ttgtagctat cactcgggca aggcatgggt tgttcatcta tgacctcat aaccaactcc	10380
ggaagtttt caacttaaca cctgagcgca ctgattgcaa cctcgtgttc aaccgcgggg	10440
acgagtgggt agttttgaat gcagataatg cagtcacgac tgtggctaag gttctggagg	10500

cgggccccgtc tcggtttcga gtatcagatc caaggtgcaa gtctctttta gccgcttgct	10560
cggccagtct ggaaggagcgc tgcattgccac tgcgcgaagt ggcacataat ctgggggtttt	10620
acttctctcc agatagtcca gcatttgccac ctctgccaaa agagctggca ccacattggc	10680
cggttgttac tagtcagaac aaccaggcat ggccccgaccg acttgctgct agtatgcggc	10740
cagttgatgc ccgtacagc aagcctatgg tcggtgcagg gtatgtggtt gggccatcca	10800
ctttccttgg cactcctggt gtggtgtcat actatctcac gctgtacatc aggggtgagc	10860
cccaggcctt gccggagaca ctctgtctcaa cgggacgtat agctactgat tgtcgagagt	10920
atctcgacgc agctgaggaa gaagcagcta aagaactccc tcacgcattc attggcgatg	10980
tcaaaggtag tacagtgggg ggggtgcacc acattacgtc aaaatacctt cccaggctct	11040
tgcccaagga ctccgttgcc gtggtcggag tgagttcgcc cggcaaggct gccaaagccg	11100
tgtgtactct caccgatgtg tatcttcccg agctccggcc atatttgcaa ccggaaacag	11160
catcgaaatg ctggaaactt aaactagact tcagggatgt cagactgatg gtctggaaag	11220
gagccaccgc atatttccaa ctggaggggc tcacatggtc agcgtgccc gactatgcca	11280
ggttcattca gctacaaaa gatgccgttg tgtacattga tccgtgcata ggaccggcaa	11340
cagccaaccg taaggttgtg agaactacag attggcgagc tgacctggca gtgacaccgt	11400
acgactacgg tgctcagagc attttgacta cagcctggtt cgaggacctt gggccgcagt	11460
ggaagatfff agggttgcaa ccttcaagc gggcatttgg ctttgaaaac actgaggatt	11520
gggcgatcct tgcacgtcgc atgaacgacg gcaaggacta cactgactat aactggaatt	11580
gtgttcgaca acgcccacat gccatctacg gacgtgccc tgaccatacg tatcactttg	11640
cccctggcac tgaactgcaa gtagagctag gtaaacctcg gctaccgcct gagcaagtag	11700
cgtgaatcta gagtgatgca atggggtcac tgtggagtaa aatcagtcaa ctgttcgtgg	11760
atgccttcac tgagttcctt gttagtgtgg ttgatatgt catcttctt gccatactgt	11820
ttgggttcac cgttgcaggc tggttactgg tcttttttt cagagtgggt tgctccgcgc	11880
ttctccgttc gcgtctgcc attcactctt ccgaactatc gaaggtccta tgagggttg	11940
ctacctaatt gcagaccgga tgttcacaaa ttgcattca agcaccatt gggatatgtt	12000
tggcacatgc gattttccca cttaattgac gaaatggtct ctgccgcat ttatcagacc	12060
atggaacatt caggtcaagc ggcctggaag caggtgttta gtgaagctac tctcacaaga	12120
ctgtcaaagc tcgacatagt tctccacttc caacacctgg ccgcaataga ggccgattct	12180
tgccgcttcc tcagctcacg acttgatg ctgaaaaatc ttgctgttgg caatatgagc	12240
ctacagtaca acaccacgtt ggaccgcgtt gagctcatct tccaacacc aggtacgagg	12300
cccaaattga ccgattttag acaatggctc gtcagtgtgc acgcttctat ttttctct	12360

