



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **124976** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C12N 7/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2019 06661	(72) Винахідник(и): Калверт Джей Грегорі (US), Балаш Моніка (US), Форт Марія (US), Пірс Дуглас С. (US), Кейт Марсія Л. (US)
(22) Дата подання заявки: 14.12.2017	(73) Володілець (володільці): ЗОЕТИС СЕРВІСІЗ ЛЛС, 10 Sylvan Way, Parsippany, NJ 07054, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 23.12.2021	(74) Представник: Пахаренко Антоніна Павлівна, реєстр. №4
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/434,144	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2016/012406 A2, 28.01.2016 WO 2012/110489 A2, 23.08.2012
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 14.12.2016	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 11.11.2019, Бюл.№ 21	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 22.12.2021, Бюл.№ 51	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2017/066347, 14.12.2017	

(54) ВАКЦИНА ДЛЯ ЗАХИСТУ ТВАРИНИ СВИНІ ВІД ЗАРАЖЕННЯ ВІРУСОМ PRRS**(57) Реферат:**

Винахід стосується вакцини для захисту тварини свині від зараження вірусом PRRS, де вакцина включає: (а) європейський вірус PRRS, що кодується полінуклеотидною молекулою SEQ ID NO: 5 або полінуклеотидною молекулою, яка є щонайменше на 90 % ідентичною до SEQ ID NO: 5, при цьому зазначений вірус був адаптований для росту в свинячих клітинах або несвинячих клітинах ссавців, які експресують свинячий рецептор CD163, до введення зазначеної вакцини тварині свині; (b) зазначену кодуєчу полінуклеотидну молекулу; (c) зазначену полінуклеотидну молекулу у формі плазмід; або (d) вірусний вектор, який містить зазначену полінуклеотидну молекулу; в кількості, ефективній для вироблення імунозахисту проти інфекції, та носій, який придатний для ветеринарного застосування, і причому зазначена вакцина забезпечує легку та безпечну вакцинацію вже з моменту, коли поросля одностатевих віку або менше, і причому зазначена вакцина забезпечує тривалість імунітету протягом аж до 6 місяців.

UA 124976 C2

Галузь техніки винаходу

Представлений винахід передбачає вакцини, які захищають свиней різного віку, як самців, так і самок, від Європейських штамів вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (PRRS). Представлений винахід, зокрема, передбачає безпечну та ранню вакцинацію поросят до відлучення від матері, в тому числі від безпосередньо після народження (тобто тільки у віці близько 1 дня або менше) до трьохтижневого віку, в будь-який час, необов'язково, у комбінації з полівалентними комбінованими вакцинами для свиней, такими як двовалентні вакцини проти PRRSV/Mycoplasma hyopneumoniae (M.hyo), двовалентні вакцини проти PRRSV/свинячого цирковірусу типу 2 (PCV2), та тривалентні вакцини проти PRRSV/M.hyo/PCV2, або просто у вигляді моновалентної вакцини проти PRRSV, причому компонент вакцини PRRS, як правило, відповідає його генотипу (та підтипам зазначеного генотипу), визнаним циркулюючим на Європейському континенті, та включає в себе як Західну Європу, Середземноморські регіони, Скандинавські регіони, так і Східну Європу, такі країни як Росія, Туреччина та Україна.

Представлений винахід в цілому направлено на нові класи атенуйованих європейських штамів PRRS, які в модифікованій живій формі обидва є виключно безпечними та ефективними, коли їх вводять навіть наймолодшим тваринам як вакцини, і забезпечують дуже велику тривалість імунітету.

Передумови створення винаходу

Вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (PRRS) характеризується абортми, мертвонародженням та іншими проблемами репродуктивної функції у свиноматок та молодих свиней (до першого опоросу), а також респіраторними захворюваннями у молодяку свиней. Збудником є PRRS вірус (PRRSV), представник родини Arteriviridae та ряду Nidovirales. Нідовіруси представляють собою оболонкові віруси, які мають геноми, що складаються з одного ланцюга РНК з позитивною полярністю. Геномна РНК вірусу з позитивним ланцюгом РНК виконує подвійну роль як у зберіганні, так і у експресії генетичної інформації. Жодна ДНК не приймає участі у реплікації або транскрипції у нідовірусів. Неструктурні білки трансклюються безпосередньо з геномної РНК нідовірусів у вигляді крупних поліпротеїнів та як наслідок розщеплюються вірусними протеазами на дискретні функціональні білки. 3'-котермінальний вкладений набір субгеномних РНК (сгРНК) синтезується з геному та використовується як інформаційні РНК для трансляції структурних білків. Таким чином, розмноження нідовірусної геномної РНК представляє собою комбінований процес реплікації геному та синтезу сгРНК.

В кінці 1980-х років, два різних генотипи вірусу з'явилися майже одночасно, один у Північній Америці, а інший у Європі. Вірус PRRS в даний час є ендемічним захворюванням майже у всіх країнах-виробниках свиней, і вважається одним з найбільш економічно важливих захворювань, що впливають на світову індустрію свинини. Крім того, високовірулентні генотипи були виділені в Китаї та сусідніх країнах, і такі генотипи, як правило, тісно пов'язані з генотипами Північної Америки.

Незважаючи на значні успіхи в розумінні біології PRRSV, боротьба з вірусом залишається складною. Вакцинація тварин в польових умовах виявилася в значній мірі неефективною. PRRS зазвичай знову з'являється в імунізованих стадах, і більшість кампаній вакцинації проти PRRSV на фермі в кінцевому підсумку не в змозі контролювати захворювання.

Не обмежуючись теорією, інфікування свиней немутантного типу PRRSV або їх вакцинація живою атенуйованою формою цього патогену, на жаль, викликає тільки надлишковий виробіток не нейтралізуючих антитіл. Наприклад, протягом цього інтервалу часу генеруються тільки обмежені кількості клітин, які секретують інтерферон (IFN)- γ . Таким чином, PRRSV, очевидно, за своєю природою стимулює незбалансовану імунну відповідь, що відрізняється послідовно надмірним гуморальним (на основі антитіл) імунітетом, а також варіабельною і обмеженою, але потенційно захисною Т-хелперною (Th) 1-подібною IFN- γ відповіддю. Однією з характеристик інфекції PRRSV, яка, скоріш за все, сприяє несбалансованому розвитку адаптивного імунітету, є відсутність адекватної вродженої імунної відповіді. Зазвичай інфіковані вірусом клітини секретують інтерферон I типу "IFN" (включаючи IFN- α та IFN- β), який захищає сусідні клітини від інфекції. Крім того, вивільнений IFN типу I взаємодіє з піднабором наївних Т-клітин, щоб сприяти їх перетворенню на вірус-специфічні клітини, що секретують IFN типу II (IFN- γ). Навпаки, IFN- α реакція свиней на вплив PRRSV практично відсутня. Таке неефективне стимулювання продукування IFN- α патогеном, як могло би очікуватися, значно впливає на характер адаптивної імунної відповіді господаря, оскільки IFN- α активує експресію гену IFN- γ . Відповідно, перший цитокін, ймовірно, контролює домінуючий шлях, який сприяє розвитку адаптивного імунітету, а саме, опосередковані Т-клітинами відповіді IFN- β та пік антивірусного імунного захисту.

В зв'язку з цим стало очевидним, що ймовірний зв'язок між вродженим і адаптивним

імунітетом під час вірусних інфекцій відбувається через особливий тип дендритних клітин, який має здатність продукувати велику кількість інтерферону типу I, і відіграє критичну роль в поляризації функції Т-клітин. Зокрема, нечастий, але примітний тип дендритних клітин, - плазмоцитоїдні дендритні клітини (PDC), також відомі як природні клітини, що продукують IFN- α/β , відіграють критичну роль у противірусному імунітеті за рахунок їх здатності провокувати наївні Т-клітини диференціюватися в клітини, що секретують IFN- γ . Незважаючи на рідкість, PDC є надзвичайно потужними продуцентами IFN- α , причому кожна клітина здатна продукувати 3-10 пг IFN- α у відповідь на вірус. Навпаки, моноцити продукують у 5-10 разів менше IFN- α у перерахунку на клітину. Фенотип та деякі біологічні властивості свинячого PDC були описані (Summerfield et al., 2003, Immunology 110:440). Нещодавні дослідження визначили, що PRRSV не стимулює PDC свині секретувати IFN- α (Calzada et al., 2010, Veterinary Immunology and Immunopathology 135:20).

Цей факт в поєднанні зі спостереженням, що екзогенно-доданий IFN- α під час вакцинації, як було виявлено, покращує інтенсивність PRRSV-специфічної IFN- γ відповіді (W.A. Meier et al., Vet. Immunol. Immunopath. 102, pp 299-314, 2004), підкреслює найважливішу роль, яку IFN- α відіграє під час інфікування свиней даним вірусом. Враховуючи очевидну критичну роль IFN- α у розвитку захисного імунітету, важливо визначити здатність різних запасів вірусу PRRS стимулювати та/або інгібувати продукування IFN- α . Відповідно, гостра необхідність у нових та покращених модифікованих живих вакцинах для захисту проти PRRS.

Європейський PRRS звичайно позначають як "тип 1", щоб відрізнити його від віддалено зв'язаних північноамериканського або PRRS "типу 2", і дані два типи є ідентичними тільки приблизно на 60 % за загальним нуклеотидним рівнем. Перший чітко визначений ізолят європейського PRRSV був розкритий Wensvoort et al., як агент Лелістада (дивіться ізолят 1102 інституту Пастера, і патенти США 5,620,691 та 6,197,310 і їх міжнародні аналоги). Різноманітні підтипи європейського PRRS (всі з яких можуть бути захищені в усіх аспектах представленого винаходу) більш детально описані у M. P. Murtaugh et al., Virus Research, Vol 154, pp. 18-30, 2010; and M. Shi et al., Virus Research, vol 154 pp. 7-17, 2010. Ранні північноамериканські ізоляти PRRS розкриті у патентах США 5,476,778 та 5,840, 563.

