

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480010453.7

[51] Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 15/33 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 5 月 24 日

[11] 公开号 CN 1777448A

[22] 申请日 2004.5.6

[21] 申请号 200480010453.7

[30] 优先权

[32] 2003.5.6 [33] US [31] 10/429,735

[86] 国际申请 PCT/US2004/013937 2004.5.6

[87] 国际公布 WO2004/100877 英 2004.11.25

[85] 进入国家阶段日期 2005.10.18

[71] 申请人 施怀哲股份有限公司

地址 美国加州

[72] 发明人 郭村勇

[74] 专利代理机构 北京申翔知识产权代理有限公司
代理人 周春发

权利要求书 4 页 说明书 19 页 序列表 18 页

[54] 发明名称

疫苗增进因子(VAF)可改善禽用疫苗的效能

[57] 摘要

本发明提供了一个疫苗增进因子(VAF)，这个疫苗增进因子是一种适用于蛋内接种的核苷酸免疫刺激物。VAF 可以是一个或多个不同的 DNA 构筑分子，每一个构筑分子包含了一个 DNA 分子和载体，每一个 DNA 分子包含了一个或多个基因或基因片段，这些基因或基因片段可以分别编码出禽类病毒具抗原性的多生肽。VAF 的使用时机最好是在受精后第 17-19 天(以鸡为例)，注入部位是位于鸡胚的羊膜腔内。VAF 可以和一般病毒性疫苗合并使用，不管是单价或多价，还是活毒或死毒。另外，VAF 可以使用在一般病毒疫苗的使用之前，这些病毒疫苗通常是在雏鸡孵化时或孵化后，而 VAF 可以刺激并且增进该病毒性疫苗的免疫效用。

1、一种用于蛋内注射的疫苗增进因子，包括：一或更多 DNA 构筑分子，每个 DNA 构筑分子包含了一个 DNA 分子和载体，每一个 DNA 分子包含了最少一个基因或基因片段，这些基因或基因片段可以分别编码出禽类病毒具抗原性的多胜肽，因此疫苗增进因子，可刺激该病毒疫苗的免疫保护效果。

2、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子，这个疫苗增进因子，包含一个 DNA 构筑物，所谓 DNA 构筑物中的 DNA 分子包含了一个基因或基因片段。

3、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子，这个疫苗增进因子，包含一个 DNA 构筑物，所谓 DNA 构筑物中的 DNA 分子包含了超过一个基因或基因片段。

4、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子，这个疫苗增进因子，包含超过一个 DNA 构筑物，所谓 DNA 构筑物中的 DNA 分子包含了一个基因或基因片段。

5、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子，这个疫苗增进因子，包含超过一个 DNA 构筑物，所谓 DNA 构筑物中的 DNA 分子包含了一个或二个或二个以上的基因或基因片段。

6、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子，该禽类病毒是选自马立克病病毒(MDV)、传染性华氏囊病病毒(IBDV)、新城鸡瘟病毒(NDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、禽脑脊髓炎病毒(AEV)、禽白血病病毒(ALV)、禽痘病毒(FPV)、禽副黏病毒(APV)、鸭肝炎病毒(DHV)、和出血性肠炎病毒(HEV)所构成的群组之中。

7、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子，其中该载体为一质体或一病毒载体。

8、如权利要求 7 所述的疫苗增进因子，其中该质体是选自 pcDNA3、pVAX1、pSectag、pTracer、pDisplay、pUC 系统质体与 pGEM 系统质体所构成的群组之中。

9、如权利要求 8 所述的疫苗增进因子，其中该质体包括一激活子，该激活子是选自 CMV 激活子、SV40 激活子、RSV 激活子和 β -肌动蛋白激活子所构成的群组之中。

10、如权利要求 7 所述的疫苗增进因子，其中该病毒载体包括但不限于，噬菌体、SV40、腺病毒、多瘤病毒(polyoma)、杆状病毒、疱疹病毒(HVT)或痘病毒(例如禽痘病毒)所构成的群组之中。

11、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子，其中该 DNA 分子为具有 SEQ ID NO:1 的 DNA 序列的整个马立克病病毒(MDV) gB 基因或其片段。

12、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子，其中该 DNA 分子为具有 SEQ ID NO:2 的 DNA 序列的整个传染性华氏囊病病毒(IBDV) VP2 基因或其片段。

13、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子，其中该 DNA 分子为具有 SEQ ID NO:3 中自第 6321 至 8319 碱基对的 DNA 序列的整个新城鸡瘟病毒(NDV) HN 基因或其片段。

14、如权利要求 2 所述的疫苗增进因子，其中该 DNA 分子为具有 SEQ ID NO:4 的 DNA 序列的整个传染性支气管炎病毒(IBV) S1 基因或其片段。

15、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子，其中该 DNA 分子为具有 SEQ ID NO:5 的 DNA 序列的整个传染性喉气管炎病毒(ILTV)糖蛋白 G 基因或其片段。

16、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子，其中该 DNA 分子为整个禽类脑脊髓炎病毒(AEV) VP1、VP0、或 VP3 基因或其片段；其中该 VP1 基因具有 SEQ ID NO:6 的 DNA 序列；该 VP0 基因具有 SEQ ID NO:7 的 DNA 序列；且该 VP3 基因具有 SEQ ID NO:8 的 DNA 序列。

17、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子，其中该 DNA 分子为具有 SEQ ID NO:9 的 DNA 序列的整个禽类副流感病毒(APV)副糖蛋白 G 基因或其片段。

18、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子，其中该 DNA 分子为具

有 SEQ ID NO:10 的 DNA 序列的整个出血性肠炎病毒(HEV)A 型五角体基(penton base)基因或其片段。

19、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子, 其中该 DNA 分子为与具有 SEQ ID NO:11 的 DNA 序列的整个禽痘病毒(FPV)鞘膜抗原基因或其片段。

20、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子, 所谓的疫苗增进因子是注射入禽类的胚蛋之中。

21、如权利要求 20 所述的疫苗增进因子, 所谓的疫苗增进因子是注射入胚蛋的羊膜腔内。

22、如权利要求 20 所述的疫苗增进因子, 所谓的疫苗增进因子可和病毒疫苗同时注射胚蛋。

23、如权利要求 20 所述的疫苗增进因子, 所谓的疫苗增进因子可在病毒疫苗使用前注射胚蛋。

24、如权利要求 16 所述的疫苗增进因子, 其中该胚蛋是经受精约 17-19 天。

25、如权利要求 1 所述的疫苗增进因子, 所谓病毒疫苗可以是禽类减毒的活毒疫苗, 不活化疫苗或基因重组的 DNA 疫苗所构成的群组之中。

26、如权利要求 23 所述的疫苗增进因子, 所谓病毒疫苗可以是使用于禽类孵化时以及孵化后。

27、如权利要求 26 所述的疫苗增进因子, 于禽类病毒性疫苗的使用, 可使用建议剂量的 5 分之 1。

28、如权利要求 20 所述的疫苗增进因子, 其中该禽类是选自鸡、火鸡、鸭和鹅所构成的群组之中。

29、针对禽类病毒性感染的免疫方法, 包括根据如权利要求 1 所述的疫苗增进因子以有效剂量与病毒疫苗合并使用, 注入胚蛋中的羊膜腔内。

30、如权利要求 29 所述的方法, 其中该胚蛋是经受精约 17-19 天。

31、针对禽类病毒性感染的免疫方法，包括如权利要求1所述的疫苗增进因子以有效剂量注入受精约17-19天的胚蛋羊膜腔内，并于孵化后进行病毒疫苗免疫的方法。

疫苗增进因子（VAF）可改善禽用疫苗的效能

技术领域

本发明疫苗增进因子（VACCINE ACCELERATOR FACTOR, VAF）是指禽用蛋内注射时，所添加于疫苗内的核酸分子，这些核酸分子可以是一种/或多种经过构筑的DNA分子，而每个分子则可含有一个/或多个基因或基因片段，这些基因片段可以在生物体内转录及转译成禽类病毒的抗原分子。这些VAF最好的应用时机，是在禽类受精卵孵化第17至19天时，以注射方式进入羊膜腔内，VAF可同时与禽用单价/或多价的活毒/或死毒疫苗共同使用。

背景技术

疫苗注射对家畜禽及宠物的健康维护有极大的效益，其中家禽的疫苗有各种不同的施打路径。例如：雏鸡孵化后以喷雾的方式免疫早已广泛使用，当然此法也可应用于大量施打成鸡的注射方式，活毒疫苗除了上述的投与方式之外尚有传统的方式，如皮下注射（SC）雏鸡点眼、点鼻的方式，甚至是饮水的方式也非常普遍。这些方式虽然施打方式较简便，但鸡只接种的成效不一。

近年来以蛋内接种的方式已有美国EMBREX公司所开发的INOVOJECT®系统已上市并广泛使用，第一台蛋内注射机由美国EMBREX所开发并于80年代末期取得专利（USP号码5056464，5699751）美国白肉鸡以目前蛋内接种疫苗方式施打，马立克疫苗已经占了8成以上并已证实安全又有效，同时世界各地以蛋内注射鸡传染性华氏囊炎和新城鸡瘟疫苗的数量也逐年增加之中。

蛋内注射疫苗的细节请参阅Sharma等人的美国专利（US.Pat.No.4458630）特别是当马立克活毒疫苗打入孵化18.5日的受精蛋时，疫苗活毒被注入羊膜腔中，并在胚中增殖，并可诱发保护性

抗体（参阅 Sharma(1985), Avian Disease. 29, 1155, 1167-1168）。

目前全世界的禽用疫苗市场除了马立克之外（MDV），尚有传染性华氏囊炎病毒（IBDV），新城鸡瘟病毒（NDV），传染性支气管炎病毒（IBV），传染性喉头气管炎病毒（ILTV），鸡脑脊髓炎病毒（AEV），鸡传染性贫血因子病毒（CAV），鸡痘病毒（FPV），禽流感病毒（AIV），里奥病毒，鸡白血病毒（ALV），网状内皮炎病毒（REV），禽腺病毒和出血性肠胃炎病毒（HEV）等等。这些传染病常因重大疫情爆发造成巨大的损失，其中MDV, IBDV, NDV和IBV这些重要病毒则因其本质而特别重要。马立克病(MD)是一个恶性的淋巴球增殖异常疾病，只有禽类可自然感染。病原马立克病毒是疱疹病毒（herpesvirus）的一员，该病可严重影响全世界的家禽事业，特别是企业化经营的密饲大场更不可轻忽，马立克的症状广泛，包括神经系统、生殖器官、体内各脏器以及眼睛和皮肤等处发生病变。临床上可见，神经症状及因肿瘤而造成的脏器功能受损以及营养不良等。鸡只6周龄就可被感染，本病好发于12-24周龄。本病无治疗的方法，只能由饲养管理、隔离病原的方式或育种筛选较具抵抗力的种鸡以及疫苗接种等策略，然而以饲养管理要杜绝此病成本太高，筛选抗病鸡的成效不佳，因此，只有疫苗是防治马立克的唯一途径。

传染性华氏囊炎病毒是攻击雏鸡，并可导致免疫抑制的恶性传染病。（参阅 Kibenge(1988), J. Gen. Virol, 69: 1757-1775）强毒株可导致严重的免疫抑制并对鸡只的华氏囊及脾脏产生伤害，使得鸡只对其他病原的感受性提高以及对疫苗注射的成效不佳。

IBDV是属于双RNA病毒科（Birnaviridae），其基因体含有二段双股RNA，（Dobos, et al.(1979), J. Virol 32: 593-605）其中小一点的片段B（大约2.8kb）可编码为VP1，基因的位置可转译出RNA聚合酶素。大一点的片段A（大约3kb）可编码出一个110KDa大小的前驱蛋白物，这个单一的开放阅读架（ORF）将来可以形成成熟的VP2 和VP3 及VP4蛋白（参阅 Azad, et. al, (1985), Virology, 143: 35-44)以及一个未知大小的17KDa的功能小蛋白VP5（参阅 Kibenge et al (1991), J. Gen.

Viol., 71:569-577)其中VP2和VP3是最重要的结构蛋白,特别是VP2是可以诱发中和抗体的主要抗原。(参阅 Becht et al. (1988) J. Gen. Virol., 69:631-640; Fahey et al. (1989), J. Gen. Virol., 70:1473-1481)

VP3则被视为具有群组特异性的抗原,因为抗VP3的单株抗体可以同时认识血清1型和血清2型的VP3。(参阅 Becht et al. (1988), J. Gen. Virol., 69:631-640)至于VP4,则是表现出切割酶,其功能和病毒前身蛋白的成熟过程相关。(参阅 Jagadish et al. (1988), J. Virol., 62:1084-1087)

在过去,防治IBD的方式不外乎以减毒株的活毒疫苗施打雏鸡或以死毒(或活毒)疫苗施打母鸡,使母鸡具有高力价移形抗体以保护雏鸡。但近年来,在美国陆续发生在已经免疫过活毒疫苗的鸡场中分离到IBD的强毒株的现象,使得活毒疫苗效果受到很大的质疑(参阅 Snyder et al. (1988), Avian Dis., 32:535-539; Van der Marel et al. (1990), Dtsch. Tierarztl. Wschr., 97:81-83)

过去针对IBD开发次单位疫苗的部份也已经有许多成果(参阅 Azad et al (1985)"Virology",143:35-44)其中将IBD VP2基因选殖入酵母菌并加以表现以及以鸡痘病毒为载体,构筑重组的鸡痘病毒皆有报告(参阅 Macreadie et al.(1990),Vaccine, 8: 549-552)。若鸡只以酵母表现的VP2进行免疫注射,其诱发的抗血清可以保护IBDV的攻击,但若以重组的鸡痘病毒加以免疫(参阅 Bayliss et al. (1991), Arch. Virol., 120:193-205),则可降低强毒株攻击的死亡率,但是强毒株对华氏囊所造成的伤害则无法避免。

新城鸡瘟病毒(NDV)是具有封套、线型、单股、无片段的负股RNA病毒。一般而言,负股RNA病毒且具有封套,大列可分为无片段型(如副黏液病毒 paramyxovirus和弹状病毒Rhabdovirus)及有片段型(如正黏液病毒orthomyxovirus,布尼亚病毒和砂粒病毒等等)。至于新城鸡瘟病毒,则和副流感病毒、仙台病毒、猴子第5型病毒以及腮腺炎病毒都是属于副黏液病毒科。