gtggcctcat cagttacctt gttcatagtg ctttggcttc gaattccagc tctacgtat	12420
gtttttgggt tccattggcc caggcaaca catcattcga gctaaccatc aattactcta	12480
tatgtaagcc ctgtctcacc agtcaagcgg ctcgacaaag gctcgaacct ggtcgcaaca	12540
tgtgggtgcaa aatagggcac accacgtgtg aggagcgtga ccatgatgag ttgtcaatga	12600
ccattccgtc cgggtacgat aacctcaaac ttgagggtta ttacgcttgg ctggcttttt	12660
tgtccttttc ttacgcagcc caatttcac cagagtgtgt cggaataggg aatgtgtcac	12720
gcgtcttcgt ggataaacgg caccagttca tctgtgccga gcacgacgga caaaattcaa	12780
ccgtatccac cgaacataat atttccgcat tgtatgcggc gtactaccac caccaggtag	12840
acgggggcaa ttggttcac ctggaatggc tgcggccttt cttttcctcc tggctagtac	12900
tcaatatttc atggtttctg aggcgttcgc ctgcaagccc tgtttctcga cgcatttacc	12960
agatatgag accaacacga ccgcggctgc cggtttcatg gtccttcagg acatcaactg	13020
ttccacagt ggctcagagg cacaacgac tgggccatc agaaagtcgt cccaatgccg	13080
tgaagccgtc ggcaactccc agtacatcaa gataacggcc aatctgaccg acgaatcata	13140
cttgtacaac gcggacttgc tgatgctttc tgcgtgcctt ttctacgcct cagagatgag	13200
cgagaaaggc tttaaagta tttttgggaa tgtctctggc gttgtctccg cttgtgtcaa	13260
ttttacagat tatgtggccc atctgaccca acatacccag cagcatcatt tggtaaccaa	13320
tcacattcgg ttgtacatt tctgacacc atcagcgatg aggtgggcta caaccattgc	13380
ttgtttgttc gccattctct tggcgatatg agatgttctc acaaatcggg gtgtttcttg	13440
actccgact cttgcttttg gtggtttttt ttgctgtgta ccggttgtc ctggctcttt	13500
gccgatggca acggcgacag ctcgacatac caatatatat ataacttgac gatatgcgag	13560
ctgaatggga ccgaatggct gtctgacat ttaattggg cagtcgagac ttttgtctc	13620
taccagtggt cgactcatat cctctcactg ggtttctca cgacaagtca tttccttgat	13680
gcgttcggtc ttggagctgt gtcaattaca gggttttgtg gcgggcggta cgtgctcagc	13740
agcgtgtacg gcgcttgtgc actagcagcg ctgctatgtt ttgttatccg tgcctccaaa	13800
aattgtatgg cttgcegtta tgctcgtacc cggtttacca acttcattgt ggatgaccgg	13860
gggagaatcc atcgggtggag gtctccaata gtggtggaaa aattaggtaa agctgacgtc	13920
ggcggcgacc ttgtcaccat caaacatgtc atcctcgaag gagtcaaagc tcaacccttg	13980
acgaggactt cggccgagca atgggaggcc tagataattt ctgcaacgat cccaccgccg	14040
cacaaaagct tgtgctagcc tttagcatca cgtatacacc catcatgata tacgccctta	14100
aggtgtcacg cggccgactc ttggggttgt tgcacatctt gatatttctg aactgttctt	14160
tcacgttcgg atacatgaca tatatgcatt ttgaatccac caaccgtgtc gcgcttacca	14220

tggggggcgt tgcgccctt ctgtggggcg tttatagttt catagagtca tggagttta 14280

 tcacttccag atgcagattg tgttgcctag gccggcgata cattctggcc cctgcccacc 14340
 acgtagaaag tgctgcaggc ctccatccga tcccagcgtc tggtaaccaa gcatacgctg 14400
 tgagaaagcc cggactaaca tcagtgaacg gcactctggt accaggactt cgaggcctcg 14460
 tgctggggcg caaacgagct gttaaacgag gagtggttaa cctcgtcaag tatggccggt 14520
 aaaaaccaga gccagaagaa aaagaaaaat ccagctccaa tggggaatgg ccagtcagtc 14580
 aatcaactgt gccagctgct gggcacaatg ataaagtccc agcgccagcg acccagggga 14640
 ggacaggcta aaaagaaaaa gcctgagaag ccacatttcc ccctggctgc tgaagatgac 14700

 gtccggcacc atctcaccca gaccgagcgc tccctttgct tgcaatcgat ccagacggct 14760
 tttaatcaag ggcaggaac tgcgtcgctt tcattccagcg ggaagatcgg ttttcaggtt 14820
 gagtttatgc taccggttgc tcatacagtg cgcctgattc gcgtgacttc tacatccgcc 14880
 ggtcaggatg caaattaatt tgatagtcag gtgaatggcc gcgattggcg tgtggcctct 14940
 gagtcccta ttcaattagg gcgatcacat gggggtcaga cttaattagg caggaaccat 15000
 gtgaccgaaa tttcctagga agaatcgggc tagtgataat gccggcctga agcgactggt 15060
 ggcgcagtgg gacagaaaaa tgagtgcac cc 15092