Автори представленого винаходу виявили, що можливим є запропонувати атенуйовані форми європейських штамів PRRS, які виявляються як безпечними, так і ефективними, коли їх дають наймолодшим тваринам, і, які на відміну від багатьох інших доступних на даний час вакцин проти PRRS, не блокують багато аспектів механізмів відповіді імунної системи тварини, такі як вищезгадані, тим самим ще більше сприяючи безпеці та ефективності. Як добре відомо в даній галузі техніки, виявилось дуже важким культивувати вірус PRRS. Історично лінія клітин нирки мавпи MA-104 і її похідні використовувалися майже виключно для розмноження та послаблення комерційних модифікованих живих вакцин проти PRRSV вакцини, хоча невідомо, чому такі клітини були придатні для цієї мети (дивіться патент США 5,476,778).

Відкриття того факту, що клітинний поверхневий білок ссавців "CD163" природним чином використовується вірусом PRRS для проникнення в клітини ссавців (дивіться, наприклад, патент США 9,102,912) дозволило розробити нові PRRSV-пермісивні клітинні лінії. Несподівано, атенуація на цих більш нових клітинних лініях призводить до появи вакцинних вірусів з властивостями, які відрізняються від існуючих вакцин (дивіться патент США 9,566,324 та публікацію заявки США 2013-0309263).

Відповідно, було несподівано виявлено, що європейські віруси PRRS, адаптовані для культивування або на (1) свинячих клітинах, або (2) несвинячих клітинах, які включають рецептор свинячого CD163 (дивіться патент США 7,754,464), зберігають профіль безпеки та ефективності, які в більшій мірі мають значення для свиней, ніж ті, які забезпечуються вакцинними вірусами, культивованими традиційними способами, та, крім того, що захисний імунітет може бути досягнутий навіть під час вакцинації в ранньому віці. Таким чином, представляється, що звичайна адаптація PRRS до культури у клітинній лінії нирок мавпи MA-104 (яка дивним чином експресує мавпячий CD163, можливо, у зв'язку з функцією захоплення гемоглобіну, і в якій зазначений мавпячий CD163 є тільки на приблизно 85 % ідентичним свинячому CD163) призводить до профілю безпеки/ефективності, який завжди буде менш біологічно значущим і неоптимальним. Репрезентативні приклади свинячого CD163 описані у патенті США 7,754,464 та членах його сімейства, патентах США 8,058,050; 8,486,685; та 9,102,912 (дивіться, наприклад, SEQ ID: NO:14 та SEQ ID NO:2 у зазначених документах). Як додатково описано в цьому сімействі патентів, стосовно до практики представленого винаходу, для рекомбінантної клітини, що експресується немає необхідності експресувати повнорозмірний CD163, за умови, що поліпептид CD163 має трансмембранний домен для закріплення в мембрані і експресує його поверхневі, що піддаються дії домени, таким чином, С-термінальний

домен може бути відсутнім або зменшуватися.

Крім того, вакцини згідно представленого винаходу, як очікується, не будуть перешкоджати інтерферонній відповіді господаря, тоді як вакцини відомого рівня техніки, такі як Ingelvac MLV (дивіться US 5,476,778 та 5,846,805), які адаптовані для культивування в клітинах мавпи (які забезпечують тільки мавпячий CD163 як рецептор), зазвичай показують сильний інгібуючий ефект на IFN- альфа відповідь господаря (дивіться, приклад 5 в цілому, і фігуру 4 в патенті США 9,566,324).

Вірус PRRS звичайно викликає найважчі симптоми у наймолодшої тварини, і при цьому є здатним забезпечити вакцинацію, яка є одночасно як безпечною, так і ефективною для поросеня, якому всього один день, наприклад, суттєво сприяє розвитку тваринництва, а не тільки шляхом зниження смертності молодих поросенят, а також забезпечення можливості переміщення тварин між господарствами в найкоротші терміни після відлучення від матері.

Ще один аспект винаходу передбачає розпізнавання того, що сучасні європейські вакцини на основі клітин мавп можуть бути поліпшені шляхом повторної адаптації, що лежить в основі вірусів, або для зростання у відповідних свинячих клітинах (дивіться обговорення, наприклад, клітин PK-9 нижче), або несвинячих клітин, які експресують свинячий CD163, в результаті чого вакцини, як правило, більш безпечні і можуть безпечно викликати надійну і стійку імунну відповідь в набагато більш ранньому віці. Таким чином, типові вимоги безпеки та ефективності, пов'язані з традиційними вакцинами, які були виготовлені в клітинах мавп (тобто такі вакцини вводяться тільки у віці близько 3 тижнів або пізніше), можуть бути скасовані з поліпшеними характеристиками, також досягаючи ефективності вже у 1-ий день життя. Таким чином, враховуючи велику різноманітність типів, підтипів і штамів PRRSV, способи відповідно до представленого винаходу також можуть бути використані для підвищення поточної релевантності та ефективності багатьох раніше існуючих живих вакцин проти PRRS.

Про те, що вакцини проти PRRS типу 2 (Північна Америка) можуть бути безпечними та ефективними, коли раніше повідомлялося про введення перед відлученням від матері відносно північноамериканських/азіатських штамів PRRS (дивіться WO2013/173443, наприклад, у прикладах 9 та 10), зокрема, під час порівняння зі зразком атенуює "P129 штам" північноамериканського вірусу PRRS (дивіться, наприклад, SEQ ID NO:6 у зазначеному документі, а також PCT/IB2011/055003 та US 6,500,662). Проте, європейські та північноамериканські віруси PRRS є ідентичними тільки приблизно на 60 % на нуклеотидному рівні, і ведуть себе дещо по-різному в залежності від типів патологій у різних класів тварин (вік, стать тощо).

В даному документі описується застосування як вакцини клітинних ліній, що експресують свинячий CD163, для послаблення та вибору штамів генотипу 1 (європейський) PRRSV, які володіють чудовими властивостями.

Суть винаходу

В першому варіанті здійснення, представлений винахід передбачає виділену полінуклеотидну молекулу, яка включає послідовність ДНК, що кодує інфекційну молекулу РНК, яка кодує вірус PRRS, який генетично модифікований таким чином, що як вакцина він викликає ефективну імунізаційну відповідь проти вірусу PRRS у тварин свиней. У певних аспектах винахід передбачає послідовність ДНК, як викладено у даному документі, яка включає SEQ ID NO.:5. Кодуючі послідовності, які є, щонайменше, на 80 % ідентичними до SEQ ID NO.:5 (і більш переважно, що має 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність до неї), також є функціональними в практиці згідно представленому винаходу, за умови, що вони забезпечують різні ключові мутації, як описано нижче, які відрізняють зазначені ізоляти від інших штамів або штамів-попередників.

Додатковий варіант здійснення винаходу включає послідовності РНК, що відповідають вищезгаданім полінуклеотидам ДНК, і які можуть бути експресовані з них, і фактично віруси, які можуть бути зібрані з такої експресії. Додаткові атенуйовані європейські віруси PRRS, корисні у практиці винаходу, включають ті, що кодуються послідовністю ДНК, яка гібридизується з комплементом послідовності ДНК SEQ ID NO.:5 в дуже жорстких умовах, які включають гібридизацію для фільтрації пов'язаної ДНК у 0,5 М NaHPO₄, 7 % SDS, 1мМ ЕДТУ при 65 градусах С, та промиванні у 0,1 SSC/0/1 %SDS при 68 градусах С.

Для цілей винаходу "відповідний" означає, що відносні послідовності можуть бути оптимально вирівняні з використанням алгоритму BLOSUM, як описано у Henikoff et al. Proc Natl. Acad. Sci., USA, 89, pp. 10915-10919, 1992.

В певних варіантах винаходу, винахід передбачає плазмиду, яка включає виділену полінуклеотидну молекулу, як викладено в даному документі, і промотор, здатний транскрибувати полінуклеотидну молекулу в прийнятній клітині-господарі. В іншому варіанті

винаходу, європейська PRRS-кодуюча послідовність плазмід в даному документі додатково кодує один або декілька гетерологічних антигенних епітопів, що детектуються. Представлений винахід передбачає трансфіковану клітину-господар, яка включає плазмиду, представлену в даному документі.

В іншому аспекті, представлений винахід передбачає вакцину для захисту тварини свині від зараження вірусом PRRS. Вакцина може включати європейський вірус PRRS, що кодується молекулою інфекційної РНК, причому кожна з молекул інфекційної РНК кодується виділеною полінуклеотидною молекулою, як викладено в даному документі. В ще іншому аспекті, вакцина включає плазмиду або вірусний вектор, який включає полінуклеотид в даному документі. Вакцина, представлена в даному документі, може необов'язково включати вакцинний носій, прийнятний для ветеринарного застосування. В одному важливому аспекті, вакцина володіє зниженою інгібуючою дією на інтерферон- α в порівнянні з європейськими вірусами немутантного типу та іншими доступними вакцинами.

В одному варіанті винаходу, представлений винахід передбачає діагностичний набір, який включає полінуклеотидні молекули, які розрізняються (так званий тест DIVA) між тваринами свинями, природно інфікованими польовим штамом вірусу PRRS, і тваринами свинями, вакцинованими модифікованою живою вакциною, представленою в даному документі.

В інших варіантах винаходу, винахід передбачає спосіб захисту тварини свині від зараження штамом вірусу PRRS, який включає введення тварині імуногенно захисної кількості вакцини згідно з формулою винаходу, представленою в даному документі.

Представлений винахід також передбачає плазмиду, здатну безпосередньо трансфектувати підходящу клітину-господар і експресувати вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (PRRS) з підходящої клітини-господаря, таким чином, трансфікованої, причому плазмиди містить: (а) послідовність ДНК, що кодує інфекційну молекулу РНК, яка кодує вірус PRRS, та (b) промотор, здатний транскрибувати зазначену молекулу інфекційної РНК.