新城鸡瘟病毒的结构包含了一层源自细胞膜的双层脂质所构成

的封套以及自封套延伸出去的糖蛋白-血凝素神经胺酶(HN)。这个蛋白质同时具有血凝和神经胺酶的活性。另一个重要的蛋白质—融合蛋白(F)则是与病毒套膜结合在一起蛋白质，其转译之初是呈不活化状态，必须经过转译后的切割才构成由双硫键结合的两个多肽。被致活的F蛋白和新城鸡瘟病毒穿透入细胞有关，因其藉由和宿主细胞膜与病毒封套的融合而进行。

另一个则是间质蛋白质(M)，这个蛋白质和病毒的组装有关，同时连结核鞘蛋白(NP)和病毒封套。新城鸡瘟病毒的核鞘蛋白(NP)是呈现螺旋对称，同时和磷蛋白(P)以及RNA聚合酶(L)相互连结。磷蛋白的主要功用是调节转录作用，以及参予甲基化作用以聚腺甘酸作用(poly A denylation)。至于L基因则是表现出RNA聚合酶，这个酵素和P蛋白共同参与了RNA的合成。而这个蛋白质是病毒的蛋白质中最大的，其基因占了几乎一半的病毒基因组，也在病毒的转录及转译过程扮演重要的角色，

所有的负股RNA病毒包含NDV，其复制的过程都必须先将负股的基因体先转录成正股，否则无法转译出病毒蛋白，因此，一旦进入细胞这个病毒并无法先制造出必要的RNA聚合酶，此时L.P和NP蛋白必须先随着负股基因组一起进入细胞，不管是负股(病毒股)的RNA或正股的RNA都是由核鞘蛋白帮助包装起来。唯一没被包装起来的RNA是病毒mRNA。NDV病毒RNA是在细胞质进行复制，也是转录的地方，因此病毒在胞质进行复制及病毒颗粒组装，最后以出芽的方式(Budding)释放出去。

在美国专利第542779号之中Ahamad等人曾经以胚蛋白注射NDV，但由于所有的胚蛋对NDV都非常敏感而导致死亡，因此，必须把NDV以化合物EMS(ethyl methane sulfonate)加以处理过才不具胚致死性，但是EMS本身却是一种致突变剂，因此不能拿来作为常规的使用。

传染性支气管炎病毒(IBV)是属于冠状病毒科，这个病毒是单股、正股RNA，大小约20kb，病毒颗粒大小约80-100nm，外观上有一个

大约20nm的突出物(称为棘突, spike), IBV是导致急性高传染性的疾病, 同时可引起呼吸生殖和泌尿道的病变, 且不限鸡龄大小。IBV病毒包含了三个结构蛋白, 棘突(S)糖蛋白, 膜蛋白和核鞘蛋白。由于棘突蛋白自病毒的脂层向外突出时, 其最外面的形状呈现泪滴样, 目前的证据指出, 该蛋白质是病毒具有高免疫性的蛋白质, 这方面的证据除了源自其它的冠状病毒的研究结果之外, 也有抗体中和试验的证据。(参阅 D.Cavanagh et al. (1984), Avian Pathology, 13, 573-583)

棘突蛋白包含了二个次单元, S1(90KDa)和S2(84Kda), 当糖蛋白S1和S2结合在一起时, 由酵素先行去除掉寡糖类, 最后分子量大约为125KDa。其中S2部分是和病毒套膜接触的部位。IBV普遍散布于密室的大养鸡场, 4周龄的幼鸡感受性最强, 一旦感染病毒后, 二次细菌感染会使得患禽的感染率和死亡率皆高。

此外, 受IBV感染的鸡只也会导致产蛋率下降或产生薄壳、变形、粗糙、软壳等不良的蛋导致严重的经济损失。

胚蛋注射活毒疫苗的好处包括快速(每小时打40000颗蛋)、有效(每颗蛋100%有注射疫苗)、省工(每个孵化场一年可节省10万美元)。近年来Embrex公司已经开发出一个病毒性活毒疫苗称为VNF®(Viral Neutralizing Factor)。这个VNF疫苗包含了一种针对特定病毒的抗体。这个抗体和活毒疫苗有个特定的比率同时存在, 使其先形成病毒-抗体的疫苗复合物(immune complex)。

由于抗体的数量不大, 因此不会造成把病毒完全中和掉或针对该病毒产生了被动免疫的效能。此外, 由于抗体的添加使得活毒在胚蛋内复制的时程晚了几天。

这样延迟病毒在鸡胚中复制的结果, 使得活毒疫苗在胚蛋中使用更显安全。此外, 不但可以克服移行抗体干扰; 同时所产生的免疫效能高于传统的减毒疫苗。因此, 病毒-抗体复合物疫苗技术不管施行于胚蛋注射或幼鸡免疫, 其施行后所产生的免疫力较为一致, 疫苗也安全且有效。

本发明的疫苗增进因子(VAF)是一段具免疫刺激能力的核酸片

段, 这样的DNA片段在使用上特别适合于禽类疫苗的使用。这样的疫苗增进因子不但可以和一般商用疫苗同时使用, 也可以分开使用。而疫苗增进因子的内容物可以是包含了单一的基因片段, 也可以是包含了多段基因连结一起的单一核酸分子, 或多个分子使用前混合一起使用。

这些所谓的基因片段通常是指一些将来可以编码成病毒抗原蛋白的基因片段, 这些抗原将来可以在禽类体内诱发出体液免疫和细胞性免疫。因此, 在使用上可以在胚蛋内注射适量的VAF即可达到效果。虽然本发明的VAF可以和Embrex公司VNF产品具有相同的优点, (例如较传统疫苗较为安全及有效)但是和VNF使用抗体的方式截然不同。

更重要的是VAF可以促进免疫反应, 其中包括抗体的生成细胞分泌, 所伴随的T细胞活化以及毒杀型T细胞的致活等等。然而VNF不过是延迟正常疫苗在体内的复制而已。本发明的VAF将会使疫苗使用者在使用一般活毒疫苗时, 具有更快速的免疫反应, 而产制更高量的抗体。同时, VAF的使用也不会受到移行抗体的干扰。因此, 总结来说, VAF不仅可以促进雏鸡孵化前的免疫能力, 更可以长时期的增进鸡只健康并使成本降低。企业化养鸡一直是食物的重要来源, 因此, 把VAF的技术配合适当的免疫策略, 将可有效降低因疾病感染而造成的损失。

发明内容

本发明疫苗增进因子(VAF)是一种核酸片段或任何含有 DNA 分子的免疫刺激物可以进行胚蛋注射。VAF 是一个或多个经过构筑的 DNA 分子, 每个 DNA 构筑物包含了一个载体和外源性 DNA, 而外源性 DNA 部份则最少包含一个(或以上)的禽类病毒的抗原性基因。

VAF 可藉由所包含的基因或 DNA 片段而协助刺激以及增加禽类使用病毒性疫苗后, 快速增进产生免疫保护效用。共有四种型态的 VAF, 第一种是包含了一个外源性 DNA 片段, 这个片段是禽类病毒

的一个抗原性基因。这一种型态的 VAF 会针对相同的禽类病毒所使用的疫苗产生增进及加强作用。第二种也是单一的 DNA 构筑分子,但不同的是这个构筑物内的病毒抗原基因片段有两个(或以上),简言之,这个构筑分子本身是具有"多价"效用的 VAF。这个 VAF 分子虽然只有一个载体分子,但由于其包含的病毒抗原基因有二段以上,因此,其所增进免疫效果的病毒疫苗也可以达到二种以上。第三种 VAF 是多重 DNA VAF,这种型态的 VAF,本身具有二种以上的不同 DNA 构筑分子,每个 DNA 构筑分子是由一个载体包含一段病毒抗原基因,因此这种多重 DNA VAF 因为含有多个构筑分子,因此可以增进多种禽类病毒的免疫效果,因此也是具有"多价"效用。

第四种 VAF 称为多重多价的 VAF,这种 VAF 是前面第二及第三种 VAF 的综合体,即这种 VAF 本身具有多个不同的 DNA 构筑分子,而每个构筑分子又包含了多个病毒的抗原基因,因此,多重多价 VAF 最少可以增进三种以上不同禽类病毒性疫苗的免疫效果。多种型态的病毒性疫苗(不限于活毒、死毒或基因重组型)可以结合 VAF 的使用,这些疫苗可以同时或阶段性的和 VAF 一起使用,如果胚蛋注射 VAF 之后,后续的传统商用疫苗只要施 5 分之 1 剂量,就可以达到良好的效果,至于这个 VAF 构筑分子中的载体部份为一质体(plasmid)或一病毒载体。质体的例子包括,但是不限于,pcDNA3、pVAX1、pSectag、pTracer、pDisplay、pUC 系统质体(例如 pUC7、pUC8、pUC18)、与 pGEM 系统质体。或者,也可以使用含有一激活子(promoter)例如 CMV 激活子、SV40 激活子、RSV 激活子、和 β -肌动蛋白激活子等的任何质体来制备 DNA 构筑物。例如质体 pcDNA3。较佳的病毒载体为选自杆状病毒、疱疹病毒、和痘病毒所构成的群组之中。

禽类病毒的例子包括,但不限于,马立克病病毒(MDV)、传染性华氏囊病病毒(IBDV)、新城鸡瘟病毒(NDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、禽类脑脊髓炎病毒(AEV)、禽类白血病病毒(ALV)、禽痘病毒(FPV)、禽类副黏病毒(APV)、鸭肝炎病毒(DHV)和出血性肠炎病毒(HEV)。

特别适合用来诱导保护性免疫反应以对抗上面所述禽类病毒疾病的 DNA 分子包括,但不限于,具有 SEQ ID NO:1 的 DNA 序列的整个马立克病病毒(MDV) gB 基因或其片段;具有 SEQ ID NO:2 的 DNA 序列的整个传染性华氏囊病病毒(IBDV) VP2 基因或其片段;具有 SEQ ID NO:3 的 DNA 序列(其系自第 6321 至第 8319 碱基对)的整个新城鸡瘟病毒(NDV) HN 基因或其片段(亦即 SEQ ID NO:3 为新城鸡瘟病毒的整个基因组);具有 SEQ ID NO:4 的 DNA 序列的整个传染性支气管炎病毒(IBV) S1 基因或其片段;具有 SEQ ID NO:5 的 DNA 序列的整个传染性喉气管炎病毒(ILTV)糖蛋白 G 基因或其片段;整个禽类脑脊髓炎病毒(AEV) VP1、VP0、或 VP3 基因或其片段(VP1 基因具有 SEQ ID NO:6 的 DNA 序列;VP0 基因具有 SEQ ID NO:7 的 DNA 序列;且 VP3 基因具有 SEQ ID NO:8 的 DNA 序列);具有 SEQ ID NO:9 的 DNA 序列的整个禽类副流感病毒(APV)副糖蛋白 G 基因或其片段;具有 SEQ ID NO:10 的 DNA 序列的整个出血性肠炎病毒(HEV)A 型五角体基(penton base)基因或其片段;与具有 SEQ ID NO:11 的 DNA 序列的整个禽痘病毒(FPV)鞘膜抗原基因或其片段。

VAF 注射于禽蛋内较佳,尤其是于禽卵羊膜腔之内。该卵较佳者是经受精约 17-19 天。较佳的禽类包括鸡、火鸡、鸭和鹅。

本发明也提供一种接种疫苗于禽卵的方法。该接种疫苗于禽卵的方法包括于禽蛋内注射上述 VAF。该制备该 VAF 的方法包括将一 DNA 分子黏接(ligating)到一质体或病毒载体以形成一 DNA 构筑物;及接着将该二或更多个该 DNA 构筑物混合形成 VAF。将 DNA 分子插入于载体内的步骤可以用常用方法来达成,也就是,经由在基因和适合的载体都用相同的限制酶予以酶切以藉此产生互补的 DNA 末端之时,使用酵素例如 T4 DNA 黏接酶(ligase)黏接 DNA 分子。对于 pcDNA3,常用的限制酶为 BamH1 和 EcoR1。

具体实施方式

传统禽类疫苗包括经化学不活化的病毒疫苗或经修改的活病毒

疫苗。不活化疫苗需要加添的免疫化处理，如此不仅制造起来昂贵且执行起来繁琐。再者，某些传染性病毒粒子可能在不活化程序后存活，且可能在施打到动物后引发疾病。

整体而言，经减毒的活病毒疫苗比经不活化的疫苗较适当，因为其可在诱发时通常同时以体液和细胞两种反应为基底的免疫反应。此等疫苗通常是经由将毒性病毒株连续通到组织培养中为基础。不过，减毒程序会诱导病毒基因组的突变，产生有关毒性和免疫性质互相异质的一族群病毒粒子。此外，熟知的，传统经减毒的活病毒疫苗可能回复毒性，而导致所接种的动物的疾病爆发，并有可能将病原散布到其它动物上。

鸡只孵化后的免疫计划包含了在不同时程施打不同的疫苗，期间从一日龄到 65 周龄都有。其中有许多疫苗必须重复施打，其原因有些是基于疫苗免疫活性的不同，有些则是在不同的阶段以不同的路径施打。

然而，正如同施打于雏动物一般，蛋内接种的疫苗种毒虽然已经被驯化为更加不具毒性以及更安全，但却也失去了具有快速刺激宿主产生保护性免疫反应的能力。这个问题通常和雏动物体内具有移行抗体有关，移行抗体会干扰高减毒株疫苗种毒在体内的复制。因此，越是彻底减毒的病毒株，在移行抗体存在之下，常有一些个体发生无法刺激免疫反应导致免疫无效的情事。

养鸡事业者都明白，鸡群普遍存在高量移行抗体的事实，也因为移行抗体的干扰，因此必须在雏鸡出后的几周内施打多次的疫苗。正常情况之下，在孵化后所使用的疫苗是高减毒株，孵化后两周到三周的鸡只是使用中等减毒株，这种方式的用意是希望在鸡只接触到病原之前的所有个体，最少有一次的免疫时间点是正确的。以这种方式进行免疫计划在养鸡事业已经施行多年，但是大家普遍认为还是会有一定比例的鸡只并没有合宜的受到免疫保护。特别是假如第二剂的免疫施打时机不对，特定鸡群中的移行抗体尚在、或是第二次免疫的投与或施打过程不确实或不一致时。