 <210> 5
 <211> 15092
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PRRS virus isolate 96V198 - passage 49
 <400> 5

 atgatgtga ggtattccc cctacataca cgacattct agtgtttgtg tgccttgag 60
 gcgtgggtat agccccgcc cactcttgg ccctgttct agcccaacag gtatccttct 120
 ctctcggggc gagcgcgcc cctgtgtct ccttcagca ggaaggacct cccgagtatt 180
 tccggagagc acctgcttta cgggatctcc accctttaac catgtctggg acgttctccc 240
 ggtgcatgtg caccgccgt gcccggtat ttggagcgc cggccaagtc tattgcacac 300

 ggtgtctcag tgcacggtct cttctctctc cggagcttca ggacactgac ctcgctgcaa 360
 ttggcttgtt ttacaagcct aaagacaagc ttactggaa agtcctatc ggcatccctc 420
 aggtggagtg tactccgtcc ggggtctgtt ggctctcagc catcttccc ttggcgcgca 480
 tgacctccgg caatcacaac tttctccaac gacttgtgaa ggttgctgat gttttgtacc 540
 gtgacggctg ctggcacct cgacaccttc gcgaactcca agtttacgag cgcggctgca 600

actgggtaccc gatcacgggg cccgtgcccg ggatgggttt gtacgcgaac tccatgcacg 660
 tgtccgacca accgttcctt ggtgccgctt atgtgttaac gaactcacct ctgcctcagc 720

aggcttgtcg acagccgttt tgtccatttg aggaggttca ttcgcacgta tacaggtgga 780
 agaaattcgt gatTTTTgtg gattcctctt ctgacggccg atctcgcatg atgtggacac 840
 caggatccga cgactcggtt gccttagaag tattgccacc tgaactagaa tgtcgagtcg 900
 aaatcctcgt tcggagtttt cctgcccacc accctgtcga catcaccaac tgggagctca 960
 ctgagtcctc tgagcacggt ttttccttca gcacgtctca ttcttgttgt taccttgccc 1020
 aagacctga cgtgtttgat ggtaagtgtt ggctttcttg ctttttgggc ctgccgaccg 1080
 aagtgtggcg tcatgaggag catctagctt acgccttcgg ttaccaaacc aagtggggcg 1140

tgcattggtta gtacctccag cgcaggcttc aggtccgcgg catgcgtgct gtagttgatc 1200
 ctgatggtec catccacgtt gaagcgctgt ctgccccca gtcttggtac aggcacctga 1260
 ctctaaatga tgacgtcacc ccaggatttg ttgcctaac atcccttcgc attgagccga 1320
 acacagagcc tactactttc cggatctttc ggtttggagc gcataagtgg tatggcgctg 1380
 ccggcaaacg ggctcgtgct aagcgtgccg ctaaaggtag gaagaattca gctcccacc 1440
 ccaaggctgc cctgccggtc cccacctatg gaattaccac ctactctcca ccgacagacg 1500
 ggtcttgtgg ttggcatgtc cttgccgcca taatgaaccg gatgataaat ggtgacttca 1560

cgccccctct gactccgtac aacagaccag aggatgattg ggcttctgat tatgatcttg 1620
 ctgaggaat ccaatgtcta caactgcctg ctaccgtggt ccggagtcgc gcctgtccca 1680
 acgccaagta cctcataaaa ctcaacggag tccactggga ggtagaggtag aggtcaggaa 1740
 tggctcctcg ctctctttct cgtgaatgtg tggttggcgt ttgctctgaa ggttgtgttg 1800
 caccgcctta tccagcagac gggctaccag aacgagcact cgaggccttg gcgtctgctt 1860
 acaggttacc ctctgattgt gttagctctg gcattgtctga ctttcttctt aacccacctc 1920
 ctgaggaatt ctggaccctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccagag cggtcgggt 1980

tctctagttt gtataaatta ctattagagg ttgttccgca aaaatgcggt gccacggaag 2040
 gggttttctg ctatgctgtt gagagaatgt tgaaggattg tccgagctcc aaacaggcca 2100
 tggcccttct ggcaaaaatt aaagtccat cctcaaaggc cccgtctgtg tcccttgacg 2160
 agtgtttccc tacggatgtt tcagccgact tcgagccagc atctcaggaa agggcccaaa 2220
 gtccgggtgc tgctgttgtc ctgtgttcac cggaagtaaa agagtctgaa gaagcagccc 2280
 cagaagaagt tcaagagagt ggccataagg tcgccgctc tgcatttgtt gccgagggtc 2340