В наступних переважних варіантах винаходу, зазначена плазмиди містить промотор, який являє собою еукаріотичний промотор, здатний забезпечувати запуск ДНК в цільових еукаріотичних клітинах, або прокаріотичний або фаговий промотор, здатний спрямовувати транскрипцію плазмиди *in vitro*. Винахід аналогічним чином передбачає спосіб генерування вірусу PRRS, де спосіб включає трансфектування підходящої клітини-господаря відповідної плазмиди та отримання вірусу PRRS, генерованого трансфікованою клітиною.

Винахід також передбачає клітини-господарі, трансфіковані полінуклеотидними молекулами, та передбачає вакцини для захисту тварини свині від зараження вірусом PRRS, причому вакцина включає: (а) генетично модифікований європейський вірус PRRS, що кодується такими вищезазначеними полінуклеотидними молекулами, або (b) зазначену інфіковану молекулу, або (c) зазначену полінуклеотидну молекулу у формі плазмиди, або (d) вірусний вектор, що містить зазначену полінуклеотидну молекулу, причому вірус PRRS здатний викликати ефективну імунозахисну відповідь проти зараження вірусом PRRS у кількості, ефективній для створення імунозахисту проти інфекції, та носій, який підходить для застосування у ветеринарії.

Зокрема, винахід включає спосіб генерування європейського вірусу репродуктивного і респіраторного синдрому свиней (PRRS), причому спосіб включає трансфектування підходящої еукаріотичної клітини-господаря композицією, вибраної з групи, що складається з:

(а) плазмиди, яка містить (1) послідовність ДНК, що кодує інфекційну молекулу РНК, яка кодує європейський вірус PRRS, причому зазначена кодуюча послідовність ДНК являє собою SEQ ID: NO:5, або кодуючу послідовність ДНК, яка є, щонайменше, на 85 % ідентичною до SEQ ID NO:5, і (2) промотор, здатний управляти транскрипцією зазначеної послідовності ДНК, кодуючу зазначену молекулу інфекційної РНК у зазначеній підходящої клітині-господарі; і

(b) інфекційної молекули РНК PRRS, отриманої в результаті транскрипції *in vitro* плазмиди, що містить послідовність ДНК, кодуючу зазначену інфекційну молекулу РНК PRRS, кодуючу європейський вірус PRRS, причому зазначена кодуюча послідовність ДНК являє собою SEQ ID: NO:5, або кодуючу послідовність ДНК, яка є, щонайменше, на 85 % ідентичною до SEQ ID NO:5, причому, для випадків (а) та (b) використовується кодуюча послідовність, яка є, щонайменше, на 85 % ідентичною до SEQ ID NO:5, і містить одну або декілька конкретних мутацій в порівнянні з еталонною послідовністю.

В переважних прикладах, для поросеня (або самця, або самки) може бути передбачена як захисна, так і безпечна вакцинація в одноразовій дозі у віці менше одного дня, наприклад, через 8-16 годин після народження, до двотижневого віку, або тритижневого віку, приймаючи до уваги те, що поросеня може бути відлучене від матері в будь-який момент від приблизно двох- до тритижневого віку. Таким чином, представлений винахід є, як правило, застосовним до ранньої вакцинації одноразовою дозою, тобто в будь-який час в перший день життя (від народження до

24-годинного віку), аналогічно у 2-ий день, 3-ій день, 4-ий день, 5-ий день, 6-ий день, 7-ий день, 1-10-ий дні, 1-14-ий дні, та 1-21-ий дні, або просто вакцинації, яка проводиться раніше, ніж приблизно у день відлучення від матері. При бажанні можуть бути використані дві або більше доз.

5 Рання вакцинація (звичайно внутрішньом'язовим або інтраназальним шляхом) проти вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (PRRSV) за таких умов також забезпечує ранній початок захисного імунітету, наприклад, у віці від однієї до восьми тижнів; або приблизно від двох до шести тижнів після вакцинації; та звичайно приблизно через 28 днів після вакцинації.

10 Вакцинація відповідно до практики винаходу, як правило, забезпечує тривалість імунітету у поросят, яка складає приблизно 23-28 тижнів, звичайно, щонайменше, приблизно 26 тижнів, що є цілком очікуваною тривалістю життя ринкової свині. Таким чином, програми вакцинації, які стали можливими завдяки представленому винаходу, захищають поросят, коли вони найбільш уразливі для інфекції і з ними найлегше поводитися. Така вакцинація також дозволяє настанню імунітету збігатися з моментом, коли відлучені поросята віддаляються від свиноматки, і можуть бути транспортовані в інші господарства, де може бути присутнім подальший ризик зараження PRRSV. Вакцини згідно винаходу також є високо ефективними для захисту кабанів; та свиноматок і молодих свиней, таким чином, непрямо захищаючи потомство яке не народилося. Хоча переважним є припускати внутрішньом'язову та інтраназальну вакцинацію, інші способи також є застосовними.

20 В додатковому прикладі винаходу, хоча він і менш переважний, поліпептид CD163, що експресується рекомбінантними клітинами, в яких культивується європейський вірус PRRS (і, таким чином, попередньо адаптований до інфекції та росту у тварин свиней), не є свинячим CD163, але скоріше CD163 ссавця, що має амінокислотну послідовність, яка відносно близька до свинячої послідовності, наприклад, щонайменше, на 90 % ідентичної послідовності SEQ ID NO: 2 або 14 US 7,754,464. Більш переважно, щоб дана амінокислотна ідентичність складала 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %.

25 Винахід також передбачає діагностичні набори, що містять полінуклеотидні молекули, які розрізняють тварин свиней, природним чином інфікованих польовим штамом вірусу PRRS, і тварин свиней, вакцинованих вакцинами згідно винаходу, причому ці вакцини (віруси) переважно свідчать про зниження ефекту інгібування інтерферону- α в порівнянні з немутантним типом.

30 Винахід, крім того, передбачає репрезентативні послідовності всього геному PRRSV, отримані з європейського (бельгійського) ізоляту PRRSV 96V198. Ізолят 96V198 сам по собі був одержаний у 1996 році професором Hans Nauwynck, Ghent University, Belgium, з легень молоді свині з респіраторними ознаками (пасаж 0, таким чином, був вилучений із сироватки зараженої свині (SEQ ID NO: 1).

35 Пасаж 1 (SEQ ID NO:2) є результатом одного пасажу на первинних альвеолярних макрофагах свині (PAM). Всі наступні пасажі виконані на клітинній лінії BHK21-C12-26. Пасаж 9 (SEQ ID NO:3) виконується безпосередньо перед біологічним клонуванням вірусу за допомогою трьох раундів обмеженого розведення. Пасаж 14 (SEQ ID NO:4) являє собою клон 1 (з шести клонів, досліджених та оцінених). Клон 1 продовжував перетворюватися в головний виробничий вірус в пасажі 44, та MSV+5 пасажів ставали продуктом Suvaxyn® PRRS MLV в пасажі 49 (SEQ ID NO:5). Всі геноми мають довжину 15 092 нуклеотидів. Всі геноми є, щонайменше, на 99,5 % ідентичними один до одного, і є приблизно на 92 % ідентичними вірусу Лелістада.

45 Короткий опис креслень

Фігура 1 представляє повнорозмірну нуклеотидну послідовність (15 092 основ) ізоляту пасажу 49 для продукту Suvaxyn® PRRS MLV, SEQ ID NO:5.

Короткий опис переліку послідовностей

50 SEQ ID NO:1 представляє пасаж 0 ізоляту PRRSV 96V198.

SEQ ID NO:2 представляє пасаж 1 ізоляту PRRSV 96V198.

SEQ ID NO:3 представляє пасаж 9 ізоляту PRRSV 96V198.

SEQ ID NO:4 представляє пасаж 14 ізоляту PRRSV 96V198.

SEQ ID NO:5 представляє пасаж 49 ізоляту PRRSV 96V198.

55 SED ID NOS: 6-8 представляють послідовності праймера ПЛР.

Детальний опис винаходу

60 Як використовується в даному описі та формулі винаходу, що додається, форми однини включають посилення множини, якщо контекст явно не пропонує інше. Таким чином, наприклад, посилення на "спосіб" включають в себе один або декілька способів і/або стадій, описані в даному документі, які стануть очевидними для спеціалістів в даній галузі техніки після

прочитання даного розкриття тощо.

Якщо не зазначено інше, всі технічні та наукові терміни, використовувані в даному документі, мають те ж значення, яке звичайно розуміють звичайні спеціалісти в даній галузі техніки, до якої належить даний винахід. Хоча будь-які способи та матеріали, подібні або еквівалентні тим, які описані в даному документі, можуть бути використані під час практичного застосування або випробування винаходу, переважні способи та матеріали описуються зараз.

Здійснення на практиці представленого винаходу буде використовувати, якщо не вказано інше, загальноприйняті способи вірусології, імунології, мікробіології, молекулярної біології та методики рекомбінантних ДНК, відомі фахівцям в даній галузі, багато з яких описані нижче з метою ілюстрації. Такі методики повністю пояснюються в літературі. Дивіться, наприклад, Sambrook, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis et al. *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).

"Північноамериканський вірус PRRS" означає будь-який вірус PRRS, який має генетичні характеристики, зв'язані з ізолятом північноамериканського вірусу PRRS, таким як, але не обмежуючись цим, вірус PRRS, який був вперше виділений у Сполучених Штатах приблизно на початку 1990-х років (дивіться, наприклад, Collins, J. E., et al., 1992, *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:117-126); Ізолят північноамериканського вірусу PRRS MN-1b (Kwang, J. et al., 1994, *J. Vet. Diagn. Invest.* 6:293-296); штам Quebec LAF-exp91 PRRS (Mardassi, H. et al., 1995, *Arch. Virol.* 140:1405-1418); та Північноамериканський вірус PRRS ізолят VR 2385 (Meng, X.-J et al., 1994, *J. Gen. Virol.* 75:1795-1801). Генетичні характеристики відносяться до подібності геномної нуклеотидної послідовності та подібності амінокислотної послідовності, характерною для штамів північноамериканського вірусу PRRS. Штами вірусу азійського PRRS звичайно свідчать про 80-95 % ідентичності нуклеотидної послідовності з північноамериканськими штамми (дивіться величини за замовчуванням для алгоритму Clustal W в наборі програмного забезпечення Lasergene, DNASTAR, Inc.), та північноамериканські штамми є, аналогічним чином, на від приблизно 85 % до 100 % ідентичними один до одного.