因此,使用 VAF 去刺激及增强疫苗的免疫效能对养鸡事业有极大的帮助,特别是将 VAF 施打于受精第 17-19 天的受精蛋。由于 VAF 包含了最少一个或一段可以在受精蛋内表现的禽类病毒的基因或 DNA 片段,因此,在受精蛋内注入 VAF 将会诱发针对禽类病毒的初级免疫。

同时,在使用 VAF 时,可以在一般疫苗使用前使用,也可以同时和一般禽类病毒并用,都会增进该病毒疫苗的免疫效能。特别是假若有合并使用 VAF 再加以免疫,其使用的疫苗剂量,可以减低至传统剂量的五分之一,就可以达到相同的免疫成效。更重要的,假如使用 VAF,会缩短达成免疫效果的时间。

此外,有一些大家熟知的商用病毒性疫苗,如传染性支气管炎病毒和新城鸡瘟病毒疫苗,并不适用于胚蛋注射。其原因是传染性支气管炎病毒容易对鸡胚造成伤害,而,新城鸡瘟病毒疫苗则仅仅适用于肌肉注射。若使用针对该病的 VAF 分子在进行病毒疫苗注射,将会增进效能进而达到全面性的预防。

为了制备 VAF 的目的,各基因的 DNA 序列不需要含有编码该多肽链的 DNA 所具的全长。在大部分情况中,只要撷取抗原决定部位区的基因片段应该就足够供免疫反应所用。抗原决定部位区的 DNA 序列,可以经由将其它病毒株的对应部份予以定序且互相比较而找出。但是主要的抗原决定部位可能为显示出最大异质性(heterology)的区块。此外,这些抗原决定部位区也可能由于蛋白质的构形结构不同而不同。一个或多个抗原决定部位的基因片段可以经由化学合成或重组 DNA 技术予以制备。于需要时,此等基因片段可以键联在一起或联结到其它 DNA 分子。

此外,病毒基因不一定是 DNA。事实上,某些常见的禽类病毒疾病是由双股或单股 RNA 病毒所引起的。例如,马立克病病毒(MDV)为一种双股 DNA 病毒,而传染性华氏囊病病毒(IBDV)、新城鸡瘟病毒(NDV)和传染性支气管炎病毒(IBV)都是 RNA 病毒。不过, RNA 病毒序列可以使用反转录聚合酶连锁反应(RT-PCR)技术反转录到

DNA 内，接着以常用的重组 DNA 技术将其加到载体之内。

此外，因为遗传密码的转译多元性，可能会有许多 RNA 和 DNA 序列不同但是会转译为相同的氨基酸序列。因此，可表现出具有抗体结合特性的一多肽链的所有 RNA 和 DNA 序列都为本发明所涵盖。

要构成一个重组的 VAF 分子，不论单价或多价者，均可将病毒基因的 DNA 序列黏接到于自然界中不相关或联结的其它 DNA 分子。视需要可将一病毒基因的 DNA 序列黏接另一 DNA 分子，即一载体，该载体含有其编码融合蛋白质序列，例如 β -半乳糖苷酶之 DNA，产生所谓的重组核酸分子或 DNA 构筑物，其可用来转殖到适当的宿主。此种载体较佳的是衍生自，例如，质体或存在于噬菌体、黏接质体或病毒中的核酸序列。

可以用来选殖根据本发明的核酸序列的特定载体都是技艺中已知的且包括质体或病毒载体。质体的例子包括，但不限于，pBR322、pcDNA3、pVAX1、pSectag、pTracer、pDisplay、pUC 系统质体(例如 pUC7、pUC8、pUC18)、pGEM 系统质体、Bluescript 质体或有包括 CMV 激活子、SV40 激活子、RSV 激活子、和 β -肌动蛋白激活子等的任何其它质体。例如质体 pcDNA3。病毒载体的例子包括，但不限于，噬菌体(例如， λ 和 M13-衍生的噬菌体)、SV40、腺病毒、多瘤病毒(polyoma)、杆状病毒、疱疹病毒(HVT)或痘病毒(例如禽痘病毒)。

构成一重组核酸分子所用的方法都是谙于此技者所知悉的。例如，核酸序列在一选殖载体中的插入，可以在基因和适合的选殖载体都用相同的限制酶予以酶切，以藉此产生互补的 DNA 末端时，经由使用酵素例如 T4 DNA 聚合酶黏接而容易地达成。

或者，可能需要改变限制酶切部位来产生钝端(blunt end)，可经由酶切单股 DNA 或经由使用恰当的 DNA 聚合酶填满隐性末端而达成。随后，可以使用酵素例如 T4 DNA 黏接酶进行钝端黏接。于需要时，可以经由将黏接臂黏接到 DNA 末端之上而产生任何限制酶切部位。此等黏接臂可包括编码限制酶切部位序列的特定寡核苷酸序列。经限制酶酶切过的载体和核酸序列也可经由均聚物加尾

(homopolymeric tailing)予以改变。

本发明共有四种型态的 VAF, 第一种 VAF 是包含了单一个 DNA 构筑分子(又称为单价 VAF), 这个构筑分子包含了一段 DNA 分子片段和载体分子, DNA 分子片段可以是禽类病毒的一个抗原性基因或一部分片段, 将来可编码出抗原多肽, 将来可诱发出保护性免疫效果。这一种型态的 VAF 会针对相同的禽类病毒所使用的疫苗产生增进及加强作用。第二种 VAF 则是包含了数个(两个或更多)的单价 VAF, 即每个 VAF 携带了不同的 DNA 分子, 可对抗不同的病毒。

第三种 VAF, 则是单一的 DNA 构筑分子, 但不同的是这个构筑物内的病毒抗原基因片段有两个(或以上)并连接在一起, 简而言之, 这个构筑分子本身是具有"多价"效用的 VAF(或称之多价的重组 VAF)。这些基因或基因片段可经由一个质体分子或病毒所携带。这个多价的重组 VAF 因为可以编码出两种或两种以上的抗原多肽, 因此可以提供最少两种以上病毒的保护作用。这些禽类病毒的例子包括, 但不限于, 马立克病病毒(MDV)、传染性华氏囊病病毒(IBDV)、新城鸡瘟病毒(NDV)和传染性支气管炎病毒(IBV)。由于这些基因或基因片段是正确的塞入载体同时符合氨基酸编码的阅读价, 因此都可以正确的在宿主内表达出来。

不同的结构 DNA 分子被载体所携带时, 可以是分别具有基因的终点序列和起始序列, 如此则蛋白质是被分开表现, 或者是他们可以是同一个开放阅读架的一部分, 如此则被表现的蛋白是以融合蛋白的形式呈现。第四种 VAF 则是将单价的 VAF 和多价 VAF 混合后一起使用。

这些基因片段可以源自下列, 但是不限为这些, 的病毒: 马立克病病毒(MDV)、传染性华氏囊病病毒(IBDV)、新城鸡瘟病毒(NDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、禽脑脊髓炎病毒(AEV)、禽痘病毒(FPV)、禽流感病毒(AIV)、禽白血病病毒(ALV)、鸭肝炎病毒 B 基因和出血性肠炎病毒(HEV), 并插入在一商业上可取得的质体。

较佳的 DNA 序列包括,但不限于,具有 SEQ ID NO:1 的 DNA 序列的整个马立克病病毒(MDV) gB 基因或其片段;具有 SEQ ID NO:2 的 DNA 序列的整个传染性华氏囊病病毒(IBDV) VP2 基因或其片段;具有 SEQ ID NO:3 的 DNA 序列的整个新城鸡瘟病毒(NDV) HN 基因或其片段;具有 SEQ ID NO:4 的 DNA 序列的整个传染性支气管炎病毒(IBV) S1 基因或其片段。

编码马立克病病毒的 gB 多肽链的 DNA 序列具有 SEQ ID NO:1 的核酸序列。该 DNA 序列包含 3650 个碱基对的线型 DNA。

编码传染性华氏囊病病毒的 VP2 多肽链的 DNA 序列具有 SEQ ID NO:1 的核酸序列。该 DNA 序列包含 3004 碱基对的线型 DNA 分子,其是由传染性华氏囊病病毒的 RNA 模板反转录而来。

整个新城鸡瘟病毒基因组的 DNA 序列包含 15186 碱基对的 DNA 其中(1)第 56 至 1792 碱基对是编码 NP 多肽链,其为一核壳体蛋白;(2)第 1804-3244 碱基对是编码 P 多肽链,其为一磷蛋白;(3)第 3256-4487 碱基对是编码 M 多肽链,其为一基质蛋白;(4)第 4498-6279 碱基对是编码 F 多肽链,其为一融合蛋白质;(5)第 6321-8319 碱基对是编码 HN 多肽链,其为血球凝集素神经胺酸酶;(6)第 8370-15073 碱基对是编码 L 多肽链,其为一大的聚合酶蛋白质。新城鸡瘟病毒基因组具有 SEQ ID NO:3 的 DNA 序列。

S1 多肽链的 DNA 序列含有如 SEQ ID NO:4 所示 1611 个碱基对线型 DNA 序列,其是从传染性支气管炎病毒的 RNA 模板反转录而得。

VAF 下面的实验设计为示范说明,而不用来限制本发明的范围。其中可做出合理的变异,例如合理技术操作所发生的,不违离本发明的范围。

I. 材料与方法

(A) 病毒与疫苗

禽类传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性华氏囊病(IBD)和新城鸡瘟病(ND)疫苗都购自 Intervet Inc.。

(B) 病毒 RNA 分离与反转录聚合酶连锁反应(RT-PCR)

将 200 微升回收的减毒疫苗(Intervet Inc.)于冰冷的 GTC 缓冲液(4 M 异硫氰酸胍, 25 mM 柠檬酸钠, pH 7.0, 0.5% Sarkosyl, 0.1 M 巯基乙醇)和醋酸钠(pH 4)之中再溶解。加入等体积的苯酚-氯仿(1: 1)于震荡之后静置于冰上 15 分钟。于离心之后收集水层且使用等体积的异丙醇沉淀出 RNA。在 4℃ 下以 12,000 rpm 离心 20 分钟将沉淀的 RNA 分离出, 然后悬浮在经焦碳酸二乙酯(DEPC)处理过的去离子水之内且贮存在-70℃。

(C) 寡核苷酸

反转录聚合酶连锁反应所用的寡核苷酸引子(primer)都是购自 Promega, 且都是分别针对禽类传染性支气管炎病毒(Beaudette CK 株)、新城鸡瘟病毒(Lasota 株)和禽类传染性华氏囊病病毒的基因组而设计。PCR 所用的各引子的序列为:

IBS1F' 5' CGGGATCCGCCGCCCGCCATGTTGGTAACACCTCTT 3'; (SEQ ID NO:12)

IBS1R' 5' CGGAATTCTTAACGTCTAAAACGACGTGT 3'; (SEQ ID NO:13)

NDF F' 5' CGGGATCCGCCGCCCGCCATGGGCTCCAGACCTTCTACC 3'; (SEQ ID NO:14)

NDF R' 5' CCGCTCGAGTTACATTTTTGTAGTGGCTCTCATT 3'; (SEQ ID NO:15)

NDHN F' 5' CGGGATCCGCCGCCCGCCATGGACCGCGCCGTTAGGCAAG 3'; (SEQ ID NO:16)

NDHN R' 5' GCTCTAGATTACTCAACTAGCCAGACCTG 3'; (SEQ ID NO:17)

IBDVP2F' 5' CGGGATCCGCCGCCCGCCATGACAAACCTGCAAGAT 3'; (SEQ ID NO:18)

IBDVP2R' 5' CGGAATTCTTACCTTATGGCCCGGATTAT 3'; (SEQ ID NO:19)

(D) 反转录聚合酶连锁反应(RT-PCR)

传染性支气管炎病毒、新城鸡瘟病和传染性华氏囊病病毒的 RNA 的反转录是在 42℃ 于 2.5 倍 Taq 缓冲液(200 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl, pH 7.4, 15 mM MgCl₂, 15 mM β-巯基乙醇, 和各 0.25 mM 的 dATP、dCTP、dGTP, 和 dTTP)中进行 30 分钟。除了 Taq 缓冲液之外, 反应混合物(40 微升)也含有病毒 RNA, 2.4 U 的禽类骨髓母细胞瘤病毒(AMV)反转录酶(Promega), 16 U 的 RNasin (Promega), 和 0.01 奈莫耳(nmol)的反向引子(IBDVP2R、NDF F、NDHN F 或 IBS1R)。反应混合物的最后体积为 40 微升。于反转录之后, 于反转

录混合物中加入下列药剂：0.02 奈莫耳的各核苷三磷酸(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)，0.01 奈莫耳的前向引子(IBDVP2F、NDF R、NDHN R 或 IBS1F)和 1.5 U 的 Taq DNA 聚合酶(Stratagene)。然后加水到 100 微升的最后体积。反应是在一温度循环器 (Perkin Elmer-Cetus)内进行 32 个循环。每一 PCR 循环包括在 94℃下变性(denaturation) 1 分钟，在 57℃下炼合(annealing) 1 分钟，与在 72℃下 DNA 链延长(elongation)2 分钟。

(E) DNA 的构筑

使用分别得自传染性华氏囊病毒疫苗、传染性支气管炎病毒疫苗和新城鸡瘟病毒疫苗的 VP2、S1、NDF 和 NDHN 等基因构成质体 pCMV-VP2、pCMV-S、pCMV-NDF 和 pCMV-NDHN，放置于市售质体 pcDNA3(Invitrogen, U.S.A.)的下游处。使用限制酶 BamH1、EcoR1、XbaI 和 XhoI 将所有的基因插入到 pcDNA3 载体之内(引子序列中底下划线的字母)。在 pcDNA3 载体内的所有基因的序列都经由在两方向定序予以验证。