ctaacaatga acaggtaccg atggctgccg gcgagcaact gaagcccgtt ggtcgcgttt	2400
tggcgttcgg gaatgctcat gaaggtgttc tggcctcaac tagttcgacc aacctgatag	2460
gcgggaactt ccccccttca gactccatga aagagagcat gctcaatagc tgggaagacg	2520
aaccactgga ttgtcccaa ccggcaccag ctgttacaat gacctttgtg agagagcaaa	2580
caccgcagaa cctgggtcct gatgccgtg ccttccccgt caccgttcga aaatttgtcc	2640
cgacagggcc tacactccgt catgttgagc actgcggcac ggagtcaggc gacagcagtt	2700
cgcccttgga tctgtcttat gcgcaaacc tggaccagcc tttaaacta tccttggccg	2760
cttggccagt gagggccacc gcgtctgacc ctggctgggt ccacggtagg cgtgagccta	2820
tctttgtgaa gcctcgagat gctttctctg acggcgattc agcccttcag ctcggggagc	2880
tgtctgaatc cggtccgtc atcgagttag accggacaag aaatgctccg gcggtcgacg	2940
ccctgttga cttgacggct tcgaacaagg cctctctgtt ggttgatcct ttcgaatttg	3000
ccgaactcaa gcgcccgcgt tttccgcac aagccttaat tgaccgaggc ggtccacttg	3060
ccgacgtcca tgcaaaaata aagaaccggg tatatgaaca gtgcctccag gcttgtgagc	3120
ctggcagtcg cgcaaccca gccaccaaga agtggctcga taaaatgtgg gatagggtgg	3180
acatgaagac ttggcgctgt acctcgcagt tccaagctgg tcgcattctt gcgtccctta	3240
aattcctccc tgacatgatt caggacacac cacctcctgt tcttaggaag aatcgggcta	3300
gtgataatgc cggcctgaag cgactgggtg cgcagtggga cagaaaattg agtgcaaccc	3360
cccttcaaa accggttgga ccaacacttg accaaattgt ccttcgccc acgggtaccc	3420
agcaagaaga tgtcacttcc tccgatgggc catctcatgc gccggtcct cctagtcgaa	3480
tgagcacgag tgggagtgg aaggcccttg tgctctctgg taccgtctc gcggggtcca	3540
ttagtcagca ttcatgaca tgggtttttg aggttttctc ccatctcca gcttttgac	3600
tcacactttt ctgcgcagg ggctctatgg cttcaggtga ttggatgttt gcagggtttg	3660
ttttacttgc tctcctgctc tgctgttctt acccagtatt cgggtgcctt cccttattgg	3720
gtgtcctttc tggtctgtg cggcgcgttc gtctgggggt ttttggttct tggatggctt	3780
tcgtgtatt ttattctcg actccatcca acccagtcgg ttcttcttgt gaccacgatt	3840
cgccggagtg tcatgtgag cttttggctc ttgagcagcg ccaactttgg gaacctgtgc	3900
gcggccttgt ggtcgccccc tcgggcctct tatgtgtcat tcttggaag ctactcgtg	3960
ggtcacgtta tctctggcat gttttcttac gtttatgcat gcttcagat ttggcccttt	4020
ctcttgttta tgttggtgtc caggggcgtt gtcacaagtg ttggggaaag tgtataagaa	4080

cagctccggc ggaggtggct ctcaatgtgt tccctttctc gcgcgctacc cgtagctctc 4140
 ttgtgtcctt gtgcgatcgg ttccaagcgc caaaaggggt tgatcctgtg tacttggcaa 4200
 cgggttggcg cgggtgttgg tgtggtgaga gtcccatcca tcaaccgcac caaaaaccca 4260
 tagcttatgc taatctggat gaaaagaaaa tatctgcca aacggtggtt gctgtccac 4320
 acgatcccag tcaggccatc aagtgcctga aagttttgca ggccgggagga gccatcgtgg 4380
 accagcccac acctgaggtc gtccgtgtat ccgaaatccc cttctcagcc ccatttttcc 4440
 caaaagtcc agtcaacca gattgtaagg ttgtggtgga ttcggacact tttgtggctg 4500

 cggttcgtg cggtactcg acagcacaac tggctctagg ccagggaac ttgccaagt 4560
 taaatcagat tcccctcagg agctctatct ccaccaaagc gattggcggg gcctcttaca 4620
 ccttctgtgt ggctcaagtt tctgtgtgga ctcttgttca cttcatcctc ggtctttggt 4680
 tcacgtcacc ccaagtgtgt ggccgaggaa cctctgactc atggtgttca aatccttttt 4740
 catacctac ctatggcccc ggggttgtgt gctcctctcg actttgtgtg tctgccgacg 4800
 gggtcactct accattgttc tcagccgtgg ctcaactctc cggtagagag gtggggattt 4860
 ttattttggt actcgtctcc ttgatggctt tggcccaccg catggccctt aaggcagaca 4920

 tgttgatggt ctttctggct ttttgtctt acgcctggcc catgagctcc tggttgattt 4980
 gcttctttcc tacactcttg aagtgggtta cctccaccc tcttactatg ctttgggtgc 5040
 actattctt gggtttttgt ctgccagcag ccggcatcct ctactaggg ataactggcc 5100
 ttctttgggc ggttggccgc ttactcagg ttgccgaat tattacacct tatgacatcc 5160
 accagtacac ctctgggcca cgtggcgtg cagctgtggc cacagcccca gaaggcactt 5220
 atatggccgc cgtccggaga gctgcttta ctgggcgaac tttaatcttc accccgtctg 5280
 cagttggatc cttctcgaa ggagctttca ggactcataa accttgtctt aacaccgtaa 5340