"Європейський вірус PRRS" (PRRSV-1, або раніше PRRSV тип 1) відноситься до будь-якого штаму вірусу PRRS, який має генетичні характеристики, зв'язані з вірусом PRRS, який був вперше виділений у Європі близько 1991 року (дивіться, наприклад, Wensvoort, G., et al., 1991, *Vet. Q.* 13:121-130, вірус Лелістада, дивіться, також патенти США 5,620,691 та 6,197,310). Європейський вірус PRRS також, як правило, відноситься до вірусів, який має повнорозмірні нуклеотидні послідовності, які є приблизно на 80 % ідентичними або вище до ізоляту Лелістада. Слід відмітити, що в межах PRRSV-1, прийшли до визначення підтипу, так що вірус Лелістад був названий прототипом для підтипу 1 та вірусу Лена (U. Kamiyachuk et al., *BMC Veterinary Research*, 2010, Vol 6, No. 30) став називатися як прототип підтипу 3. Дані два віруси приблизно охоплюють максимальні поточні розбіжності PRRSV-1, і таким чином, наприклад, під час використання ORF5, Лелістада та Лена є приблизно на 82,8 % ідентичними на нуклеотидному рівні, та з використанням повних геномів, Лелістад та Лена є приблизно на 80,7 % ідентичними на нуклеотидному рівні. Оптимізація вирівнювання незначно варіюється в залежності від параметрів алгоритму, але рідер звичайно посиляється на значення за замовчуванням для алгоритму Clustal W у програмному забезпеченні Lasergene (DNASTAR, Inc.).

Європейські штамми PRRS, як правило, приблизно на 60 % ідентичні як північноамериканським, так і азійським (китайським) штамам. Наприклад, під час використання нуклеотидної послідовності ORF5 (яка дає добру або достовірну оцінку всього геному, коли повні геноми невідомі), прототип вірусу Лелістада PRRSV-1 та прототип північноамериканського штаму VR2332 є приблизно на 65,0 % ідентичними на нуклеотидному рівні. Використовуючи нуклеотидну послідовність повного геному, прототип вірусу Лелістада і прототип вірусу VR2332 є приблизно на 58,6 % ідентичними на нуклеотидному рівні, знову використовуючи значення за замовчуванням для процитованого алгоритму Clustal W.

"Ефективна імунозахисна відповідь", "імунозахист", і подібні терміни для цілей представленого винаходу, означають імунну відповідь, направлену проти одного або декількох антигенів епітопів патогену, таким чином, щоб захистити від інфекції, викликані патогеном, вакциновану тварину. Для цілей представленого винаходу, захист від зараження патогеном включає не тільки абсолютну профілактику інфекції, але також будь-яке зниження ступеня або швидкості зараження патогеном, що виявляється, або будь-яке зниження тяжкості захворювання, що виявляється або будь-який симптом або стан, викликане в результаті зараження патогеном у вакцинованій тварини в порівнянні з невакцинованою інфікованою

твариною. Ефективна імунізаційна відповідь може бути індукована у тварин, які раніше не були інфіковані патогеном та/або не інфіковані патогеном під час вакцинації. Ефективна імунізаційна відповідь також може бути індукована у тварини, вже зараженої патогеном під час вакцинації.

Генетично модифікований вірус PRRS є "аттенуйованим", якщо він менш вірулентний, ніж його немодифікований батьківський штам. Штам є "менш вірулентним", якщо він показує статистично значуще зниження одного або декількох параметрів, що визначають тяжкість захворювання. Такі параметри можуть включати рівень віремії, лихоманку, тяжкість респіраторного розладу, тяжкість репродуктивних симптомів або кількість або тяжкість уражень легень тощо.

"Клітина-господар, здатна підтримувати реплікацію вірусу PRRS" означає клітину, яка є здатною генерувати інфекційний PRRS під час зараження вірусом згідно винаходу. Такі клітини включають свинячі клітини моноцитарної/макрофагової клітинної лінії, такі як свинячі альвеолярні макрофагові клітини та похідні, клітини нирки мавпи MA-104 та похідні, такі як клітини MARC-145; та клітини, трансфіковані геном, кодуєчим рецептор вірусу PRRS (дивіться патент США 9,102,912, який відноситься до призначення поверхневого білку CD163 ссавцю як нормальний рецептор клітини вірусу PRRS). Термін "клітина-господар, здатна підтримувати реплікацію вірусу PRRS" також може включати клітини у живій свині.

"Відкрита рамка зчитування", або "ORF", як використовується в даному документі, означає мінімальну нуклеотидну послідовність, необхідну для кодування конкретного білку вірусу PRRS без проміжного стоп-кодона.

"Свинячий" та "свині" використовуються взаємозаміно в даному документі та відносяться до будь-якої тварини, яка є членом родини Suidae, такою як, наприклад, свиня. Вакцини та протоколи способів згідно винаходу є застосовуваними до всіх свиней, будь то самці будь-якого віку, або самка будь-якого віку, включаючи свиноматок та молодих свиней, і такі способи також здатні непрямо захищати самців та самок поросят за допомогою захисту, який вводять матері-свиноматці. Термін "PRRS вірус", як використовується в даному документі, якщо не зазначено інше, означає будь-який штам з або північноамериканського, азіатського або європейського вірусу PRRS.

"PRRS" охоплює симптоми захворювання у свиней, викликаного інфікуванням вірусом PRRS (PRRSV). Приклади таких симптомів включають, але не обмежуються цим, лихоманку, аборт у вагітних самок, респіраторний дистрес, ураження легень, втрату апетиту та смертність у молодняка свиней. Як використовується в даному документі, вірус PRRS, який є "нездатним продукувати PRRS" відноситься до вірусу, який може інфікувати свиню, але який не викликає жодних симптомів захворювання, звичайно зв'язаних з інфекцією PRRS у свині.

"Трансфікована клітина-господар" означає практично будь-яку клітину-господар, яка під час трансфікування РНК вірусу PRRS, може продукувати, щонайменше, перший раунд віріонів PRRS.

"Інфекційна молекула ДНК", для цілей представленого винаходу, являє собою молекулу ДНК, яка кодує необхідні елементи для підтримання реплікації, транскрипції та трансляції у функціональному віріоні з підходящою клітиною-господаря.

Аналогічним чином, "виділена полінуклеотидна молекула" відноситься до композиції речовини, яка включає полінуклеотидну молекулу згідно представленому винаходу, очищену або контрольовану до будь-якого ступеня, що виявляється з її природного стану, якщо вона існує.

Для цілей представленого винаходу, нуклеотидна послідовність другої полінуклеотидної молекули (або РНК, або ДНК) є "гомологічною" до нуклеотидної послідовності першої полінуклеотидної молекули, або має "ідентичність" до зазначеної першої полінуклеотидної молекули, причому нуклеотидна послідовність другої полінуклеотидної молекули кодує таку ж поліамінокислоту, що й нуклеотидна послідовність першої полінуклеотидної молекули виходячи з виродження генетичного коду, або коли вона кодує поліамінокислоту, яка є в достатньому ступені подібною поліамінокислоті, що кодується нуклеотидною послідовністю першої полінуклеотидної молекули таким чином, щоб бути корисною у практиці представленого винаходу. Гомологічні полінуклеотидні послідовності також відносяться до смислового та антисмислового ланцюгів та у всіх випадках до комплементу будь-яких таких ланцюгів. Для цілей представленого винаходу, полінуклеотидна молекула корисна для практичного застосування представленого винаходу, і тому є гомологічною або має ідентичність, причому вона може бути використана як діагностичний зонд для виявлення присутності вірусу PRRS або вірусного полінуклеотиду у зразку рідини або тканини інфікованої свині, наприклад, використовуючи стандартні методики гібридизації або ампліфікації. Як правило, нуклеотидна

послідовність другої полінуклеотидної молекули являє собою гомологічну нуклеотидну послідовність першої полінуклеотидної молекули, якщо вона має, щонайменше, приблизно 70 % ідентичність нуклеотидної послідовності до нуклеотидної послідовності першої полінуклеотидної молекули на основі алгоритму BLASTN (National Center for Biotechnology Information, також відомого як NCBI, (Bethesda, Maryland, USA) інституту United States National Institute of Health). У конкретному прикладі для розрахунків відповідно до практичного застосування згідно представленого винаходу, робиться посилання на BLASTP 2.2.6 [Tatusova TA and TL Madden, "BLAST 2 sequences-a new tool for comparing protein and nucleotide sequences." (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250.]. Коротко, дві амінокислотні послідовності вирівняні для оптимізації показників вирівнювання з використанням штрафу за відкриття пробілу 10, штрафу за розширення пробілу 0,1 та матриці оцінки "blosum62" від Henikoff та Henikoff (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:10915-10919. 1992). Відсоток ідентичності потім розраховується наступним чином: загальна кількість ідентичних збігів x 100/ розділене на довжину більш довгої послідовності + кількість пробілів, введених у більш довгу послідовність для вирівнювання двох послідовностей.

Переважаюча гомологічна нуклеотидна послідовність має, щонайменше, приблизно 75 % ідентичність нуклеотидної послідовності, навіть більш переважно, щонайменше, приблизно 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % та 99 % ідентичність нуклеотидної послідовності. Оскільки генетичний код є виродженим, гомологічна нуклеотидна послідовність може включати будь-яку кількість "мовчазних" змін основ, тобто нуклеотидних заміщень, які, проте, кодують одну й ту ж саму амінокислоту.