(F) DNA 的制备和 DNA 的施打

经由亲和层析法(Qiagen. Inc.)纯化出的质体 DNA 的定量是以波长为 260 和 280 奈米的分光光度计测量。将各 100 微克分量的 DNA 悬浮在 100 微升 PBS 中(0.14 M 氯化钠，10 mM 磷酸钠，pH 7.4)。对于 DNA 传递，是使用含有 20 号 1 又 1/2 吋针头的 1 cc 注射筒。对于蛋内注射组，是从每一蛋的钝端用针头穿透气室将 0.1 毫升的 DNA 疫苗(100 微克)注射到胚胎内(取自鸡窝盘 18 天大的受精且发育中的卵)。然后将该卵转移到孵化场，且放在该处直到在约 21 天大时孵化为止。对于 IM (肌肉内)组，所有疫苗(1/5 剂量的活疫苗)是在孵化后 10 天注射到鸡的胸肉内。

II. 实验设计

将无特定病原(SPF)受精蛋(n = 60)随机分成 12 组。所有组的所有

蛋(一组 5 颗蛋)都分别给予 100 微升体积的试剂。于 A 组的每一颗蛋注射 100 微克 pCMV-NDF + 100 微克 pCMV-NDHN 混合物, 于 B 组的每一颗蛋注射 100 微克 pCMV-S1, 于 C 组的每一颗蛋注射 100 微克 pCMV-VP2, 于 D 组的每一颗蛋注射 100 微克 pCMV-NDF + 100 微克 pCMV-NDHN + 100 微克 pCMV-S1 (ND + IB), 于 E 组的每一颗蛋注射 100 微克 pCMV-NDF + 100 微克 pCMV-NDHN + 100 微克 pCMV-VP2 (ND + IBD), 于 F 组的每一颗蛋注射 100 微克 pCMV-VP2 + 100 微克 pCMV-VP2 混合物(IB + IBD), 于 G 组的每一颗蛋注射 100 微克 pCMV-NDF + 100 微克 pCMV-NDHN + 100 微克 pCMV-S1 + 100 微克 pCMV-VP2 (ND + IB + IBD), 于作为对照组的 H 组的每一颗蛋注射 1 剂量的市售蛋内 IBD 疫苗(Embrex, Inc), 于 I、J、K 和 L 组的每一颗蛋注射 100 微升的 PBS。于此实验中的所有鸡都是在孵化后 10 天时于鸡的胸肉内注射 100 微升体积的疫苗(1/5 剂量的活疫苗)。A 和 I 组中的鸡是注射 NDV 疫苗, B 和 J 组是注射 IBV 疫苗, C 和 K 组是注射 IBDV 疫苗, D 组是注射 NDV + IB 疫苗混合物, E 组是注射 NDV + IBD 疫苗混合物, F 组是注射 IB + IBD 疫苗混合物, 且 G 和 L 组是注射 NDV、IB 和 IBD 疫苗混合物。

III. 人工胚蛋注射的操作步骤

胚蛋注射的方式可以用自动注射器进行 (如 Embrex Inovoject®system) 或人工施打进行。人工胚蛋注射的操作步骤如下

1. 以烛光挑选并抛弃未受精蛋、受污染蛋、颠倒蛋以及脏污的受精蛋, 以避免胚蛋注射时受到细菌污染。

2. 将含有气室的一端以稀释的漂白水加以消毒(以蒸馏水将漂白水10倍稀释, 使次氯酸的最终浓度为0.5%)最好是使用前才新鲜配置消毒水, 以棉花球沾湿消毒水, 将受精蛋含有气室的一端进行涂抹消毒, 碘酊可以做为消毒剂的替代品, 蛋消毒能力不及次氯酸水, 但是假若胚蛋都很干净, 则不一定要用漂白水。

3.当受精蛋顶端表面干了之后(大约5分钟), 蛋体的表面(特别是顶端)喷洒70%异丙醇, 待其再次风干之后, 以1吋半长的18号针头, 在气室顶端正中央挖一个洞, 其挖掘的深度以4分之1吋至2分之1吋为限, 深度的控制可藉由在距离该针头尖端的适当位置, 以橡胶物做为阻挡, 以避免因为挖掘过深而伤害到胚胎。这个小洞是用以注射疫苗或VAF之用, 注射时必须保持针的方向要垂直刺入及拔出, 不能有任何角度的倾斜, 必须照此操作才不会伤害鸡胚, 以利正常孵化。

4.注射VAF时, 最好使用1ml的小针筒, 针头的使用必须以20号、一时长的针头为限, 若是注射多价或多重多价VAF, 必须注意混合各DNA分子时, 保持无菌操作。VAF是否保持无菌状态, 可以将0.5ml VAF样品注入一般惯用的细菌培养皿, 如血液培养皿或胰豆蛋白培养皿, 并加以培养, 以确认其呈无菌状态。

5.若以胚蛋注射一般商用活毒疫苗, 则必须施打0.1ml, 但若与VAF合用, 则可以用少量(可减少到20微升)的疫苗就可达到相同的免疫功效。

IV. 血清学检测

于孵化后 10 天(同时注射低剂量活疫苗)、17 天、24 天和 31 天收集所有血清样品。抗体效价的检测是使用购自 IDEXX Laboratories, Inc.的 IBV、IBDV 和 NDV 抗体检验套组以 ELISA 检测。所有样品都以二重复检测。于检定之前使用样品稀释剂将检验样品稀释 500 倍 (1: 500)。根据套组的手册施以检验程序。为了使检测正确, 测量且记录在波长 650 奈米的吸光值, $A(650)$ 。未知样中的相对抗体含量是经由计算样品对阳性样(S/P)比例而测定出的。终点效价是使用公式: $\text{Log}_{10} \text{效价} = 1.09(\text{Log}_{10} \text{S/P}) + 3.36$ 计算出。

V. 结果

如表 1 中所示, 结果证实, 对于抗传染性华氏囊病抗体的检测, 传染性华氏囊病毒重组抗原 VP2 VP2 DNA construct (ie., a single,

monovalent DNA construct-containing VAF)在原发刺激后可被表现且作用。在一低剂量疫苗追加之后效价迅速增加。在孵化 17 天之后(即, IM 注射后 7 天), C、E、F 和 G 等组的效价明显地高于 K 和 L 组的效价。最重要的是, 传染性华氏囊病毒抗原的表现不会受其它单价 DNA 疫苗(新城鸡瘟病毒和传染性支气管炎病毒)所干扰。对于传染性支气管炎和新城鸡瘟病毒 DNA 疫苗也有相同的结果。孵化后 17 天, B、D、F 和 G 等组的效价都高于 J 和 L 组的效价(表 2)且孵化后 17 天, A、D、E 和 G 等组的效价都高于 I 和 L 组的效价(表 3)。唯一未预料到的结果为抗新城鸡瘟病毒效价不能用三价 DNA 疫苗予以高度诱导出(表 3, G 组), 不过抗传染性华氏囊病和抗传染性支气管炎则都可以(表 1 和 2, G 组)。

表 1

用 IDEXX 传染性华氏囊病抗体检验套组检测的血清样品(抗体效价是对应于平均效价±SD)				
免疫化和样品采集时间表(天)				
动物组别	10 天 PH*	17 天 PH	24 天 PH	31 天 PH
C(IBD)	---**	4535±1267	16623±3105	21254±3852
E(IBD+ND)	---	1685±655	17339±2185	19041±2967
F(IBD+IB)	---	8252±2205	10057±1295	17561±2006
G(IBD+IB+ND)	---	9111±1701	13127±1763	16694±2134
H(IBD 阳性)	6635±851	13025±2131	18015±1592	18853±2614
K(PBS/IBD)	---	---	1853±302	17002±2965
L(PBS/IBD+IB+ND)	---	---	6923±1168	18063±2531

*PH: 孵化后

**---: 低于 396 的平均效价(可视为 IDEXX 套组的阴性者)

表 2

用 IDEXX 传染性支气管炎抗体检验套组检测的血清样品(抗体效价是对应于平均效价±SD)				
免疫化和样品采集时间表(天)				
动物组别	10 天 PH*	17 天 PH	24 天 PH	31 天 PH
B(IB)	---**	441±117	2426±264	3214±877
D(IB+ND)	---	586±182	805±221	1988±501

F(IB+IBD)	---	509±89	685±186	1192±237
G(IBD+IB+ND)	---	499±81	688±78	2551±531
J(PBS/IB)	---	---	485±76	1662±441
L(PBS/IBD+IB+ND)	---	---	819±202	1332±488

*PH: 孵化后

**---: 低于 396 的平均效价(可视为 IDEXX 套组的阴性者)

表 3

用 IDEXX 新城鸡瘟病抗体检验套组检测的血清样品(抗体效价是对应于平均效价±SD) 免疫化和样品采集时间表(天)				
动物组别	10 天 PH*	17 天 PH	24 天 PH	31 天 PH
A(ND)	---**	466±101	2394±456	8103±2198
D(ND + IB)	---	706±140	1778±378	6811±2206
E(ND+IBD)	---	517±104	3021±411	5991±1695
G(IBD+IB+ND)	---	---	---	783±201
I(PBS/ND)	---	---	1853±324	3912±304
L(PBS/IBD+IB+ND)	---	---	4027±662	5807±1996

*PH: 孵化后

**---: 低于 396 的平均效价(可视为 IDEXX 套组的阴性者)

本发明以实际例子进行具体论述,但必须了解本发明的涵盖范围非以该项实例为限,相对的,是包括了所述各个技术层面的修饰。因此,专利的权利范围倾向于广泛的解释,并包括了各种修饰。

<110> KUO, Tsun Yuang
 <120> VACCINE ACCELERATOR FACTOR (VAF) FOR IMPROVEMENT OF VACCINATIONS IN POULTRY
 <130> 39734-186920
 <160> 19
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 3650
 <212> DNA
 <213> Marek's disease virus
 <400> 1

```

tcgagctcgc cggggatggt tagtcacgat agacatcggt tcgccagcc gtcgaataca    60
gcattatatt ttagtggtga aaatgtaggg ctgcttcctc acttaaagga ggaaatggct   120
cgattcatgt ttcatagcag tagaaaaaca gattggaccg tcagtaagtt tagagggttt   180
tatgacttta gcactataga taatgtaact gcggcccatc gcatggcttg gaaatatatc   240
aaagaactga tttttgcaac agctttatct tcttctgtat ttaaattgtg cgaattgcac   300
atctgtcgtg ccgacagttt gcagatcaac agcaatggag actatgtatg gaaaaatgga   360
atatatataa catatgaaac cgaatatcca cttataatga ttctggggtc agaatacaagc   420
acttcagaaa cgcaaaatat gactgcaatt attgatacag atgttttttc gttgctttat   480
tctatcttgc agtatatggc ccccgttacg gcagatcagg tgcgagtaga acagattacc   540
aacagccacg ccccatctg acccgcccaa tattctgtg tccctgcatt ttatctcaca   600
caatttatga acagcatcat taagatcatc tcactatgca ctattttagg cggaattgca   660
tttttttcct tatagttatt ctatatggta cgaactcatc tccgagtacc caaaatgtga   720
catcaagaga agttgtttcg agcgtccagt tgtctgagga agagtctacg ttttatcttt   780
gtcccccacc agtgggttca accgtgatcc gtctagaacc gccgcgaaaa tgtcccgaac   840
ctagaaaagc caccgagtgg ggtgaaggaa tcgcgatatt atttaaagag aatatcagtc   900
catataaatt taaagtgcag ctttattata aaaatatcat tcagacgacg acatggacgg   960
ggacgacata tagacagatc actaatcgat atacagatag gacgcccgtt tccattgaag  1020
agatcacgga tctaatacgac ggcaaaggaa gatgctcatc taaagcaaga taccttagaa  1080
acaatgtata tggtgaagcg tttgacaggg atgcgggaga aaaacaagta cttctaaaac  1140
catcaaaatt caacacgccc gaatctaggg catggcacac gactaatgag acgtataaccg  1200
tgtggggatc accatggata tatcgaacgg gaacctccgt caattgtata gtagaggaaa  1260
tggatgcccg ctctgtgttt ccgtattcat attttgcaat ggccaatggc gacatcgcca  1320
acatatctcc attttatggt ctatccccac cagaggctgc cgcagaacct atgggatatc  1380
cccaggataa tttcaaacia ctagatagct atttttcaat ggatttggac aagcgtcgaa  1440
aagcaagcct tccagtcaag cgtaactttc tcatcacatc aacttcaca gttgggtggg  1500
actgggctcc aaaaactact cgtgtatggt caatgactaa gtggaaagag gtgactgaaa  1560
tgttgctgct aacagttaat gggagataca gatttatggc ccgtgaactt tcggcaacgt  1620
ttatcagtaa tacgactgag tttgatccaa atcgcatcat attaggacaa tgtattaaac  1680