 atgttgtagg ctcttccctt ggttccggcg gggttttcac tattacggc agaaaaattg 5400
 ttgtcactgc tgcccatgtg ttgaacggcg acacagctag agtcaccggc gactcctaca 5460
 accgcatgca tactttcaag accaatggtg attatgctg gtccatgct gatgactggc 5520
 ggggcgttgc cctgcggtc aaggttgcga aggggtaccg cggctgtgcc tactggcaaa 5580
 catcaactgg cgtcgaacct ggtgttattg gggaagggtt cgccttctgt ttcaccacct 5640
 gtggcgattc ggggtcaccc gtcctctcag aatccggtga tctcattgga atccataccg 5700
 gtcaaaataa acctggttct ggtcttgtga caaccctga aggggagaca tgtaccatca 5760

 aagaaaccaa gctctctgac ctctccagac atttcgcagg cccaagcgtt cctcttgggg 5820
 atattaaatt gattccagcc atcatccctg atataacatc cattccgagt gacttggcat 5880
 cgctcctatc ctccgtccct gtagtggaag gcggcctctc gaccgttcaa cttttgtgtg 5940

tctttttcct acittggcgc atgatgggcc atgcctggac tccattgtt gccgtgggtt	6000
tctttttact gaatgaaatt cttccagcag ttttggccg agccgtgttt tcttttgac	6060
tttttgtgct tgcattggcc accccctggt ctgcacaggt gttgatgatt agactcctca	6120
cggcatctct caaccgcaat aagctttctc tggcgttcta cgcactcggg ggggtcgtcg	6180
gtttggccgc tgaatcggg acttttctg gcaaattgcc tgaattgtct caaaccttt	6240
cgacatactg cttcttacct agggtccttg ctatgaccag ttgtgttccc accatcatca	6300
ttggtggact ccatgccctc ggtgtaattc tgtggttgtt caaataccgg tgcctccaca	6360
acatgctcgt tggatgagg agtttttcaa gcgccttctt cctacggtat ttgacagagg	6420
gtaatctcag aaaagggtgt tgcagtcct gtggcatgaa taacgagtc ctgacggctg	6480
ctttggcttg caagtgtca cgggctgacc ttgattttt gtccagctta acgaacttca	6540
agtgtttgt atctgcttcg aatatgaaaa atgctgccg ccagtacatt gaagcggcgt	6600
atgccaaggc cctgcgcaa gagttggcgt ctctagtca gattgacaaa atgaaaggag	6660
ttttgtccaa actcgaggcc tttgtgaaa cagctactcc gtcccttgac ataggtagc	6720
tgattgttct gcttgggcaa catccacacg gatctatct tgatattaat gtggggactg	6780
agaggaaaac tgtgtccgtg caagagaccc ggagcctagg cggttccaaa ttcagtgttt	6840
gtactgtcgt gtctaacaca cccgtggacg ccttaaccgg catcccactc cagacaccaa	6900
cccctctttt tgagaatggt ccgcgtcatc gcagcgaaga agacgatctt aaagtcgaga	6960
ggatgaagaa aactgtgtg cccctcggct tccacaacat caatggcaaa gtttactgca	7020
agatttggga caagtcacc ggtgacacct ttacacgga tgattcccgg tatacccacg	7080
accatgctct tcaggacagg tcagccgact acagagacag ggactatgag ggtgtgcaaa	7140
ccgccccca acagggattt gatccaaagt ctgaaacccc tgtcggcact gttgtgatcg	7200
gcggtattac gtataacagg tatctgacta agggtaagga ggttctggtt cccaagcccg	7260
acaattgcct tgaagctgcc aagctgtctc ttgagcaagc tctcgtggg atgggcaaaa	7320
cttgcgacct tacagctgcc gaggtggaaa agttaagcg catcatcagt caactccaag	7380
gtttgaccac tgaacaggct ttaactgct agccgctagc ggcttgacc getgtggcgg	7440
cggcggtta gttgttactg aaacggcggg aaaaattgta agataccaca gcagaacttt	7500
caccttgggc ctttggacc taaaagtcgc tttctagggt gaggtgaaga gatcaactga	7560
gcagggccac gcgtttgtg caaacctatg ttctgggtgt gtattgatga gacctcacc	7620
accgtccctt gttgacgtt ttctgaaacc cggacttgac acaacaccg gcattcaacc	7680
ggggcatggg gccgggaata tgggcgtgga cggttccatt tgggattttg aaaccgcacc	7740
cacaaaggca gagctcaggt tgtccaggca aataatcaa gcatgtgaag tcaggcgcgg	7800