Гомологічна нуклеотидна послідовність може додатково містити немовчазні мутації, тобто заміщення, делеції, або додавання основ, які в результаті призводять до амінокислотних відмінностей у поліамінокислоті, що кодується, за умови, що послідовність залишається, щонайменше, приблизно на 70 % ідентичною до поліамінокислоти, що кодується першою нуклеотидною послідовністю, або інше є корисним для практичної реалізації представленого винаходу.

В цьому відношенні можуть бути зроблені певні консервативні амінокислотні заміщення, які, як правило, розпізнаються, при цьому не активуючи загальну функцію білку: наприклад, у відношенні позитивно заряджених амінокислот (та навпаки), лізину, аргініну та гістидину; у відношенні негативно заряджених амінокислот (та навпаки), аспарагінової кислоти та глютамінової кислоти; та у відношенні визначених груп нейтрально заряджених амінокислот (та у всіх випадках, а також навпаки), (1) аланін та серін, (2) аспарагін, глютамін та гістидин, (3) цистеїн та серін, (4) гліцин та пролін, (5) ізолейцин, лейцин та валін, (6) метіонін, лейцин та ізолейцин, (7) фенілаланін, метіонін, лейцин та тирозин, (8) серін та треонін, (9) триптофан та тирозин, (10) і наприклад, тирозин, триптофан та фенілаланін. Амінокислоти можуть бути класифіковані відповідно до фізичних властивостей та внеску у вторинну та третинну структуру білку. Консервативна заміна відома в даній галузі техніки як заміщення однієї амінокислоти іншою амінокислотою, яка має подібні властивості. Типові консервативні заміщення можуть бути знайдені у WO 97/09433, сторінка 10, опублікована 13 березня 1997 року (PCT/GB96/02197, подана 6 вересня 1996 року). Альтернативно, консервативні амінокислоти можуть бути згруповані, як описано у Lehninger, (Biochemistry, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY:NY (1975), pp. 71-77). Додаткові підходящі консервативні зміни та їх застосування описані нижче.

Гомологічні нуклеотидні послідовності можуть бути визначені шляхом порівняння нуклеотидних послідовностей, наприклад, з використанням BLASTN, зазначеного вище. Альтернативно, гомологічні нуклеотидні послідовності можуть бути визначені шляхом гібридизації у вибраних умовах. Наприклад, нуклеотидна послідовність другої полінуклеотидної молекули є гомологічною SEQ ID NO:5 (або будь-якій іншій конкретній полінуклеотидній послідовності), якщо вона гібридизується з комплементом SEQ ID NO:5 в помірно жорстких умовах, наприклад, гібридизація зі зв'язаною на фільтрі ДНК у 0,5 M NaHPO₄, 7 % до децилсульфату натрію (SDS), 1 mM EDTO при 65 °C, та промиванні у 0,2xSSC/0,1 % SDS при 42 °C (дивіться Ausubel et al editors, Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, 1994, pp. 6.0.3 to 6.4.10), або умови, які в протилежному випадку будуть в результаті призводити до гібридизації послідовностей, які кодують вірус PRRS як визначено нижче. Модифікації в умовах гібридизації можуть бути визначені емпірично або точно розраховані на основі довжини і відсоткового співвідношення основ гуанозин/цитозин (GC) зонду. Умови гібридизації можуть бути розраховані, як описано у Sambrook, et al., (Eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1989), pp. 9.47 to 9.51.

В іншому варіанті винаходу, друга нуклеотидна послідовність є гомологічною SEQ ID NO:5 (або будь-якої іншої послідовності згідно винаходу), якщо вона гібридизується з комплементом

SEQ ID NO:5 у дуже жорстких умовах, наприклад, гібридизація зі зв'язаною на фільтрі ДНК в 0,5 M NaHPO₄, 7 % SDS, 1 mM ЕДТО при 65 °C, та промивання у 0,1xSSC/0,1 % SDS при 68 °C, як відомо в даній галузі з рівня техніки (Ausebel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing и Wiley Interscience, New York, 1989).

Крім того, слід розуміти, що виділені полінуклеотидні молекули та виділені молекули РНК згідно представленого винаходу включають як синтетичні молекули, так і молекули, отримані за допомогою рекомбінантних технологій, таких як клонування та транскрипція *in vitro*.

Полінуклеотидні молекули можуть бути генетично мутовані з використанням рекомбінантних способів, відомих спеціалістам в даній галузі, включаючи сайт-направлений мутагенез або випадковий мутагенез, такий як вплив хімічних мутагенів або радіації, як відомо в даній галузі. "Мутації можуть бути виконані стандартними способами, відовими в даній галузі з рівня техніки, наприклад, шляхом сайт-направленого мутагенезу (дивіться, наприклад, Sambrook et al.(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) інфекційної копії, як описано (наприклад, Meulenberg et al., Adv. Exp. Med. Biol., 1998, 440:199-206).

В зв'язку з наданням переважних послідовностей європейського вірусу PRRS, які є як безпечними, так і ефективними під час введення поросят перед відлученням від матері, серед амінокислотних положень, які можуть бути модифіковані, можуть бути виділені наступні. Під час визначення цих специфічних мутацій, звичайно, відмічається, що консервативні заміщення для даних переважних амінокислотних залишків, як визначено безпосередньо вище, також можуть бути використані. Під час визначення переважних амінокислот, що кодуються відповідні/вихідні амінокислоти немутантного ізоляту штаму 96V198 також показані у скобках, таким чином, пасаж 0 (SEQ ID NO: 1) порівнюють з пасажом 49 (переважний вакцинний матеріал, SEQ ID NO: 5). Таким чином, для амінокислотної послідовності, що кодується з ORF1a, S знаходиться в амінокислотному положенні 19 (N); Y в - амінокислотному положенні 24 (F); A - в амінокислотному положенні 156 (T); Y - в амінокислотному положенні 157 (H); D - в амінокислотному положенні 268 (N); H - в амінокислотному положенні 294 (Y); Y - в амінокислотному положенні 416 (C); S - в амінокислотному положенні 742 (P); L - в амінокислотному положенні 884 (F); P - в амінокислотному положенні 908 (S); K - в амінокислотному положенні 916 (E); K - в амінокислотному положенні 977 (E); S - в амінокислотному положенні 1138 (P); F - в амінокислотному положенні 1160 (L); S - в амінокислотному положенні 1500 (P); R - в амінокислотному положенні 2094 (Q); P - в амінокислотному положенні 2254 (S); та L - в амінокислотному положенні 2290 (F). Для амінокислотної послідовності, що кодується з ORF1b, S- в амінокислотному положенні 567 (N); та H- в амінокислотному положенні 912 (Q). Для амінокислотної послідовності, що кодується з ORF2a, L знаходиться в амінокислотному положенні 22 (S); F - в амінокислотному положенні 88 (V); M - в амінокислотному положенні 94 (I); та F - в амінокислотному положенні 95 (L). Для амінокислотної послідовності, що кодується з ORF2b, L знаходиться в амінокислотному положенні 47 (F). Для амінокислотної послідовності, що кодується з ORF3, S знаходиться в амінокислотному положенні 52 (T). Для амінокислотної послідовності, що кодується з ORF4, T знаходиться в амінокислотному положенні 151 (I). Для амінокислотної послідовності, що кодується з ORF5, F знаходиться в амінокислотному положенні 20 (L); та D знаходиться в амінокислотному положенні 37 (N). Для амінокислотної послідовності, що кодується з ORF5a, V знаходиться в амінокислотному положенні 18 (A); та R знаходиться в амінокислотному положенні 35 (Q).

Відповідно, представлений винахід, крім того, передбачає спосіб отримання генетично модифікованого європейського вірусу PRRS, причому спосіб включає мутування послідовності ДНК, кодуючої інфекційну молекулу РНК, яка кодує вірус PRRS, як описано вище, та експресує генетично модифікований вірус PRRS з використанням підходящої експресійної системи. Генетично модифікований вірус PRRS може бути експресований з виділеної полінуклеотидної молекули з використанням підходящих експресійних систем, як правило, відомих в даній галузі з рівня техніки, приклади яких описані в представленій заявці. Наприклад, виділена полінуклеотидна молекула може знаходитись у формі плазміди, здатною експресувати вірус, що кодується у прийнятній клітині-господарі *in vitro*, як більш детально описується нижче.

Послідовності N-білку північноамериканського PRRSV є висококонсервативними, та зазначені послідовності мають приблизно 93-100 % ідентичність один з одним. N-білки північноамериканського та європейського PRRSV є приблизно на 57-59 % ідентичними и мають спільні структурні мотиви. Як правило, під час порівняння кодуючих послідовностей та ізолятів PRRS, які можуть бути пронумеровані по-різному відносно конкретних нуклеотидів або кодованих амінокислот, ідентифікація підходящих областей легко досягається шляхом

ідентифікації збережених характерних амінокислот у штамі PRRS, який цікавить і зіставлення її з еталонним.

Технологія рекомбінантної ДНК включає надзвичайно різноманітні та потужні методи молекулярної біології, спрямовані на модифікування нуклеїнових кислот на рівні ДНК, і дозволяє аналізувати і модифікувати геноми на молекулярному рівні. В цьому відношенні віруси, такі як вірус PRRS через скромний розмір його геному, особливо схильні до таких маніпуляцій. Однак, технологія рекомбінантної ДНК не відразу застосована до не ретровірусних РНК-вірусам, тому що дані віруси не охоплюють проміжну стадію ДНК у своїй реплікації. Для таких вірусів необхідним є розробити інфекційні клони кДНК, перш ніж технологія рекомбінантних ДНК може бути застосована до їх геному для створення модифікованого вірусу. Інфекційні клони можуть бути отримані шляхом конструювання повнорозмірної (геномної довжини) кДНК (в даному документі використовується в широкому сенсі ДНК-копії РНК, та не тільки в суворому сенсі ДНК-копії мРНК) досліджуваного вірусу, після чого інфекційний транскрипт синтезується *in vivo* в клітинах, трансфікованих повнорозмірною кДНК, але інфекційні транскрипти також можуть бути отримані шляхом транскрипції *in vitro* з повнорозмірної кДНК у плазміді, яка має прокаріотичний промотор, в присутності транскрипційного коктейлю, або знову *in vitro* з використанням легованих фрагментів кДНК часткової довжини, які містять повний вірусний геном. У всіх випадках транскрибування РНК несе всі модифікації, які були введені у кДНК, та може бути використана для подальшого пасирування модифікованого таким чином вірусу.