```

```

gcgaggcaga agcagcaatc gagcagatat ttaggacaaa atataatgac agtcacgtca 1740
aggttggaaca tgtacaatat ttcttggctc tcgggggatt tattgtagca tatcagcctg 1800
ttctatccaa atccctggct catatgtacc tcagagaatt gatgagagac aacaggaccg 1860
atgagatgct cgacctggta aacaataagc atgcaattta taagaaaaat gctacctcat 1920
tgtcacgatt gcggcgagat attcgaaatg caccaaatag aaaaataaca ttagacgaca 1980
ccacagctat taaatcgaca tcgtctgttc aattcgccat gctccaattt ctttatgata 2040
atatacaaac ccatattaat gatatgttta gtaggattgc cacagcttgg tgcgaattgc 2100
agaatagaga acttggttta tggcacgaag ggataaagat taatcctagc gctacagcga 2160
gtgcaacatt aggaaggaga gtggctgcaa agatgttggg ggatgtcgct gctgtatcga 2220
gctgcactgc tatagatgcg gaatccgtca ctttgcaaaa ttctatgcga gttatcacat 2280
ccactaatac atgttatagc cgaccattgg ttctattttc atatggagaa aaccaaggaa 2340
acatacaggg acaactcggg gaaaacaacg agttgcttcc aacgctagag gctgtagagc 2400
catgctcggc taatcatcgt agatattttc tgtttggatc cggttatgct ttatttgaaa 2460
actataatth tgttaagatg gtagacgctg ccgatataca gattgctagc acatttgtcg 2520
agcttaatct aaccctgcta gaagatcggg aaatthtgcc tttatccgtt tacacaaaag 2580
aagagttgctg tgatgttggt gtattggatt atgcagaagt agctcgccgc aatcaactac 2640
atgaacttaa atthtatgac ataaacaaag taatagaagt ggatacaaat tacgcgttta 2700
tgaacggtth ggccgaattg tthaacggta tgggtcaggt agggcaagct ataggcaaaag 2760
ttgtagtagg ggctgcgggt gcaatcgtat ctaccatata tgggtgtctt gctttcatgt 2820
caatccctth ggggctthtc gcaatcgtt taatcattat agcaggactc gtggctgcat 2880
thtttagcata tcgttatgta aacaagctta aaagcaatcc aatgaaagcc cthttatccta 2940
tgacaacaga agtgcttaag gcacaggcaa cgctgagtt gcatggcgag gaatcagatg 3000
atthggaacg aacatctatt gatgaaagaa aattagaaga agctagagaa atgataaaat 3060
atatggcgth agtctccgct gaagaacgcc acgagaaaaa actgcggaga aagaggcgag 3120
gcactaccgc cgttctatcg gaccacctgg caaaaatgag gattaaaaat agtaacccta 3180
aatatgataa gttacctact acatattcag actcagaaga tgatgctgtg taagtgggca 3240
ctattatatt tgaactgaat aaaacgcata gagcatgata tggthtactc atthattgctg 3300
agatataaag catattcaat acgatataat gcgaacgtga tgctaaaaac atagctccct 3360
gtattattga tgcgccatca thtgattaat aaatacatcg acgcccgcct cactggtgctg 3420
gtgtatacca gctacggcgc tagcattcat ggtatcccgt gattgctcga tgctthcctt 3480
ctgaattccg tcggaacgct cctgagagat ggtcgcagtt attggtacat ttcgaccagc 3540
ctccgcatct gaaactggca caggaatgca ccgtggaatt ggtagaagtt thtccttccg 3600
tggaaggcat agggcgthtc actcccatgg gccatgaaac tgtgggatgt 3650

```

<210> 2

<211> 3004

<212> DNA

<213> infectious bursal disease virus (IBDV)

<400> 2

tgatgccaac	aaccggaccg	gcgtccattc	cggacgacac	cctggagaag	cacactctca	60
ggtcagagac	ctcgacctac	aatttgactg	tgggggacac	agggtcaggg	ctaattgtct	120
ttttccctgg	attccctggc	tcaattgtgg	gtgctcacta	cacactgcag	agcaatggga	180
actacaagtt	cgatcagatg	ctcctgactg	cccagaacct	accggccagt	tacaactact	240
gcaggctagt	gagtcggagt	ctcacagtga	ggtcaagcac	acttcctggt	ggcgtttatg	300
cactaaacgg	caccataaac	gccgtgacct	tccaaggaag	cctgagtga	ctgacagatg	360
ttagctacaa	tgggttgatg	tctgcaacag	ccaacatcaa	cgacaaaatt	gggaacgtcc	420
tagtagggga	aggggtcacc	gtcctcagct	taccacatc	atatgatctt	gggtatgtga	480
ggcttggtga	ccccattccc	gcaatagggc	ttgacccaaa	aatggtagcc	acatgtgaca	540
gcagtgcag	gccagagtc	tacaccataa	ctgcagccga	tgattaccaa	ttctcatcac	600
agtaccaacc	aggtggggta	acaatcacac	tgttctcagc	caacattgat	gccatcacia	660
gcctcagcgt	tgggggagag	ctcgtgtttc	gaacaagcgt	ccacggcctt	gtactgggcg	720
ccaccatcta	cctcataggc	tttgatggga	caacggtaat	caccagggct	gtggccgcaa	780
acactgggct	gacgaccggc	accgacaacc	ttatgccatt	caatcttgtg	attccaacia	840
acgagataac	ccagccaatc	acatccatca	aactggagat	agtgacctcc	aaaagtgggtg	900
gtcaggcagg	ggatcagatg	ttatggctcg	caagagggag	cctagcagtg	acgatccatg	960
gtggcaacta	tccaggggcc	ctccgtcccc	tcacgctagt	ggcctacgaa	agagtggcaa	1020
caggatccgt	cgttacggtc	gctgggggtg	gcaacttcga	gctgatccca	aatcctgaac	1080
tagcaaagaa	cctggttaca	gaatacggcc	gatttgacct	aggagccatg	aactacacia	1140
aattgatact	gagtgcagag	gaccgtcttg	gcatacaagc	cgtctggcca	acaagggagt	1200
acactgactt	tcgtgaatac	ttcatggagg	tggccgacct	caactctccc	ctgaagattg	1260
caggagcatt	cggcttcaaa	gacataatcc	gggccataag	gaggatagct	gtgccgggtg	1320
tctccacatt	gttccacact	gccgtcccc	tagcccatgc	aattggggaa	ggtgtgact	1380
acctgctggg	cgatgaggca	caggctgctt	caggaaactgc	tcgagccgcg	tcaggaaaag	1440
caagagctgc	ctcaggccgc	ataaggcagc	tgactctcgc	cgccgacaag	gggtacgagg	1500
tagtcgcgaa	tctattccag	gtgccccaga	atcccgtagt	cgacgggatt	cttgcttcac	1560
ctgggggtact	ccgcgggtgca	cacaacctcg	actgcgtggt	aagagagggg	gccacgctat	1620
tccctgtggt	tattacgaca	gtggaagacg	ccatgacacc	caaagcattg	aacagcaaaa	1680
tgtttgctgt	cattgaaggc	gtgcgagaag	acctccaacc	tccatctcaa	agaggatcct	1740
tcatacgaac	tctctctgga	cacagagtct	atggatatgc	tccagatggg	gtacttccac	1800
tggagactgg	gagagactac	accgttgccc	caatagatga	tgtctgggac	gacagcatta	1860
tgctgtccaa	agatcccata	cctcctattg	tgggaaacag	tggaaatcta	gccatagctt	1920
acatggatgt	gtttcgaccc	aaagtcccaa	tccatgtggc	tatgacggga	gccctcaatg	1980
cttggtggcg	gattgagaaa	gtaagcttta	gaagcaccaa	gctcgccact	gcacaccgac	2040
ttggccttaa	gttggtggt	cccggagcat	tcgatgtaaa	caccggggcc	aactgggcaa	2100
cgttcatcaa	acgtttccct	cacaatccac	gcgactggga	caggctcccc	tacctcaacc	2160
taccatacct	tccacccaat	gcaggacgcc	agtaccacct	tgccatggct	gcatcagagt	2220
tcaaagagac	ccccgaactc	gagagtgcgc	tcagagcaat	ggaagcagca	gccaacgtgg	2280
acccactatt	ccaatctgca	ctcagtgtgt	tcagtgtggt	ggaagagaat	gggattgtga	2340
ctgacatggc	caacttcgca	ctcagcgacc	cgaacgcccc	tcggatgcga	aattttcttg	2400
caaacgcacc	acaagcaggc	agcaagtgcg	aaagggccaa	gtacgggaca	gcaggctacg	2460

```

gagtggaggc tcggggcccc acaccagagg aagcacagag ggaaaaagac acacggatct 2520
caaagaagat ggagaccatg ggcattctact ttgcaacacc agaattgggtg gactcaatg 2580
ggcaccgagg gccaaagcccc ggccagctaa agtactggca gaacacacga gaaataccgg 2640
acccaaacga ggactatcta gactacgtgc atgcagagaa gagccggttg gcatcagaag 2700
aacaatatcct aagggcagct acgtcgatct acggggctcc aggacaggca gagccacccc 2760
aagctttcat agacgaagtt gccaaagtct atgaaatcaa ccatggacgt ggcccaaacc 2820
aagaacagat gaaagatctg ctcttgactg cgatggagat gaagcatcgc aatcccaggc 2880
gggctctacc aaagcccaag ccaaaaccca atgctccaac acagagaccc cctggtcggc 2940
tgggccgctg gatcaggacc gtctctgatg aggaccttga gtgaggctcc tggaagtctc 3000
ccga 3004

```

<210> 3

<211> 15186

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus (NDV)

<400> 3

```

accaaacaga gaatccgtga gttacgataa aaggcgaagg agcaattgaa gtcgcacggg 60
tagaaggtgt gaatctcgag tgcgagcccg aagcacaaac tcgagaaagc cttctgccaa 120
catgtcttcc gtatttgatg agtacgaaca gctcctcgcg gctcagactc gcccgaatgg 180
agctcatgga gggggagaaa aaggagtagc cttaaaagta gacgtcccgg tattcactct 240
taacagtgat gaccagaag atagatggag ctttgtggta ttctgcctcc ggattgctgt 300
tagcgaagat gccacaaac cactcaggca agtgctctc atatctcttt tatgctccca 360
ctcacaggta atgaggaacc atgttgccat tgcagggaaa cagaatgaag ccacattggc 420
cgtgcttgag attgatggct ttgccaacgg cacgccccag ttcaacaata ggagtggagt 480
gtctgaagag agagcacaga gatttgcgat gatagcagga tctctccctc gggcatgcag 540
caacggaacc ccgttcgtca cagccggggc agaagatgat geaccagaag acatcaccga 600
taccctggag aggatcctct ctatccaggc tcaagtatgg gtcacagtag caaaagccat 660
gactgcgtat gagactgcag atgagtcgga aacaaggcga atcaataagt atatgcagca 720
aggcagggtc caaaagaaat acatcctcta ccccgtagtc aggagcaca tccaactcac 780
gatcagacag tctcttgtag tccgcatctt tttggttagc gagctcaaga gaggccgcaa 840
cacggcaggt ggtacctcta cttattataa cctggtaggg gacgtagact catacatcag 900
gaataccggg cttactgcat tcttcttgac actcaagtac ggaatcaaca ccaagacatc 960
agcccttgca cttagtagcc tctcaggcga catccagaag atgaagcagc tcatgcgttt 1020
gtatcggatg aaaggagata atgcgccgta catgacatta cttggtgata gtgaccagat 1080
gagctttgag cctgccgagt atgcacaact ttactccttt gccatgggtg tggcatcagt 1140
cctagataaa ggtactggga aataccaatt tgccagggac tttatgagca catcattctg 1200
gagacttgga gtagagtacg ctcaggctca ggggaagtagc attaacgagg atatggctgc 1260
cgagctaaag ctaaccccag cagcaatgaa gggcctggca gctgctgccc aacgggtctc 1320
cgacgatacc agcagcatat acatgcctac tcaacaagtc ggagtcctca ctgggcttag 1380
cgagggggggg tcccaagctc tacaaggcgg atcgaataga tcgcaagggc aaccagaagc 1440

```

```

cggggatggg gagacccaat tcttgatct gatgagagcg gtagcaaata gcatgaggga 1500
ggcgccaaac tctgcacagg gcactcccca atcggggcct cccccaactc ctggggccatc 1560
ccaagataac gacaccgact ggggggtattg atggacaaaa cccagcctgc ttccacaaaa 1620
acatcccaat gccctcaccg gtagtcgacc cctcgatttg cggtctata tgaccacacc 1680
ctcaaaaaa catccccctc tttctccct cccctgctg tacaactccg cacgccctag 1740
ataccacagg cacaatgcgg ctactaaca atcaaacag agccgaggga attagaaaaa 1800
agtacgggta gaagagggat attcagagat cagggaagt ctcccgagtc tctgctctct 1860
cctctacctg atagaccagg acaaacatgg ccacctttac agatgcagag atcgacgagc 1920
tatttgagac aagtggaaact gtcattgaca acataattac agcccagggt aaaccagcag 1980
agactgttgg aaggagtgc atcccacaag gcaagaccaa ggtgctgagc gcagcatggg 2040
agaagcatgg gagcatccag ccaccggcca gtcaagacaa ccccgatcga caggacagat 2100
ctgacaaaaa accatccaca cccgagcaaa cgaccccgca tgacagcccg ccggccacat 2160
ccgcccacca gccccccacc caggccacag acgaagccgt cgacacacag ttcaggaccg 2220
gagcaagcaa ctctctgctg ttgatgcttg acaagctcag caataaatcg tccaatgcta 2280
aaaagggccc atggctgagc cccaagagg ggaatcacca acgtccgact caacagcagg 2340
ggagtcaacc cagtcgagg aacagtcagg aaagaccgca gaaccaagtc aaggccgccc 2400
ctggaaacca gggcacagac gtgaacacag catatcatgg acaatgggag gagtcaaac 2460
tatcagctgg tgcaaccct catgctctcc gatcaaggca gagccaagac aatacccttg 2520
tatctgcgga tcatgtccag ccacctgtag actttgtgca agcgatgatg tctatgatgg 2580
aggcgatata acagagagta agtaagggtg actatcagct agatcttgtc ttgaaacaga 2640
catcctccat ccctatgatg cgtccgaaa tccaacagct gaaaacatct gttgcagtca 2700
tggaagccaa cttgggaatg atgaagattc tggatcccgg ttgtgccaac atttcatctc 2760
tgagtgatct acgggcagtt gcccgatctc acccggtttt agtttcaggc cctggagacc 2820
cctctcccta tgtgacacaa ggaggcgaaa tggcacttaa taaactttcg caaccagtgc 2880
cacatccatc tgaattgatt aaaccgcca ctgcatgagg gcctgatata ggagtggaaa 2940
aggacactgt ccgtgcattg atcatgtcac gcccaatgca cccgagttct tcagccaagc 3000
tctaagcaa gttagatgca gccgggtcga tcgaggaaat caggaaaatc aagcgccttg 3060
ctctaaatgg ctaattacta ctgccacag tagcgggtcc ctgtccactc ggcatcacac 3120
ggaatctgca ccgagttccc ccccgagac ccaagggtcca actctccaag cggcaatcct 3180
ctctcgcttc ctacgcccc ctgaatggtc gcgtaaccgt aattaatcta gctacattta 3240
agattaagaa aaaatacggg tagaattgga gtgcccgaat tgtgccaaga tggactcatc 3300
taggacaatt gggctgtact ttgattctgc ccattcttct agcaacctgt tagcatttcc 3360
gatcgtccta caaggcacag gagatgggaa gaagcaaata gccccgcaat ataggatcca 3420
gcgccttgac ttgtggactg atagtaagga ggactcagta ttcacacca cctatggatt 3480
catctttcaa gttgggaatg aagaagccac tgtcggcatg atcgatgata aaccaagcg 3540
cgagttactt tccgtcgga tgctctgct aggaagcgtc ccaaataccg gagaccttat 3600
tgagctggca agggcctgtc tcactatgat agtcacatgc aagaagagtg caactaatac 3660
tgagagaatg gttttctcag tagtgaggc accccaagtg ctgcaaagct gtagggttgt 3720
ggcaaacaaa tactcatcag tgaatgcagt caagcacgtg aaagcgccag agaagattcc 3780
cgggagtgga accctagaat acaaggtgaa ctttgtctcc ttgactgtgg taccgaagaa 3840
ggatgtctac aagatcccag ctgcagtatt gaaggtttct ggctcgagtc tgtacaatct 3900