ggatgccccg aacctccaac tcccttaca gctctgtcca gttagggggg atcctgagcg 7860

gcataaaggc cgccttatca ataccagggt tggagatttg ccttacaaga ctctcaaga 7920

caccaagtcc gcaatccacg cggcttgttg cctgcacccc aacggggctc cgtgtctga 7980

tggtaaatcc acattaggca ccactcttca acacggtttc gagctttatg tccctactgt 8040

gccctatagt gtcatggagt accttgattc acgccctgac acccccttta tgtgtaccaa 8100

acatggtacc cccgaggtcg ctgcagagga ccttcgaaaa tatgacttat ccaccaagg 8160

gtttgtcctg cctggggctc tacgtctagt acgcagattc atctttggcc atattggtaa 8220

ggcaccgcca ctgttctcc catcaactta tcccgccaag aactctatgg cagggatcaa 8280

tggccagagg ttccaacaa aagacgttca gagcatacct gaaattgatg aaatgtgtgc 8340

ccgcgtgtc aaagagaatt ggcaactgt gacgccttg accctcaaaa aacagtattg 8400

ttccaagcct aaaaccagga ccatccttgg taccaacaac ttcattgcct tggctcacag 8460

gtcggcactc agcgggtgca ctcaggcgtt catgaaaaa gcctggaagt cccgatcgc 8520

cttggggaaa acaaaattta aggagttgca ctgcactgtc gccggtaggt gcctcgaggc 8580

cgacttggcc tcttgtgac gcagcaccgc ggccatcgtg aggtggtttg ttgccaacct 8640

cctgtacgaa ctgcggggtt gtgaagagta ctgccaagc tatgtgtca attgttgcca 8700

tgacctggtg gcaacgcaaa atggcgctt caaaaacgt ggtggcctgt catctggaga 8760

ccccgttacc agtgtgtcca acacagtgt ttcactggtg atttatgtc agcacatggt 8820

gctgtcggtt ttgaagatgg gtcatgaaat cggcctcaag ttcctcgagg aacagcttaa 8880

gttcaggac ctctcga aa tccagcctat gtgtgtatat tctgatgacc ttgtattgta 8940

tgtgaaaga cccaccttc ccaattacca ttggtgggtt gagcaccttg acctgatgct 9000

gggttttaag acagaccaa aaaagactgt cataactgac aaaccagct ttcttggtg 9060

tagaatcgaa gcggggcgac aactgggttc cagtcgcgac cgcattcttg ctgctcttgc 9120

atatcacatg aaggcgaga acgcctcaga gtattatgcg tctgctgccg cgattctgat 9180

ggactcgtgt gcttgcatg accacgatcc tgagtgtat gaggacctca tctcgggcat 9240

tgtcgtatgc gcccgccagg atggctacag ttcccaggc ccgctgttct tcatgtccat 9300

gtgggagaag ctgaaaagtc acaatgaagg caagaaattc cgccactgtg gcatttgtga 9360

cgccaaggcc gatcatgct cgcctgtgg gcttgattta tgtctgttcc actcgactt 9420

tcatcaacac tgcctgtta ctctgagctg cgccatcat gccggttcaa aagaatgccc 9480

acagtgtcag tcacctgtg gagctggtaa atccccctt gatgcagtgc tgaaacaaat 9540

cccgtacaaa cccctcgtc ctgtcatcat gaaggtggac aataaaacaa cgacccttga	9600
cccggaagg tatcagtcct gtcgaggtct tgttgcgtc aagaggggta ttgcaggcaa	9660
tgaggttgat ctgcgtgatg gagactatca ggtggtgccc cttttgcaa cctgcaaaga	9720
cataaacatg gtgaaggtgg ctgtcaatgt gctactcagc aagttcatag tggggccgcc	9780
aggttccggc aagacgacct ggctactgag tcaagttcag gatgatgatg tcattctatac	9840
acctacccat cagaccatgt tcgacatagt caatgccctc aaagtctgta ggtattccat	9900
cccagttggct tcagggctcc ctttcccacc gcccgcaga tctggaccgt gggttaggct	9960
cgttgctagc gggcacatcc ctggccgaat atcatacctt gacgaggccg gatattgcaa	10020
tcattctggat attctcagac tgctttctaa gacacctctt gtgtgtttgg gtgaccttca	10080
gcaacttcac cctgtcggct ttgactctta ctgttatgtt ttgatcaca tgcctcataa	10140
gcagctgacc actatttata gatttggccc caatatctgt tctgccattc aaccttgta	10200
cagggaaaaa ctgaatcta aggccaggaa cactaggggtg gttttactg cccggcccgt	10260
ggcttttggc caggtgttga cgccatatca taaagaccgc accggctcag ctataacct	10320
agattcatcc cagggagcca cttttgatgt tgtgacgtg catttgccgt cgccagattc	10380
cctgaacaaa tcccgggctc ttgtagctat cactcgggca aggcattgggt tgttcatcta	10440
tgacctcat aaccaactcc ggaagttttt caacttaaca cctgagcgca ctgattgcaa	10500
cctcgtgttc aaccgcgggg acgagtttgt agttttgaat gcagataatg cagtccagac	10560