Отримання інфекційного клону ізоляту європейського вірусу PRRS або вірусу Лелістад описується в патенті США № 6,268,199, який, таким чином, повністю включений як посилання. Отримання інфекційного клону кДНК ізоляту північноамериканського вірусу PRRS, позначеного P129 (Lee et al., 2005; Yoo et al., 2004) описується в патенті США № 6,500,662 який, таким чином, повністю включений як посилання. Послідовність P129 кДНК розкрита в Genbank з реєстраційним номером AF494042 та в патенті США № 6,500,662. В нашій роботі, наведеної нижче, використовується такий інфекційний клон, який в контексті плазмід експресується безпосереднім раннім промотором CMV та позначається як pCMV-S-P129, і також розкривається в патенті США № 6,500,662. Як описується в патенті США № 6,500,662 існують інші плазмідні та промотори, підходящі для використання в даному документі.

Враховуючи повну послідовність будь-якої відкритої рамки зчитування, що представляє інтерес, та місцезнаходження амінокислотного залишку, що цікавить, спеціалісту в даній галузі просто потрібно звернутися до таблиці кодонів для того, щоб сконструювати зміни в конкретному бажаному положенні.

Кодони представляють собою триплетні послідовності нуклеотидів в мРНК та відповідні їм молекули кДНК. Кодони характеризуються основним урацилом (U), коли присутній в молекулі мРНК, але характеризуються основним тимідином (T), коли присутній в ДНК. Проста зміна в кодоні такого ж амінокислотного залишку в полінуклеотиді не змінює послідовність або структуру кодованого поліпептиду. Очевидно, що, коли фраза, яка стверджує, що конкретна 3-нуклеотидна послідовність "кодує" будь-яку конкретну амінокислоту, спеціаліст в даній галузі техніки визнає, що наведена вище таблиця надає засоби для ідентифікації конкретних нуклеотидів, що розглядаються. Наприклад, якщо конкретна тринуклеотидна послідовність кодує лізин, наведена вище таблиця розкриває, що двома можливими триплетними послідовностями є AAA та AAG. Гліцин кодується GGA, GGC, GGT (GGU, якщо в РНК) та GGG. Щоб замінити залишок лізину на гліцин в білку, що кодується, можна замінити триплет AAA або AAG на будь-який з GGA та GGC, GGT або GGG у кодуєчій нуклеїновій кислоті.

Дослідження по імунобіології вірусу PRRS дозволяють припустити, що взаємодія вірусу PRRS з PDC заслуговує вивчення. Цей тип клітин складає 0,2 % -0,8 % мононуклеарних клітин периферичної крові у людей, мишей, щурів, свиней та мавп. Не дивлячись на дефіцит, дана клітина є важливим компонентом вродженої імунної системи і здатна секретувати рясні кількості IFN- α після вірусної стимуляції. Саме завдяки секреції IFN- α PDC відіграють основну роль в регуляції противірусного вродженого та адаптивного імунітету, оскільки вони стимулюють функцію природних клітин-кілерів, В-клітин та Т-клітин. Крім того, дозріванню свинячих моноцитарного походження дендритних клітин (MoDC) сприяє IFN- α , секретований PDC, що в результаті призводить до підвищеної здатності MoDC представляти антиген та активувати Т-клітини. На більш пізній стадії вірусної інфекції PDC диференціюються в унікальний тип зрілої дендритної клітини, яка безпосередньо регулює функцію Т-клітин та спрямовує диференціювання Т-клітин в клітини, здатні секретувати IFN- γ , який є основним медіатором противірусного імунітету проти вірусів, які включають вірус PRRS. Не дивно, що існують віруси людини, такі як респіраторний синцитіальний вірус та вірус кору, які, як відомо, пригнічують

здатність PDC секретувати IFN- α . Даний інгібуючий ефект, як вважається, грає роль у перевазі гуморальної імунної відповіді та зв'язаної з нею імунопатології, що спостерігається в результаті інфікування даними вірусами, а також у підвищеному сприйнятті господаря до вторинних бактеріальних та вірусних інфекцій.

Як вже згадувалось, існує багато відомих штамів та ізолятів європейського, північноамериканського та китайського PRRS, і нові штами продовжують розвиватися або бути виділеними. Хоча між всіма даними штамми існує високий рівень гомології амінокислотної послідовності, кваліфіковані спеціалісти в даній галузі відразу зрозуміють, що деякі варіації дійсно існують, і дійсно можна скористатися перевагами цих відмінностей та подібностей для подальшого покращення фенотипових властивостей всіх вакцинних штамів.

По перше, що стосується всіх амінокислотних мотивів, визначених SEQ ID NOS, як зазначено нижче, можливим звичайно є перевірити відповідні експресовані білкові послідовності з будь-яких інших європейських PRRS, щоб знайти відповідний амінокислотний мотив, навіть якщо додаткові зміни відбулися у таких інших штаммах, в результаті еволюції, викликаючи заміщення та/або видалення, або додавання. Таким чином, можливим повинно бути легко ідентифікувати зіставний мотив в іншому штамі PRRS, якщо, наприклад, валін у ньому заміщений ізолейцином, або лейцином, або будь-яким іншим залишком, або якщо залишок просто відсутній або додано додатковий залишок. Існують численні комп'ютерні програми для ідентифікації вирівнювань і, таким чином, визначення, чи відповідають мотиви поліпептидних послідовностей, наприклад, так звані таблиці Blosum (на основі заданого рівня відсоткової ідентичності), дивіться S. Henikoff et al. "Amino Acid Substitution matrices from protein blocks", Proc Natl Acad Sci, USA, 89(22), pp. 10915-10919, Nov 15, 1992., та дивіться також A. L. Lehninger et al. Principles of Biochemistry, 2005, MacMillan and Company, 4th edition. Консервативні амінокислотні зміни також розпізнаються на основі класифікації за 5 загальними групами: сульфідрил (Cys); ароматичні (Phe, Tyr, та Trp); основні (Lys, Arg, His); аліфатичні (Val, Ileu, Leu, Met), та гідрофільні (Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser та Thr). Таким чином, до практики винаходу входить модифікація будь-якої кодуєчої нуклеотидної послідовності європейського PRRS для включення у відповідне положення, що відповідає вимогам будь-яких з амінокислотних змін, забезпечуваних SEQ ID NO:5, навіть якщо одна або декілька інших амінокислот, які є сусідами із зазначеним положенням, були додані, видалені або замінені. Такі амінокислотні заміни, звичайно, можуть бути введені у відповідні кодуєчі нуклеотидні послідовності вірусу з використанням сайт-спрямованого мутагенезу, ПЛР та інших методів, які добре відомі в даній галузі з рівня техніки.

Загальний показник атенуації

Для того, щоб продемонструвати, що конкретний генетично модифікований штам є атенуованим, може бути використаний експеримент, описаний наступним чином.

Щонайменше 10 молодих свиней на групу включені у кожне випробування, які отримані з ферми, на якій був відсутній PRRSV. Тварин досліджують на відсутність специфічних сироваткових антитіл до вірусу PRRS та негативних відносно PRRSV. Всі тварини, включені у дослідження, мають одне й те саме джерело та породу. Розподілення тварин за групами було рандомізованим.

Контрольне зараження проводиться на 90-ий день вагітності за рахунок інтраназального застосування 1 мл PRRSV 10⁵ TCID₅₀ на ніздрю. Існує, щонайменше, три групи для кожного досліджуваного набору установок: одна група з немутантного типу вірусом; одна досліджувана група з контрольним зараженням можливо атенуованим вірусом; і одна група суворого контролю.

Дослідження вважається дійсним, коли суворі контролі залишаються PRRSV-негативними протягом всього періоду дослідження, та, щонайменше, на 25 % менше живих здорових поросят народжується в групі з контрольним зараженням немутантним типом в порівнянні із суровим контролем.

Атенуація, іншими словами, менша вірулентність, визначається як статистично значуща зміна одного або декількох параметрів, що визначають репродуктивну функцію або інші симптоми:

Значне зниження, щонайменше, одного із наступних параметрів для досліджуваної групи (можливо, атенуований вірус) в порівнянні з групою, інфікованої немодифікованим батьківським штамом, буде показником атенуації:

- a) частота мертвонароджених
- b) аборт під час або до 112 дня вагітності
- c) кількість муміфікованих поросят
- d) кількість муміфікованих поросят

е) смертність перед відлученням від матері.

Крім того, переважним є значне збільшення одного з наступних параметрів для досліджуваної групи в порівнянні з групою, інфікованої немодифікованим батьківським штамом:

ф) кількість поросят, відлучених на свиноматку

5 г) кількість живих здорових поросят, народжених на свиноматку.

Альтернативно, респіраторні симптоми та інші симптоми інфекції PRRSV можуть бути досліджені для встановлення атенуації.