```

tgcgctcaat	gtcactatta	atgtggaggt	agacccgagg	agtccttttg	ttaaattcttt	3960
gtctaagtct	gacagcggat	actatgctaa	cctcttcttg	catattggac	ttatgaccac	4020
cgtagatagg	aaggggaaga	aagtgacatt	tgacaagctg	gaaaagaaaa	taaggagcct	4080
tgatctatct	gtcgggctca	gtgatgtgct	cgggccttcc	gtgttggtaa	aagcaagagg	4140
tgacaggact	aagctttttg	cacctttctt	ctctagcagt	gggacagcct	gctatcccat	4200
agcaaagtct	tctcctcagg	tggccaagat	actctggagt	caaaccgcgt	gcctgcggag	4260
cgttaaaaatc	attatccaag	caggtagcca	acgcgctgtc	gcagtgaccg	ccgaccacga	4320
ggttacctct	actaagctgg	agaaggggca	caccttgcc	aaatacaatc	cttttaagaa	4380
ataagctgct	tctctgagat	tgcgctccgc	ccactcacc	agatcatcat	gacacaaaaa	4440
actaatctgt	cttgattatt	tacagttagt	ttacctgtct	atcaagttag	aaaaaacacg	4500
ggtagaagat	tctggatccc	ggttggcgcc	ctccaggtgc	aagatgggct	ccagaccttc	4560
taccaagaac	ccagcaccta	tgatgtgtac	tatccgggtt	gcgctggtac	tgagttgcat	4620
ctgtccggca	aactccattg	atggcaggcc	tcttgacagt	gcaggaattg	tggttacagg	4680
agacaaagcc	gtcaacatat	acacctcatc	ccagacagga	tcaatcatag	ttaagctcct	4740
cccgaatctg	cccaaggata	aggaggcatg	tgcgaaaagcc	cccttggtatg	catacaacag	4800
gacattgacc	acttttctca	cccccttg	tgactctatc	cgtaggatac	aagagtctgt	4860
gactacatct	ggagggggga	gacaggggag	ccttataggc	gccattattg	gcggtgtggc	4920
tcttggggtt	gcaactgccg	cacaaataac	agcgcccgca	gctctgatac	aagccaaaca	4980
aaatgctgcc	aacatcctcc	gacttaaaga	gagcattgcc	gcaaccaatg	aggctgtgca	5040
tgaggctcact	gacggattat	cgcaactagc	agtggcagtt	gggaagatgc	agcagtttgt	5100
taatgaccaa	tttaataaaa	cagctcagga	attagactgc	atcaaaattg	cacagcaagt	5160
tggtgtagag	ctcaacctgt	acctaaccga	attgactaca	gtattcggac	cacaaatcac	5220
ttcacctgct	ttaaacaagc	tgactattca	ggcactttac	aatctagctg	gtggaaatat	5280
ggattactta	ttgactaagt	taggtgtagg	gaacaatcaa	ctcagctcat	taatcggtag	5340
cggcttaatc	accggttaacc	ctattctata	cgactcacag	actcaactct	tgggtataca	5400
ggtaactcta	ccttcagtcg	ggaacctaaa	taatatgcgt	gccacctact	tggaacctt	5460
atccgtaagc	acaaccaggg	gatttgcctc	ggcacttgct	cccaaagtgg	tgacacaggt	5520
cggttctgtg	atagaagaac	ttgacacctc	atactgtata	gaaactgact	tagattttata	5580
ttgtacaaga	atagtaacgt	tccctatgtc	ccctggtatt	tattcctgct	tgagcggcaa	5640
tacgtcggcc	tgtatgtact	caaagaccga	aggcgactt	actacaccat	acatgactat	5700
caaaggttca	gtcatcgcca	actgcaagat	gacaacatgt	agatgtgtaa	acccccggg	5760
tatcatatcg	caaaactatg	gagaagccgt	gtctctaata	gataaacaat	catgcaatgt	5820
tttatcctta	ggcgggataa	ctttaaggct	cagtggggaa	ttcgatgtaa	cttatcagaa	5880
gaatatctca	atacaagatt	ctcaagtaat	aataacaggc	aatcttgata	tctcaactga	5940
gcttggaat	gtcaacaact	cgatcagtaa	tgctttgaat	aagttagagg	aaagcaacag	6000
aaaactagac	aaagtcaatg	tcaaactgac	tagcacatct	gctctcatta	cctatatcgt	6060
tttgactatc	atatctcttg	tttttggtat	acttagcctg	attctagcat	gctacctaat	6120
gtacaagcaa	aaggcgcaac	aaaagacctt	attatggctt	gggaataata	ctctagatca	6180
gatgagagcc	actacaaaaa	tgtgaacaca	gatgaggaac	gaaggtttcc	ctaatagtaa	6240
tttgtgtgaa	agtcttggtg	gtctgtcagt	tcagagagtt	aagaaaaaac	taccggttgt	6300
agatgaccaa	aggacgatat	acgggtagaa	cggtaagaga	ggccgcccct	caattgcgag	6360

```

ccaggcttca caacctccgt tctaccgctt caccgacaac agtcctcaat catggaccgc 6420
gccgttagcc aagttgctgt agagaatgat gaaagagagg caaaaaatac atggcgcttg 6480
atattccgga ttgcaatctt attcttaaca gtagtgacct tggctatatc ttagcctcc 6540
cttttatata gcatgggggc tagcacacct agcgatcttg taggcatacc gactaggatt 6600
tccagggcag aagaaaagat tacatctaca cttggttcca atcaagatgt agtagatagg 6660
atatataagc aagtggccct tgagtctccg ttggcattgt taaatactga gaccacaatt 6720
atgaacgcaa taacatctct ctcttatcag attaatggag ctgcaaacia cagtgggtgg 6780
ggggcaccta tccatgaccc agattatata ggggggatag gcaaagaact cattgtagat 6840
gatgctagtg atgtcacatc attctatccc tctgcatttc aagaacatct gaattttatc 6900
ccggcgctta ctacaggatc aggttgcaat cgaataccct ctttgacat gagtgtacc 6960
cattactgct acaccataa tgtaatttg tctggatgca gagatcactc acattcatat 7020
cagtatttag cacttggtgt gctccggaca tctgcaacag ggagggtatt cttttctact 7080
ctgcgttcca tcaacctgga cgacacccaa aatcggaagt cttgcagtgt gagtgaact 7140
cccctgggtt gtgatatgct gtgctcgaaa gtcacggaga cagaggaaga agattataac 7200
tcagctgtcc ctacgcgat ggtacatggg aggttagggg tcgacggcca gtaccacgaa 7260
aaggacctag atgtcacaac attattcggg gactgggtgg ccaactacc aggagtaggg 7320
ggtgatctt ttattgacag ccgcgtatgg ttctcagtct acggagggtt aaaaccaat 7380
tcaccagtg aactgtaca ggaagggaaa tatgtgatat acaagcgata caatgacaca 7440
tgcccagatg agcaagacta ccagattcga atggccaagt cttcgtatda gcctggacgg 7500
tttggtggga aacgcataca gcaggctatc ttatctatca aggtgtcaac atccttaggc 7560
gaagaccgg tactgactgt accgccaac acagtcacac tcatgggggc cgaaggcaga 7620
attctcacag tagggacatc tcatttcttg tatcaacgag ggtcatcata cttctctccc 7680
gcgttattat atcctatgac agtcagcaac aaaacagcca ctcttcatag tccttataca 7740
ttcaatgcct tcaactcgcc aggtagtatc ccttgccagg cttcagcaag atgccccaac 7800
tcgtgtgtta ctggagtcta tacagatcca tatcccctaa tcttctatag aaaccacacc 7860
ttgcgagggg tattcgggac aatgcttgat ggtgtacaag caagacttaa ccctgctct 7920
gcagtattcg atagcacatc ccgcagtcgc attactcgag tgagttcaag cagtacaaa 7980
gcagcataca caacatcaac ttgtttttaa gtggtcaaga ctaataagac ctattgtctc 8040
agcattgctg aaatatctaa tactctcttc ggagaattca gaatcgccc gtactagtt 8100
gagatcctca aagatgacgg ggttagagaa gccaggctct gctagttgag tcaattataa 8160
aggagttgga aagatggcat tgtatcacct atcttctgag acatcaagaa tcaaaccgaa 8220
tgccggcgcg tgctcgaatt ccatgttgcc agttgaccac aatcagccag tgctcatgag 8280
atcagattaa gccttgatc taatctcttg attaagaaaa aatgtaagtg gcaatgagat 8340
acaaggcaaa acagctcatg gtaaataata cgggtaggac atggcgagct ccggtcctga 8400
aagggcagag catcagatta tcctaccaga gccacacctg tcttcacat tggtaagca 8460
caaactactc tattactgga aattaactgg gctaccgctt cctgatgaat gtgacttga 8520
ccacctcatt ctacgccgac aatggaaaaa aatacttgaa tcggcctctc ctgatactga 8580
gagaatgata aaactcgga gggcagtaca ccaaactctt aaccacaatt ccagaataac 8640
cggagtgtct caccacggg gtttagaaca actggcta attgaggtcc cagattcaac 8700
caacaaattt cggaagattg agaagaagat ccaaattcac aacacgagat atggagaact 8760
gttcacaagg ctgtgtacgc atatagagaa gaaactgctg ggtcatctt ggtctaaca 8820