tgtggctaag gtcttgagg cgggcccgtc tcggtttcga gtatcagatc caagtgcaa	10620
gtctctttta gccgcttct cggccagtct ggaaggaggc tgcatgccac tgccgcaagt	10680
ggcacataat ctggggtttt acttctctcc agatagtcca gcatttgac ctctgcaaaa	10740
agagctggca ccacattggc cggttgttac tagtcagaac aaccaggcat ggcccgaccg	10800
acttgtcgt agtatgcggc cagttgatgc ccgtacagc aagcctatgg tcggtgcagg	10860
glatgtggtt gggccatcca ctttcttgg cactcctggt gtggtgtcat actatctcac	10920
gctgtacatc aggggtgagc cccaggcctt gccggagaca ctgctctcaa cgggacgtat	10980
agctactgat tgtcgagagt atctcgacgc agctgaggaa gaagcagcta aagaactccc	11040
tcacgcattc attggcgatg tcaaaggtag tacagtgggg ggggtgcacc acattacgtc	11100
aaaatacctt cccaggtcct tgcccaggga ctccgttgcc gtggtcggag tgagttcgcc	11160
cggcaaggct gccaaagccg tgtgtactct caccgatgtg tatcttccc agctccggcc	11220
atatttgcaa ccggaacag catcgaaatg ctggaaactt aaactagact tcagggatgt	11280
cagactgatg gtctggaag gagccaccgc atatttccaa ctggaggggc tcacatggtc	11340
agcgctgccc gactatgcca ggttcattca gctacaaaa gatgccgttg tgtacattga	11400

tccgtgcata ggaccggcaa cagccaaccg taaggttgtg agaactacag attggcgagc	11460
tgacctggca gtgacacctg acgactacgg tgctcagagc attttgacta cagcctgggt	11520
cgaggacctt gggccgcagt ggaagatttt aggggttgcaa cccttcaagc gggcatttgg	11580
ctttgaaaac actgaggatt gggcgatcct tgcacgtcgc atgaacgacg gcaaggacta	11640
cactgactat aactggaatt gtgttcgaca acgcccacat gccatctacg gacgtgcccc	11700
tgaccatacg tatcactttg cccctggcac tgaactgcaa gtagagctag gtaaacctcg	11760
gctaccgcct gagcaaglac cgtgaatcta gagtgatgca atggggtcac tgtggagtaa	11820
aatcagtcaa ctgttcgtgg atgccttcac tgagttcctt gttagtgtgg ttgatattgt	11880
catcttcctt gccatactgt ttgggttcac cgttcgaggg tggttactgg tctttttct	11940
cagagtgggt tgctccgcgc ttctccgttc gcgtctgcc attcactctt ccgaactatc	12000
gaaggtccta tgagggttg ctacctaatt gcagaccgga tgttcacaa ttcgcattca	12060
agcacccatt ggglatgttt tggcacatgc gagtttccca cttaattgac gaaatggtct	12120
ctcgccgcct ttatcagacc atggaacatt caggtcaagc ggcttgaag caggtggtta	12180
gtgaagctac tctcacaaga ctgtcaaagc tcgacatagt tctccacttc caacacctgg	12240
ccgcaataga ggcggattct tgccgcttcc tcagctcacg acttgtgatg ctgaaaaatc	12300
ttgtctgttg caatatgagc ctacagtaca acaccacgtt ggaccgcgtt gagctcatct	12360
tcccaacacc aggtacgagg cccaaattga ccgattttag acaatggctc gtcagtgtgc	12420
acgttctat ttttctct gtggcctcat cagttacctt gttcatagtg ctttggcttc	12480
gaattccagc tctacgtat gtttttgggt tccattggcc cacggcaaca catcattcga	12540
gctaaccatc aattactcta tatgtaagcc ctgtctcacc agtcaagcgg ctcgacaaag	12600
gctcgaacc ggtcgaaca tgtgttgcaa aatagggcac accacgtgtg aggagcgtga	12660
ccatgatgag ttgtcaatga ccattccgtc cgggtacgat aacctcaaac ttgagggtta	12720
ttacgcttgg ctggcttttt tgtccttttc ttacgcagcc caatttcac cagagtgtgt	12780
cggaataggg aatgtgtcac gcgtcttcgt ggataaacgg caccagttca tctgtgccga	12840
gcacgacgga caaaattcaa ccgtatccac cgaacataat atttccgcat tgtatgcggc	12900
glactaccac caccaggtag acgggggcaa ttggttccac ctggaatggc tgcggccttt	12960
cttttctec tggttagtac tcaatatttc atggtttctg aggcgttcgc ctgcaagccc	13020
tgtttctcga cgcatttacc agatattgag accaacacga ccgcggctgc cggtttcatg	13080
gtccttcagg acatcaactg tttccacagt ggctcagagg cacaacgac tgggtccatc	13140
agaaagtct cccaatgccg tgaagccgtc ggcaactccc agtacatcaa gataacggcc	13200
aatctgaccg acgaatcata cttgtacaac gcggacttgc tgatgctttc tgcgtgcctt	13260