Атенуований штам є цінним для формуляції вакцин. Представлена вакцина є ефективною, якщо вона захищає свиню від зараження вірусом PRRS. Вакцина захищає свиню від зараження вірусом PRRS, якщо, після введення вакцини одній або декільком не ураженим свиням, подальше контрольне зараження біологічно чистим вірусним ізолятом (наприклад, будь-якого європейського немутантного типу) в результаті призводить до зниження тяжкості будь-яких великих або гістопатологічних змін (наприклад, ураження легень) та/або симптомів захворювання в порівнянні з тими змінами або симптомами, які звичайно викликаються ізолятом у подібних свиней, які не захищені (тобто відносно відповідного контролю). Зокрема, представлена вакцина, як може бути показано, є ефективною шляхом введення вакцини одній або декільком підходящим свиням, які потребують цього, а потім після закінчення відповідного періоду часу (наприклад, 4 тижні), контрольного зараження великим зразком ($10^{(3-7)}$ TCID₍₅₀₎) біологічно чистого ізоляту PRRSV. Зразок крові потім забирають у зараженої свині приблизно через один тиждень, і потім роблять спробу виділити вірус зі зразка крові. Виділення великої кількості вірусу є показником того, що вакцина може бути неефективною, в той час як виділення зменшеної кількості вірусу (або зовсім жодного вірусу) є показником того, що вакцина може бути ефективною.

Таким чином, ефективність представленої вакцини може бути оцінена кількісно (тобто, зменшення відсотку консолідованої легеневої тканини в порівнянні з відповідною контрольною групою) або якісно (наприклад, виділення PRRSV з крові, виявлення антигену PRRSV у зразку тканини легень, мигдалини або лімфатичного вузла за допомогою імуноаналізу). Симптоми репродуктивного та респіраторного захворювання свиней можуть оцінювати кількісно (наприклад, температура/лихоманка) або напівкількісно (наприклад, наявність або відсутність одного, або декількох симптомів або зменшення тяжкості одного або декількох симптомів, таких як ціаноз, пневмонія, ураження легень тощо).

Не уражена свиня являє собою свиню, яка або не піддавалась впливу інфекційного агента, який викликає репродуктивну та респіраторну хворобу свині, або яка піддавалась впливу інфекційного агента, який викликає репродуктивну та респіраторну хворобу свині, але не проявляє симптомів захворювання. Уражена свиня являє собою свиню, яка проявляє симптоми PRRS, або з якої може бути виділений PRRSV.

Вакцини згідно представленого винаходу можуть бути сформульовані відповідно з прийнятою конвенцією для включення прийнятних носіїв для тварин, включаючи людей (якщо може бути застосовано), таких як стандартні буфери, стабілізатори, розріджувачі, консерванти та/або солубілізатори, і також можуть бути сформульовані для полегшення сповільненого вивільнення. Розріджувачі включають воду, фізіологічний розчин, декстрозу, етанол, гліцерин тощо. Добавки для ізотонічності включають, серед іншого, хлорид натрію, декстрозу, маніт, сорбіт та лактозу. Стабілізатори включають, серед іншого, альбумін. Інші підходящі вакцинні носії та добавки, включаючи ті, які особливо корисні під час формуляції модифікованих живих вакцин, відомі або будуть очевидними для спеціалістів в даній галузі з рівня техніки. Дивіться, наприклад, Remington's Pharmaceutical Science, 18th ed., 1990, Mack Publishing, яка включена в даний документ як посилання.

Вакцини згідно представленого винаходу можуть додатково включати один або декілька додаткових імуномодельючих компонентів, таких як, наприклад, ад'ювант або цитокін, серед інших. Необмежуючі приклади ад'ювантів, які можуть бути використані у вакцині згідно представленого винаходу, включають систему ад'ювантів RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), квасці, мінеральні гелі, такі як гель гідроксиду алюмінію, емульсії олія-в-воді, емульсії вода-в-олії, такі як, наприклад, повні та неповні ад'юванти Фрейнда, блок-співполімер (CytRx, Atlanta, Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), AMPHIGEN.RTM. ад'ювант, сапонін, Quil A або інша фракція сапоніну, монофосфориоліпід A, та авридіновий ліпід-амінний ад'ювант. Необмежуючі приклади емульсій олія-в-воді, що використовуються у вакцині згідно винаходу, включають модифіковані складі SEAM62 та SEAM 1/2. Модифікований SEAM62 являє собою емульсію олія-в-воді, яка містить 5 % (об./об.) сквалену (Sigma), 1 % (об./об.) SPAN.RTM. 85 детергенту (ICI Surfactants), 0,7 % (об./об.) TWEEN.RTM. 80 детергенту (ICI Surfactants), 2,5 % (об./об.) етанолу, 200 мг/мл Quil A, 100 мкг/мл холестерину, та 0,5 %

(об./об.) лецитину. Модифікований SEAM 1/2 являє собою емульсію олія-в-воді, яка містить 5 % (об./об.) сквалену, 1 % (об./об.) SPAN.RTM. 85 детергенту, 0,7 % (об./об.) Tween 80 детергенту, 2, % (об./об.) етанолу, 100 мкг/мл Quil A, та 50 мкг/мл холестерину. Інші імуномодельючі агенти, які можуть бути включені у вакцину, включають, наприклад, один або декілька інтерлейкінів, інтерферонів або інших відомих цитокінів.

Вакцини згідно представленого винаходу необов'язково можуть бути сформульовані для сповільнення вивільнення вірусу, молекули інфекційної РНК, плазмід або вірусного вектора згідно представленого винаходу. Приклади таких складів з пролонгованим вивільненням включають вірус, молекулу інфекційної РНК, плазмиду або вірусний вектор в комбінації з композитами біосумісних полімерів, таких як, наприклад, полі(молочна кислота), полі(молочно-гліколева кислота), метилцелюлоза, гіалуронова кислота, колаген тощо. Структура, вибір та використання полімерів, які розкладаються в засобах доставки ліків були розглянуті в декількох публікаціях, включаючи A. Domb et al., 1992, *Polymers for Advanced Technologies* 3: 279-292, яка включена в представлений документ як посилання. Додатковий посібник з вибору та використанню полімерів в фармацевтичних складах може бути знайдена в текстах, відомих в даній галузі з рівня техніки, наприклад, 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., яка також включена в даний документ як посилання. Альтернативно або додатково, вірус, плазміда або вірусний вектор можуть бути мікрокапсульовані для покращення введення та ефективності. Способи мікроінкапсулювання антигенів добре відомі в даній галузі з рівня техніки, та включають способи, описані, наприклад, в патенті США № 3,137,631; в патенті США № 3,959,457; в патенті США № 4,205,060; в патенті США № 4,606,940; в патенті США № 4,744,933; в патенті США № 5,132,117; та Міжнародній патентній публікації WO 95/28227, всі з яких включені в даний документ як посилання.

Ліпосоми можуть також бути використані для забезпечення сповільненого вивільнення вірусу, плазмід або вірусного вектору. Подробиці відносно того, як виготовляти та використовувати ліпосомні склади, можуть бути знайдені, серед іншого, в патенті США № 4,016,100; в патенті США № 4,452,747; в патенті США № 4,921,706; в патенті США № 4,927,637; в патенті США № 4,944,948; в патенті США № 5,008,050; і в патенті США № 5,009,956, всі з яких включені в даний документ як посилання.

Ефективна кількість будь-якої з вищеописаних вакцин може бути визначено звичайними методами, починаючи з низької дози вірусу, плазмиди вірусного білку або вірусного вектора, а потім збільшуючи дозування, одночасно відстежуючи ефекти. Ефективна кількість може бути отримана після одноразового введення вакцини або після багаторазового введення вакцини. Відомі фактори можуть бути прийняті до уваги під час визначення оптимальної дози на тварині. До них відносяться вид, розмір, вік та загальний стан тварини, наявність інших лікарських засобів у тварини тощо. Фактичне дозування переважно вибирають після розгляду результатів інших досліджень на тваринах (дивіться Приклади 3-7 нижче).

Одним із способів визначення того, чи була досягнута адекватна імунна відповідь, є визначення сероконверсії і титру антитіл у тварини після вакцинації. Час вакцинації та кількість ревакцинацій, якщо такі мають місце, переважно буде визначатися лікарем або ветеринаром базуючись на аналізі всіх відповідних факторів, деякі з яких описані вище.

Ефективна кількість дози вірусу, білку, молекули інфекційної ДНК, плазмиди або вірусного вектора згідно представленого винаходу може бути визначено з використанням відомих методик, приймаючи до уваги фактори, які можуть бути визначені спеціалістом в даній галузі, такі як маса тварини, що підлягає вакцинації. Кількість дози вірусу згідно представленого винаходу у вакцині згідно представленого винаходу переважно знаходиться у діапазоні від приблизно 10^1 до приблизно 10^9 БУО (бляшкоутворюючих одиниць), більш переважно від приблизно 10^2 до приблизно 10^8 БУО, та найбільш переважно від приблизно 10^3 до приблизно 10^7 БУО. Кількість дози плазмиди згідно представленого винаходу у вакцині згідно представленого винаходу переважно знаходиться у діапазоні від приблизно 0,1 мг до приблизно 100 мг, більш переважно від приблизно 1 мг до приблизно 10 мг, ще більш переважно від приблизно 10 мг до приблизно 1 мг. Кількість дози інфекційної молекули ДНК згідно представленого винаходу у вакцині згідно представленого винаходу переважно знаходиться у діапазоні від приблизно 0,1 мг до приблизно 100 мг, більш переважно від приблизно 1 мг до приблизно 10мг, ще більш переважно від приблизно 10 мг до приблизно 1 мг. Кількість дози вірусного вектора згідно представленого винаходу у вакцині згідно представленого винаходу переважно знаходиться у діапазоні від приблизно 10^1 БУО до приблизно 10^9 БУО, більш переважно від приблизно 10^2 БУО до приблизно 10^8 БУО, і ще більш переважно від приблизно 10^3 до приблизно 10^7 БУО. Підходящий розмір дозування знаходиться

у діапазоні від приблизно 0,5 мл до приблизно 10 мл, і більш переважно від приблизно 1 мл до приблизно 5 мл.