```

tgtccccgg	tcagaggagt	tcagcagcat	tcgtacggat	ccggcattct	ggtttctactc	8880
aaaatggtcc	acagccaagt	ttgcatggct	ccatataaaa	cagatccaga	ggcatctgat	8940
ggtggcagct	aagacaaggt	ctgcggccaa	caaattggtg	atgctaacc	ataaggtagg	9000
ccaagtcttt	gtcactcctg	aacttgctgt	tgtgacgcat	acgaatgaga	acaagttcac	9060
atgtcttacc	caggaacttg	tattgatgta	tgcagatatg	atggagggca	gagatatggt	9120
caacataata	tcaaccacgg	cgggtgcatt	cagaagctta	tcagagaaaa	ttgatgacat	9180
tttgcggtta	atagacgctc	tggcaaaaga	cttggttaat	caagtctacg	atgttgatc	9240
actaatggag	ggatttgc	acggagctgt	ccagctactc	gagccgtcag	gtacatttgc	9300
aggagatttc	ttcgcatcca	acctgcagga	gcttaaagac	attctaattg	gcctcctccc	9360
caatgatata	gcagaatccg	tgactcatgc	aatcgctact	gtattctctg	gtttagaaca	9420
gaatcaagca	gctgagatgt	tgtgtctgtt	gcgtctgtgg	ggtcaccac	tgcttgagtc	9480
ccgtattgca	gcaaaaggcag	tcaggagcca	aatgtgcgca	ccgaaaatgg	tagactttga	9540
tatgatcctt	caggtactgt	ctttcttcaa	gggaacaatc	atcaacgggt	acagaaagaa	9600
gaatgcaggt	gtgtggccgc	gagtcaaagt	ggatacaata	tatgggaagg	tcattgggca	9660
actacatgca	gattcagcag	agatttcaca	cgatatcatg	ttgagagagt	ataagagttt	9720
atctgcactt	gaatttgagc	catgtataga	atatgaccct	gtcaccaacc	tgagcatgtt	9780
cctaaaagac	aaggcaatcg	cacaccccaa	cgataattgg	cttgccctgt	ttaggcggaa	9840
ccttctctcc	gaagaccaga	agaaacatgt	aaaagaagca	acttcgacta	atcgccctct	9900
gatagagttt	ttagagtcaa	atgattttga	tccatataaa	gagatggaat	atctgacgac	9960
ccttgagtac	cttagagatg	acaatgtggc	agtatcatac	tcgctcaagg	agaaggaagt	10020
gaaagttaat	ggacggatct	tcgctaagct	gacaaagaag	ttaaggaact	gtcaggtgat	10080
ggcggaagg	atcctagccg	atcagattgc	acctttcttt	cagggaatg	gagtcattca	10140
ggatagcata	tccttgacca	agagtatgct	agcgtagagt	caactgtctt	ttaacagcaa	10200
taagaaacgt	atcactgact	gtaaagaaag	agtatcttca	aaccgcaatc	atgatccgaa	10260
aagcaagaac	cgtcgagag	ttgcaacctt	cataacaact	gacctgcaa	agtactgtct	10320
taattggaga	tatcagacaa	tcaaattggt	cgctcatgcc	atcaatcagt	tgatgggcct	10380
acctcacttc	ttcgaatgga	ttcacctaag	actgatggac	actacgatgt	tcgtaggaga	10440
ccctttcaat	cctccaagtg	acctactga	ctgtgacctc	tcaagagtcc	ctaagtatga	10500
catatatatt	gtcagtgcc	gagggggtat	cgaaggatta	tgccagaagc	tatggacaat	10560
gatctcaatt	gctgcaatcc	aacttgctgc	agctagatcg	cattgtcgtg	ttgcctgtat	10620
ggtacagggt	gataatcaag	taatagcagt	aacgagagag	gtaagatcag	acgactctcc	10680
ggagatggtg	ttgacacagt	tgcatcaagc	cagtataaat	ttcttcaagg	aattaattca	10740
tgtcaatcat	ttgattggcc	ataatttgaa	ggatcgtgaa	accatcaggt	cagacacatt	10800
cttcatatac	agcaaacgaa	tcttcaaaga	tggagcaatc	ctcagtcaag	tcctcaaaaa	10860
ttcatctaaa	ttagtgctag	tgtcagtgga	tctcagtga	aacaccgtaa	tgtcctgtgc	10920
caacattgcc	tctactgtag	cacggctatg	cgagaacggg	cttcccaaag	acttctgtta	10980
ctattttaa	tatataatga	gttgtgtgca	gacatacttt	gactctgagt	tctccatcac	11040
caacaattcg	caccccgatc	ttaatcagtc	gtggattgag	gacatctctt	ttgtgcactc	11100
atatgttctg	actcctgccc	aattaggggg	actgagtaac	cttcaatact	caaggctcta	11160
cactagaaat	atcggtgacc	cggggactac	tgcttttgca	gagatcaagc	gactagaagc	11220
agtgggatta	ctgagtccta	acattatgac	taatatctta	actaggccgc	ctgggaatgg	11280


```

agattggggc agtctgtgca acgacccata ctctttcaat tttgagactg ttgcaagccc 11340
aaatattggt cttaagaaac atacgcaaag agtcctatgt gaaacttggt caaatccctt 11400
attgtctgga gtgcacacag aggataatga ggcagaagag aaggcattgg ctgaattctt 11460
gcttaatcaa gaggtgattc atccccgctg tgcgcatgcc atcatggagg caagctctgt 11520
aggtaggaga aagcaaattc aagggttgtg tgacacaaca aacaccgtaa ttaagattgc 11580
gcttactagg aggccattag gcatcaagag gctgatgcgg atagtcaatt attctagcat 11640
gcatgcaatg ctgttttagag acgatgtttt ttctccagt agatccaacc accccttagt 11700
ctcttcta atgtgttctc tgacactggc agactatgca cggaatagaa gctggtcacc 11760
tttgacggga ggcaggaaaa tactgggtgt atctaactc gatacgatag aactcgtaga 11820
gggtgagatt cttagtgtaa gcggagggtg tacaagatgt gacagcggag atgaacaatt 11880
tacttggttc catcttccaa gcaatataga attgaccgat gacaccagca agaactctcc 11940
gatgagggtg ccatatctcg ggtcaaagac acaggagagg agagctgcct cacttgcaaa 12000
aatagctcat atgtcgccac atgtaaaggc tgccctaagg gcatcatccg tgttgatctg 12060
ggcttatggg gataatgaag taaattggac tgctgctctt acgattgcaa aatctcgggtg 12120
taatgtaaac ttagagtatc ttcggttact gtccccctta cccacggctg ggaatcttca 12180
acatagacta gatgatggta taactcagat gacattcacc cctgcatctc tctacagggtg 12240
tcaccttaca ttcacatatc caatgattct caaaggctgt tcaactgaaga aggagtcaaa 12300
gaggggaatg tggtttacca acagagtcac gctcttggtt ttatctctaa tcgaatcgat 12360
ctttccaatg acaacaacca ggacatatga tgagatcaca ctgcacctac atagtaaatt 12420
tagttgctgt atcagagaag cacctgttgc ggttccttcc gagctacttg ggggtgtacc 12480
ggaactgagg acagtgcctc caaataagtt tatgtatgat cctagccctg tatcggagggtg 12540
agactttgct agacttgact tagctatctt caagagttat gagcttaatc tggagtcata 12600
tcccacgata gagctaatac acattcttcc aatatccagc gggaagtga ttggccagtc 12660
tgtggtttct tatgatgaag atacctccat aaagaatgac gccataatag tgtatgacaa 12720
taccggaaat tggatcagtg aagctcagaa ttcagatgtg gtccgcctat ttgaatatgc 12780
agcaactgaa gtgctcctcg actgttctta ccaactctat tacctgagag taagaggcct 12840
agacaatatt gtcttatata tgggtgattt atacaagaat atgccaggaa ttctactttc 12900
caacattgca gctacaatat ctcatcccggt cattcattca aggttacatg cagtgggcct 12960
ggtcaaccat gacggatcac accaacttgc agatacggat tttatcgaaa tgtctgcaaa 13020
actattagta tcttgacccc gacgtgtgat ctccggctta tattcaggaa ataagtatga 13080
tctgctgttc ccatctgtct tagatgataa cctgaatgag aagatgcttc agctgatatc 13140
ccggttatgc tgtctgtaca cggctactct tgctacaaca agagaaatcc cgaaaataag 13200
aggcttaact gcagaagaga aatgttcaat actcactgag tatttactgt cggatgctgt 13260
gaaaccatta cttagccccg atcaagtgag ctctatcatg tctcctaaca taattacatt 13320
cccagcta atctgtacta tgtctcggaa gacgctcaat ttgatcagg aaaggaggga 13380
cagggatact atcctggcgt tgtgttctcc ccaagagcca ttattagagt tcccttctgt 13440
gcaagatatt ggtgctcgag tgaaagatcc attcaccgca caacctgcgg catttttgca 13500
agagttagat ttgagtgtc cagcaaggta tgacgcattc acacttagtc agattcatcc 13560
tgaactcaca tctccaaatc cggaggaaga ctacttagta cgatacttgt tcagagggat 13620
agggactgca tcttcctctt ggtataaggc atctcatctc ctttctgtac ccgaggtaag 13680
atgtgcaaga cacgggaact ccttatactt agctgaaggg agcggagcca tcatgagtct 13740

```

```

tctcgaaactg catgtaccac atgaaactat ctattacaat acgctctttt caaatgagat 13800
gaaccccccg caacgacatt tcgggccgac cccaactcag tttttgaatt cggttggtta 13860
taggaatcta caggcggagg taacatgcaa agatggattt gtccaagagt tccgtccatt 13920
atggagagaa aatacagagg aaagtgacct gacctcagat aaagcagtgg ggtatattac 13980
atctgcagtg ccctacagat ctgtatcatt gctgcattgt gacattgaaa ttctccagg 14040
gtccaatcaa agcttactag atcaactagc tatcaattta tctctgattg ccatgcattc 14100
tgtaagggag ggccgggtag taatcatcaa agtggtgtat gcaatgggat actactttca 14160
tctactcatg aacttggttg ctccgtgttc cacaaaagga tatattctct ctaatgggta 14220
tgcattgtcg ggagatatgg agtggtacct ggtatttgtc atgggttacc tgggcgggcc 14280
tacatttcta catgaggtgg tgaggatggc aaaaactctg gtgcagcggc acggtacgct 14340
cttgtctaaa tcagatgaga tcacactgac caggttattc acctcacagc ggcagcgtgt 14400
gacagacatc ctatccagtc ctttaccag attaataaag tacttgagga agaatttga 14460
cactgcgctg attgaagccg ggggacagcc cgtccgtcca ttctgtgcgg agagtctggt 14520
gagcacgcta gcgaacataa ctcagataac ccagattatc gctagtcaca ttgacacagt 14580
tatccggtct gtgatataa tggaagctga gggatgctc gctgacacag tatttctatt 14640
tacccttac aatctctcta ctgacgggaa aaagaggaca tcacttatac agtgcacgag 14700
acagatccta gaggttaca tactaggtct tagagtcgaa aatctcaata aaataggcga 14760
tataatcagc ctagtgtta aaggcatgat ctccatggag gaccttatcc cactaaggac 14820
atacttgaag catagtacct gccctaaata ttgaaggct gtcctaggta ttaccaaact 14880
caaagaaatg tttacagaca cttctgtatt gtacttgact cgtgctcaac aaaaattcta 14940
catgaaaact ataggcaatg cagtcaaagg atattacagt aactgtgact cttaacgaaa 15000
atcacatatt aataggctcc ttttttggcc aattgtattc ttgttgattt aatcatatta 15060
tggttagaaa aagttgaacc ctgactcctt aggactcgaa ttcgaactca aataaatgtc 15120
ttaaaaaaag gttgcgcaca attattcttg agtgtagtct cgtcattcac caaatctttg 15180
tttgggt

```

<210> 4

<211> 1611

<212> DNA

<213> infectious bronchitis virus (IBV)

<400> 4

```

atgttggttaa cacctctttt actagtgact cttttgtgtg cactatgtag tgctgctttg 60
tatgacagta gttcttacgt gtactactac caaagtgcct tcagaccacc tgatgggttg 120
catttacatg ggggtgcgta tgcggttggt aatatttcta gtgaatctaa taatgcaggc 180
tcttcatctg ggtgtactgt tgggtattatt catgggtgtc gtgttggtta tgcttcttct 240
atagctatga cggcaccgtc atcaggtatg gcttgggtcta gcagtcagtt ttgtactgca 300
tactgtaaact tttcagatac tacagtgttt gttacacatt gttacaaaca tgttgggtgt 360
cctataactg gcatgcttca acagcattct atacgtgttt ctgctatgaa aaatggccag 420
cttttttata atttaacagt tagtgtagct aagtacccta cttttaaatc atttcagtgt 480
gttaataaatt taacatccgt atatttaaatt ggtgatcttg tttacacctc taatgagacc 540

```

```

acagatgtta catctgcagg tgtttatttt aaagctgggtg gacctataac ttataaagtt 600
atgagagaag ttagagccct ggcttatttt gttaatggta ctgcacaaga tgttattttg 660
tgtgatgggt cacctagagg cttgttagca tgccagtata atactggcaa tttttcagat 720
ggcttttatc cttttactaa tagtagttta gttaaagcaga agtttattgt ctatcgtgaa 780
aatagtgtta atactacttt tacgttacac aatttcactt ttcataatga gactggcgcc 840
aacccaaata ctagtgggtgt ccagaatatt caaacttacc aaacacaaac agctcagagt 900
ggttattata attttaattt ttccctttctg agtagttttg tttataagga gtctaatttt 960
atgtatggat cttatcaccc aagttgtaat tttagactag aaactattaa taatggtttg 1020
tggtttaatt cactttcagt ttcaattgct tacggctctc ttcaagggtg ttgcaagcaa 1080
tctgtcttta gtggtagagc aacctgttgt tatgcttact catatggagg tcctttgctg 1140
tgtaaagggtg tttattcagg tgagttagat cataattttg aatgtggact gttagtttat 1200
gttactaaga gcggtggctc tcgtatacaa acagccactg aaccgccagt tataactcaa 1260
cacaattata ataattattac tttaaatact tgtgttgatt ataatatata tggcagaact 1320
ggccaagggt ttattactaa tgtaaccgac tcagctgtta gttataatta tctagcagac 1380
gcaggtttgg ctattttaga tacatctggg tccatagaca tctttgtcgt acaaagtga 1440
tatggctcta attattataa ggtaaccct tgcaagatg tcaaccagca gttttagtt 1500
tctgggtgta aattagtagg tattcttact tcacgtaatg agactgggtc ccagcttctt 1560
gagaatcagt ttacatcaa aatcactaat ggaacacgtc gttttagacg t 1611

```

<210> 5

<211> 960

<212> DNA

<213> infectious laryngotracheitis virus (ILTV)

<400> 5

```

ggaggggaga gagacaactt cagctcgaag tctgaagaga catcatgagc ggcttcagta 60
acataggatc gattgccacc gtttccttag tatgctcgct tttgtgcgca tctgtattag 120
gggcgccggt actggacggg ctcgagtcga gccctttccc gttcgggggc aaaattatag 180
cccaggcgtg caaccgcacc acgattgagg tgacggtccc gtggagcgac tactctggtc 240
gcaccgaagg agtgtcagtc gaggtgaaat ggttctacgg gaatagtaat ccgaaagct 300
tcgtgttcgg ggtggatagc gaaacgggca gtggacacga ggacctgtct acgtgctggg 360
ctctaatacca taatctgaac gcgtctgtgt gcagggcgtc tgacgccggg atacctgatt 420
tcgacaagca gtgcgaaaaa gtgcagagaa gactgcgctc cggggtggaa cttggtagtt 480
acgtgtctgg caatggatcc ctggtgctgt acccagggat gtacgatgcc ggcattctacg 540
cctaccagct ctcagtgggt gggaagggat ataccgggtc tgtttatcta gacgtcggac 600
caaaccggtg atgccacgac cagtatgggt acacctatta cagcctggcc gacgagcggt 660
cagacttatc atcttatgac gtagcctcgc ccgaactcga cggtcctatg gaggaagatt 720
attccaattg tctagacatg ccccggctac gcccatggac aaccgtttgt tcgcatgacg 780
tcgaggagca ggaaaacgcc acggacgagc ttacctatg ggacgaggaa tgcgccggtc 840
cgctggacga gtacgtcgac gaaaggtcag agacgatgcc caggatgggt gtcttttcac 900
cgccctctac gctccagcag tagccacccg agagtgtttt ttgtgagcgc ccacgcaaca 960

```

<210> 6

<211> 810

<212> DNA

<213> avian encephalomyelitis virus (AEV)

<400> 6

```

gggaaagagg atgaaggagg atttttcagt gtgcctgaag tggagcaaca tgttggtgag    60
gataaggaac cacagggacc tttgcacgtg acaccttttg gcgctgttaa agctatggag   120
gacccccaat tggccaggaa aacacctggc acattccctg aattagctcc tggtaaacct   180
cgacatacag tggaccacat ggatctgtat aagtcatggt ggcgtgcca ttacttgtgg   240
ggacatgaat tcacaaaaac tgacatgcag tacacattcc agataccatt aagtcccatt   300
aaagagggtt ttgtgacggg tacacttagg tggtttttaa gtcttttcca actgtatcgt   360
ggttctctcg acattacatg gacatttgca ggaaaaacta atgtggatgg cattgtgtac   420
tttgtgcctg aggggtgttg gatagagact gagaggagg agcagacccc ttgtctcaca   480
ttgaactata aaacatcggt aggtgccatt aggtttaata ctggacaaac tacgaatgtc   540
cagtttagga tccctttcta cagccactg gaacacatcg caaccattc taaaaatgcg   600
atggattcag tcttgggggc aatcacaacc cagatcacta actatagtgc tcaggatgag   660
tatttgcagg ttacctacta catcagtttc aatgaagatt cacagttttc tgttcccaga   720
gcggtgccag tggtcagctc attcactgac acatctagca aaacagtgat gaatacatat   780
tggcttgatg atgacgagtt ggtagaagag                                     810

```

<210> 7

<211> 726

<212> DNA

<213> avian encephalomyelitis virus (AEV)