ttctacgcct cagagatgag cgagaaaggc tttaaagtca tttttgggaa tgtctctggc	13320
gttgtctccg ctgtgtcaaa ttttacagat tatgtggccc atctgacca acataccag	13380
cagcatcatt tggtaaccaa tcacattcgg ttgctacatt tctgacacc atcagcgatg	13440
agggtgggcta caaccattgc ttgtttgttc gccattctct tggcgatatg agatgttctc	13500
acaaatcggg gtgtttcttg actccgcaact ctgctttttg gtggtttttt ttgctgtgta	13560
ccggcttgte ctggtccttt gccgatggca acggcgacag ctcgacatac caatatatat	13620
ataacttgac gatatgcgag ctgaatggga ccgaatggct gtctgacat tttaatggg	13680
cagtcgagac ttttgtgctc taccagtgg cgactcatat cctctcactg ggtttcctca	13740
cgacaagtca tticcttgat gcgttcggtc ttggagctgt gtcaattaca gggttttgtg	13800
gcgggcggtg cgtgctcagc agcgtgtacg gcgcttgctc actagcagcg ctcgtatgtt	13860
ttgttatccg tgctgccaaa aattgtatgg ctggccgcta tgctcgtacc cggttttacca	13920
acttcattgt ggatgaccgg gggagaatcc atcgggtggag gtctccaata gtggtggaaa	13980
aattaggtaa agctgacgtc ggccgacgacc ttgtcaccat caaacatgtc atcctcgaag	14040
gagtcaaagc tcaaccttg acgaggactt cggccgagca atgggaggcc tagataattt	14100
ctgcaacgat cccaccgccg caaaaagct tgtgctagcc tttagcatca cgtatacacc	14160
catcatgata tacgccctta aggtgtcacg cgcccgactc ttggggttgt tgcacatctt	14220
gatatttctg aactgttctt tcacgttcgg atacatgaca tataatgcatt ttgaatccac	14280
caaccgtgct gcgtttacca tggggggcgt tgcgccctt ctgtggggcg tttatagttt	14340
catagagtca tggaagttaa tcacttccag atgcagattg tgttgcctag gccggcgata	14400
cattctggcc cctgcccacc acgtagaaag tgctgcaggc ctccatccga tcccagcgtc	14460
tggtaaccaa gcatacgtg tgagaaagcc cggactaaca tcagtgaacg gcactctggt	14520
accaggactt cgaggcctcg tgctgggcgg caaacgagct gttaaacgag gagtggttaa	14580
cctcgtcaag tatggccggt aaaaaccaga gccagaagaa aaagaaaaat ccagctccaa	14640
tggggaatgg ccagtcagtc aatcaactgt gccagctgct gggcacaatg ataaagtccc	14700
agcggcagcg acccagggga ggacaggcta aaaagaaaaa gcctgagaag ccacatttcc	14760
ccctggctgc tgaagatgac gtccggcacc atctaccca gaccgagcgc tccctttgct	14820
tgcaatcgat ccagacggct tttaatcaag gcgcaggaac tgcgtcgtt tcatccagcg	14880
ggaagatcgg ttttcaggtt gagtttatgc taccggttgc tcatacagtg cgcctgattc	14940
gcgtgacttc tacatccgcc ggtcaggatg caaattaatt tgatagtcag gtgaatggcc	15000

gcgattggcg tgggcctct gagtcacctt ttcaattagg gcgatcacat gggggtcaga 15060
 ctttaattagg caggaaccat gtgaccgaaa tt 15092
 <210> 6
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide primer
 <400> 6
 gcaccacctc acccagac 18
 <210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide primer
 <400> 7
 cagttcctgc gccttgat 18
 <210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> oligonucleotide primer
 <400> 8
 cctctgcttg caatcgatcc agac 24