<400> 7

```

atgagcaaac tattttctac tgtaggcagg actggtgatg aggttttgtc tgtgctcaat    60
gatgaggata ctgaatctta tgctggccct gatcgactg cagtagttgg cggaggattt   120
ctgacaacgg tagaccagag ttcagttagc acggctacaa tgggaagttt acaagatgta   180
cagtacagga ctgcagtcga tattcctggt tctagagtga cacaaggtga gaggttcttc   240
cttatcgatc agcgtgagtg gaactcaaca cagagtgaat ggcagttatt gggcaagatt   300
gacatagtaa aagagctgct tgatcagtcg tatgctgttg atggcctttt gaagtaccat   360
tcttatgcaa ggtttggtt ggatgtcatt gttcagatta atccaacatc attccaggca   420
gggggcctca tagcagctct cgtaccttat gaccagggtg acattgaatc aattgttgcc   480
atgaccactt attgccatgg caaggttaat tgcaacataa actacgttgt aaggatgaag   540
gtgcatata tatacagtcg aggttggttac aaccttagga actcagcata ctccatttgg   600
atgcttgtga taagagtgtg gtcacggctg cagttgggat ctggcacttc aacacagatt   660
actatcacca ccttggttag gtttgtggat ttggaactgc atggacttag ccctttggtc   720
gcacag                                           726

```

<210> 8

<211> 735

<212> DNA

<213> avian encephalomyelitis virus

<400> 8

```

atgatgcgca acgaatttcg actgtcgtca tctagcaaca ttgtcaattt ggctaattat   60
gacgatgcaa gagccaaagt gtctctagcg ctgggacaag aagagttttc cagagactcg   120
tcaagtaccg ggggggaatt ggtgcatcat ttttcacagt ggacgtccat tccgtgcctt   180
gccttcactt ttacattccc cggcacggta gggccaggca ctacatctg gtcaaccacg   240
gtggaccctt tttcctgtaa cttgaggcg tctagcactg tgcacccac taacttgagc   300
tcgattgcgg gtatgttctg tttttggaga ggtgacattg tatttgagtt tcaagtcttt   360
tgcaccaagt atcattccgg caggttgatg tttgtgtatg tgcctggcga tgaaaacaca   420
aaaatcagca ccttaactgc aaaacaagca tctactggtc ttactgctgt ttttgatatc   480
aatggtgtaa attcaacact ggtgtttaga tgccctttca tctctgacac accttacagg   540
gtgaatcaa cgactcataa gtccctctgg ccttatgcaa ctggcaagct tgtgtgctat   600
gtctacaata tactgaacgc acctgccagt gtatcaccaa ccctgcccat taatgtgtac   660
aaaagtgctg cggatctgga gttgtatgca cctgtttatg gggtttcttc caccaacacc   720
tcaatttttg ttcaa                                     735

```

<210> 9

<211> 1500

<212> DNA

<213> avian parainfluenza virus (APV)

<400> 9

```

ggggggtgtg catggtaggg tggggaaggt agccaattcc tgcccattgg gccgaccgta   60
ccaagagaag tcaacagaag tatagatgca gggcgacatg gagggtagcc gtgataacct   120
cacagtagat gatgaattaa agacaacatg gaggttagct tatagagttg tatccctcct   180
attgatggtg agtgccttga taatctctat agtaatcctg acgagagata acagccaaag   240
cataatcacg gcgatcaacc agtcgtatga cgcagactca aagtggcaaa cagggataga   300
agggaaaatc acctcaatca tgactgatac gctcgatacc aggaatgcag ctcttctcca   360
cattccactc cagctcaata cacttgaggc aaacctgttg tccgccctcg gaggttacac   420
gggaattggc cccggagatc tagagcactg tcgttatccg gttcatgact ccgcttacct   480
gcatggagtc aatcgattac tcatcaatca aacagctgac tacacagcag aaggccccct   540
ggatcatgtg aacttcattc cggcaccagt tacgactact ggatgcacaa ggatcccatc   600
cttttctgta tcatcatcca tttggtgcta tacacacaat gtgattgaaa cagggttgcaa   660
tgaccactca ggtagtaatc aatatatcag tatgggggtg attaagaggg ctggcaacgg   720
cttaccttac ttctcaacag tcgtgagtaa gtatctgacc gatgggttga atagaaaaag   780
ctgttccgta gctgcgggat ccgggcattg ttacctcctt tgtagcctag tgtcagagcc   840

```

cgaacctgat gactatgtgt caccagatcc cacaccgatg aggttagggg tgctaacaag 900
 ggatgggtct tacactgaac agtggtgacc cgaaagaata tttaagaaca tatggagcgc 960
 aaactaccct ggggtagggg caggtgctat agcaggaaat aaggtgttat tcccatttta 1020
 cggcggagtg aagaatggat caaccctga ggtgatgaat aggggaagat attactacat 1080
 ccaggatcca aatgactatt gccctgaccc gctgcaagat cagatcttaa gggcagaaca 1140
 atcgtattat cctactcgat ttggtaggag gatggtaatg caggagatcc taacatgtcc 1200
 agtatccaac aattcaacaa tagccagcca atgccaatct tactatttca acaactcatt 1260
 aggattcatc ggggcggaat ctaggatcta ttacctcaat ggtaacattt acctttatca 1320
 aagaagctcg agctgggtggc ctcaccccca aatttaccta cttgattcca ggattgcaag 1380
 tccgggtacg cagaacattg actcaggcgt taacctcaag atgttaaatg ttactgtcat 1440
 tacacgacca tcatctggct ttgtaatag tcagtcaaga tgccctaag actgcttatt 1500

<210> 10

<211> 1440

<212> DNA

<213> hemorrhagic enteritis virus (HEV)

<400> 10

gaaatgttaa tgtagacca tactgaccaa ttcttggttc attttagatg gaatcttcga 60
 aactgccac tagaattttt gctccaacgg aaggagaaa cagtataatt tacagcaact 120
 tgccctctgt tcaagataca accaaaatat tttatataga taacaaggcc attgatatag 180
 agtcatataa tcaagagaaa gatcattcta attattatac taatataatt caaacacaga 240
 acatttcaac tattgattca agtatacagc aaattcagtt agatgaaagg tctagatggg 300
 gaggagaact acatacaagc ttagtaacat ctgttatgaa ttgtactaaa cattttaatt 360
 cagataggtg tttagtgaat attcagacta ttaagagtcc acctacattt gaatggaaag 420
 aattgaaaat acctgaggga aactatgttt taaatgagtt tattgattta ttaaatgaag 480
 gtattacttc tttatacctt cagtatggca ggcaacaggg tgtacttgaa gaagacatag 540
 gaataaaatt tgatactcgc aattttgaaa ttggtaaaga tccaactact aatcttggtta 600
 ctcttggtta atacttggtt aagggttatc atgctgatat aatacttctt cctgggtggg 660
 ctattgattt ttctttttct agattgggta acatttttagg tattagaaaa cgtgagactt 720
 ataaagctgg ctttttgatt gaatatgatg acttgacaaa tggtaatat ccaccactgt 780
 tggatgttgc taactataag tctacaagtc aagctaaacc attattacag gatccatctg 840
 gcagatctta ccacgttatg gatagtgatt ctaacagacc tgtgactgca tataggtctt 900
 ttgttttgtc atataacaat gaagggtctg caaaattaaa gtttttgatg tgtatgagtg 960
 atataacggg gggctcctaat cagctgtatt ggtgtttgcc tgattcttat aaaccgccag 1020
 tatcttttaa gcaagaaacg caagtagata aactgcctgt tgttggtatg caactttttt 1080
 tcctttttgt ttgtaaatct gtgtattctg gtgctgctgt ttacacacag ttaattgaac 1140
 agcagactaa ttgacacaa atttttaaca gatttcatga taatgaaatt ttaaaacaag 1200
 ctccatatgt gaatcaagtt ttattggctg aaaatgtgcc cataaatgtt aatcagggaa 1260
 caataccaat attttcaact cttccaggag tacagagagt ggttgtggaa gacgatagga 1320
 gaagaactgt accctacgtt accaagtcac ttgctacagt atatccgaag gttttgtcta 1380

gcaaaacttt gcaataatgc attctgttgt ttattctcca ggggacagta gaggatgggg 1440

<210> 11

<211> 2995

<212> DNA

<213> fowlpox virus (FPV)

<400> 11

```

ctcttaattc gtttcaaaaa tgggaaatat ttttaagcct attccaaagg ccgattatca 60
gattgtggaa acagtaccac aaagcttaac agctattaat tctactaatc tttctactta 120
tgaatgtttt aaacgtttta tagatctagc aaaaaaagag atctacatag ctacgttttg 180
ttgtaaccta agtactaatc ctgagggtac tgacatacta aacagattaa tcgatgtttc 240
gagtaaagtt tctgtatata ttttagtaga tgagagcagt cctcataaag attatgaaaa 300
gattaagtct tcccatatta gttatattaa agtagatata ggtgtgctta ataatgaatc 360
agtaggaaac ttgttaggta atttctgggt agtggataag cttcactttt ataatggtag 420
tgcgtctctt atgggaaatg cgctaacaac tattaataat atgggcatat attccgaaaa 480
taattcttta gcaatggatt tatatttcag atcgttggac tataaaatta taagcaagaa 540
aaaatgttta ttctttacca gaatggccac aaagtacat ttcttcaaaa accataacgg 600
tatattcttt tcagattctc cagaacatat ggtaggtaga aaaagaactt ttgacttgga 660
ttgtgttatt cattatatag acgcggcgaa gtctactata gatctagcga tagtatctct 720
tcttcctaca aagagaacaa aagattctat cgtctattgg cctataataa aagatgcatt 780
aatacgggcc gtattagaac gaggtgtcaa actacgagtg ctattaggat tttggaaaaa 840
aacggatggt atatcaaaag catctataaa aagccttaac gaactaggag ttgaccatat 900
agatatctct actaaagtat ttaggtttcc cgttaattct aaagtagatg atattaataa 960
ttctaaaatg atgattatag atggaaggta tgctcatggt atgactgcta acctagacgg 1020
gtctcatttt aatcaccatg cttttgttag ctttaactgt atggatcaac aatttacaaa 1080
gaaaatagct gaagtgtttg aaagggactg gatatctcct tacgcaaaag aaatagatat 1140
gtctcaaata tagtatatat gataaaaaga tcctaataaa taaatatagc atggcactaa 1200
tagaacagtt acaatcttct gaacaatcaa tactttcacc gtttagatat tatggtttta 1260
aagattttca taatgtaatt tttaccacaa tagatgacga aacattaata gtaattacag 1320
tcaacaatgt accattagta actagggtta taacgtttga aaaaataaca ttttttagat 1380
cgtttaatag tacttgtatt ataacttcca acaataattc ggatattgat acagatactt 1440
attttatacc aaattcgtta tcactactag atattttgaa gaaaagagca tatgatgtag 1500
aactaagaga tctatcattt gctataatgt cggaaatgaa taacgatgaa ttgagaaata 1560
gtgatattgt atctctaaac aaatggctac ataagcataa tttactagac tacaattag 1620
tactaataag tgatatcgat agaagatata aattatacaa taaaaaaaaat acaataattg 1680
atgttatatc cgtaaattgt agaaattata atatatgggt taaagatggt atagaatatt 1740
attcaccgga atacttaaga tgggtctatag atattaaaag agccacagaa agtaataact 1800
ggttaccgta tagccagtct ataaaccctt tgaatgaaaa tatatacgct tttgaattta 1860
tagctacttt agaaagatcc aatgagcgct taaatatcgg agcgatattc ctgtatccgg 1920
atataataat tacaggtaga aacaacgaag atataataga aaagttttta gatcagttag 1980

```

```

aagaagtaat atataaaaaa aattctgata gtattgtttt aacaggttat catctaakat 2040
ttttagagaa tactattttta gagagatata tcagtaagta taaagactgg atttttacat 2100
gtaatcgtct agtacattgt aaaaccggca ctgaagtatt cttatttgat gccgctatat 2160
ttttccatc ctctaataag aaaggatatg taaaacattg gacaggtaaa aaattaaatt 2220
ttaaaaactt tttccaaaaa gatagtcagc tagaaaaata cataaataat aacagtgtag 2280
cagaacgtat atattattta cagtcttctt tacacaagca tatatcctgt ctaatagaaa 2340
ttttcgagtt aaatggattt gattttaatt tttctgggtt gttagatata cttattttca 2400
gtattcgtgt taagaataat aatggtaatt actattaccc taaacattct tcagctgtga 2460
atgtgatgtt gtcattctatt tacacggact attatgctat tgatgatata gataaagata 2520
gtaagaaaact tgtttttaac tctatttttc cttaataat ggaaggatat taccctgaag 2580
gaaaacctta ttatacgaaa acacccaaag aagggtatgt gtcaatatgt ttatgtgatg 2640
tagaaatatac taatgatata aagaatccta tattgtattg taaagaaaac aagtcagcta 2700
ggaagtttac aggagtattc acatctgtag atatagatac cgctgtaaaa ctaaggaggat 2760
ataaaattaa aatattagaa tgtattgaat ggcctaataa aataaaatta ttcgacaata 2820
tatgttatct gaataaatta tttatagaac atcaggatta cacacacgat gaaaaatctt 2880
tacaaggcta tcttttttct tatttactta aaggcaacgt taccgaagat gttttagcta 2940
tgaaaagttg tagaaataat ctttctataa tatcatttat aataagttac tgcag 2995

```

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer, IBS1F'

<400> 12

cgggatccgc cgccgcatg ttgtaacac ctctt

35

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer, IBS1R'

<400> 13

cggaattctt aacgtctaaa acgacgtgt

29

<210> 14

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer, NDF F'

<400> 14

cgggatccgc cgccgcatg ggctccagac cttctacc

38

<210> 15

<211> 34

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer, NDF R'

<400> 15

ccgctcgagt tacatttttg tagtggtctt catt

34

<210> 16

<211> 39

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer, NDHN F'

<400> 16

cgggatccgc cgccgcatg gaccgcgccg ttaggcaag

39

<210> 17

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer, NDHN R'

<400> 17

gctctagatt actcaactag ccagacctg

29

<210> 18

<211> 35

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>	
<223> PCR primer, IBDVP2F'	
<400> 18	
cgggatccgc cgccgccatg acaaacctgc aagat	35
<210> 19	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> PCR primer, IBDVP2R'	
<400> 19	
cggaattctt accttatggc ccggattat	29