Дози, що підходять для вірусних білкових або пептидних вакцин відповідно до практики згідно представленого винаходу знаходяться у діапазоні від, як правило, від 1 до 50 мікрограмів на дозу або більш високі кількості, які можуть бути визначені стандартними способами, з кількістю ад'юванта, яка повинна бути визначена визнаними способами щодо кожної такої речовини. В переважному прикладі винаходу, що стосується вакцинації свиней, оптимальний вік для тварин складає від 1 до 21 дня, яка перед відлученням, може також відповідати іншим запланованим щепленням, таким як проти *Mycoplasma hyopneumoniae* або PCV. Крім того, переважний графік вакцинації для племінних свиноматок буде включати аналогічні дози із щорічним графіком ревакцинації.

Одним із способів визначення того, чи була б досягнута адекватна імунна відповідь, є визначення сероконверсії та титру антитіл у тварини після вакцинації. Час вакцинації і кількість ревакцинацій, якщо такі мають місце, переважно буде визначатися лікарем або ветеринаром базуючись на аналізі всіх відповідних факторів, деякі з яких описані вище.

Ефективна кількість дози вірусу, молекули інфекційної РНК, плазмиди або вірусного вектора згідно представленого винаходу може бути визначено з використанням відомих методик приймаючи до уваги фактори, які можуть бути визначені спеціалістом в даній галузі, таких як маса тварини, що підлягає вакцинації. Наприклад, вакцини можуть доставлятися перорально, парентерально, внутрішньошкірно, підшкірно, внутрішньом'язово, інтраназально або внутрішньовенно. Пероральна доставка може включати, наприклад, додавання композицій до корму або питва тварин. Фактори, що впливають на дозування вакцини, включають, наприклад, маса і вік свині.

Представлений винахід, крім того, передбачає спосіб отримання вакцини, що містить PRRS вірус, молекулу інфекційної РНК, плазмиду, або вірусний вектор, описаний у даному документі, причому спосіб включає комбінування ефективної кількості одного з вірусу PRRS, молекули інфекційної РНК, плазмиди або вірусного вектора згідно представленого винаходу, з носієм, прийнятним для фармацевтичного або ветеринарного застосування.

Крім того, жива атенуйована вакцина згідно представленого винаходу може бути модифікована, як описано в патенті США № 6,500,662 для кодування гетерологічного антигенного епітопу, який вставлений у вірусний геном PRRS з використанням відомих рекомбінантних методик. Дивіться також патент США 7,132,106, який включений як посилання в повному обсязі. Антигенні епітопи, застосовні як гетерологічні антигенні епітопи для представленого винаходу, включають в себе антигенні епітопи від патогену свиней, іншого, ніж вірус PRRS, які включають, але не обмежуються цим, антигенний епітоп з патогену свиней, вибраних з групи, що складається з свинячого парвовірусу, свинячого цирковірусу, свинячого цирковірусу, свинячого грипу, вірусу псевдоскажу, вірусу трансмісивного гастроентериту, свинячого респіраторного коронавірусу, класичного вірусу чуми свиней, вірусу африканської чуми свиней, вірусу енцефаломіокардіту, свинячого параміксовірусу, вірусу гепатиту TTV, вірусу трансмісивного гастроентериту, респіраторного коронавірусу свині, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Bacillus anthracis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Haemophilus parasuis*, *Leptospira* spp., *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynovia*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus equismilis*, та *Streptococcus suis*. Нуклеотидні послідовності, що кодують антигенні епітопи з вищезгаданих патогенів свиней, відомі в даній галузі з рівня техніки і можуть бути отримані з загальнодоступних баз даних генів у всесвітній мережі, таких як Genbank з (США) Національного центру біотехнологічної інформації.

Додаткові ознаки та варіанти винаходу будуть очевидні для спеціалістів у даній галузі техніки з всієї цієї заявki, включаючи детальний опис, і всі такі ознаки призначені як аспекти винаходу. Аналогічним чином, ознаки винаходу, описаного в даному документі, можуть бути повторно об'єднані у додаткові варіанти здійснення винаходу, які також призначені як аспекти винаходу, незалежно від того, чи конкретно зазначена комбінація ознак як аспект або варіант здійснення винаходу. Крім того, тільки такі обмеження, які описані в даному документі як критичні для винаходу, повинні розглядатися як такі; варіанти винаходу, в яких відсутні обмеження, які не були описані в даному документі як критичні, призначені як аспекти винаходу. Буде зрозуміло, що винахід може бути здійснений інакше, ніж конкретно описано у зазначеному вище описі та прикладах.

Відповідно, вакцина проти PRRS, що базується на вірусі SEQ ID NO:5 буде розглядатися як репрезентативна для тих, які мають профіль безпечності та ефективності, які забезпечують

значне покращення, що дозволяє успішно проводити вакцинацію поросят, навіть у перший день життя, з тривалим імунітетом до приблизно 6 місячного віку. Такі безпрецедентні покращення ефективності вакцин несподівано забезпечуються культивуванням і ослабленням вірусу в середовищі культивування клітин, яке максимізує відношення до біології свиней, в тому числі шляхом розв'язання відповідної і безпечної реплікації вірусу у господарі-свині, не знижуючи при цьому необхідну імунну відповідь господаря. Такі переваги надаються для поросят, кабанів, та свиноматок і молодих свиней (як до, так і під час вагітності); і у всіх випадках, чи є тварина серопозитивною або серонегативною під час вакцинації.

Очевидним також є те, що вдосконалення в галузі культивування згідно представленого винаходу в рівній мірі застосовні до європейських вірусів незалежно від того, використовуються вони, піддавались або будуть піддаватися маніпулюванню рекомбінантними засобами або тільки були виділені, збережені або культивовані та адаптовані переважно не рекомбінантними засобами; у всіх випадках, включаючи питання про те, чи є будь-які використовувані клітини для культивування самі по собі рекомбінантними або ні.

Багаточисленні модифікації і варіації представленого винаходу можливі в світлі вищенаведених ідей і, отже, знаходяться в межах обсягу винаходу.

Наступні приклади призначені для ілюстрації, але не для обмеження винаходу.

Приклад 1 - Генерування клітинної лінії BHK21-C12-26

Генерування клітинної лінії BHK21-C12, батьківської клітинної лінії BHK21-C12-26, що використовується в цих дослідженнях, було раніше описано у US 9,102,912. В даному патенті клітинна лінія BHK21-C12 згадується як BHK/CMV/v11 #12 у Прикладі 14 та на Фігурі 6. Коротко кажучи, звичайно використовувана клітинна лінія BHK-21 нирки новонародженого хом'яка була трансфікована плазмідною pCMV-susCD163v1, яка містить усічений варіант (v1) свинячого (sus) CD163 PRRSV рецепторного гену, під контролем промотору CMV. Плазміда також містить стійкість до канаміцину/неоміцину під контролем подвійних прокаріотичних/еукаріотичних промоторів для селекції в клітинах E. coli та ссавців, відповідно. Після трансфекції клітини піддавали одночасному відбору з G418 (Geneticin, аналог неоміцину) та клонуванню окремих клітин у 96-лункових планшетах. Один з отриманих в результаті клонів (#12, або "C12") був вибраний для подальшого використання та позначений як BHK21-C12.

Клітину лінію BHK21-C12 серійно пасерували 65 разів під селекцією G418 та зберігали PRRSV-пермісивний фенотип. Під час пасажу 64 було виявлено, що декілька клітин вижили після зараження вірусом PRRS, що показує на ранні стадії фенотипової нестабільності. Було проведено додаткове клонування окремих клітин, та багато нових клонів були оцінені на предмет наявності PRRSV-пермісивного фенотипу і загальних характеристик зростання. З них був вибраний клон #26 за те, що він перевершує інші клони і батьківську клітинну лінію BHK21-C12. Клон #26 був позначений BHK21-C12-26, та використовувався для послаблення вірусу PRRS 96V198.

Приклад 2- додаткові клітини, підходящі для адаптації та культивування вірусу, який є безпечним та ефективним у дуже ранньому віці, наприклад, для вакцинації в 1-й день після народження

Клітини PK-9 являють собою лінію трансгенних клітин, отриману шляхом стабільного трансфектування клітинної лінії нирки свині PK0809 плазмідною, яка кодує віддалену версію гену CD163 свині та гену стійкості до неоміцину. Деталі конструкта та характеристики клітинної лінії PK-9 були описані раніше (дивіться патент США 9,102,912).

Слід відмітити, що адаптація вірусу першого пасажу з клітин PAM до росту на клітинах PK-9 може бути утруднена і вимагає декількох спроб з декількома паралельними клітинними лініями. В цьому випадку інфекція може контролюватися з використанням імунофлуоресценції дубльованих лунок з використанням FITC-кон'югованого моноклонального антитіла SDOW17, специфічного для вірусного нуклеокапсидного білку (Rural Technologies Inc, Brookings South Dakota). Ранні пасажі можуть в результаті призвести до появи декількох невеликих осередків і не генерувати достатню кількість безклітинних вірусних частинок для того, щоб ініціювати зараження свіжого моношару. Дані пасажі, тим не менш, можуть бути виконані шляхом обробки інфікованого моношару акутазою (замінником трипсину) і повторного посіву клітин в декілька лунок зі свіжим середовищем з додаванням або без додавання неінфікованих клітин PK-9. Після декількох таких пасажів деякі лінії повинні демонструвати явне збільшення частоти та розміру флуоресцентних осередків. Деякі з них повинні набути здатність до пасерування з використання безклітинних вірусних рідин. Як правило, очікується, що відповідні пасажі свідчать про знижену здатність пригнічувати альфа-інтерферон.

Безпека і ефективність вакцин проти європейського PRRS згідно винаходу додатково підтверджуються експериментальними протоколами і даними, що містять приклади 3-7, які

слідують далі.

Приклад 3 - Тривалість імунітету, забезпечуваного європейським PRRS MLV, введеним поросят у віці 1 день, з подальшим контрольним зараженням додатковим європейським ізолятом PRRSV приблизно через 26 тижнів після вакцинації.

5 Мета дослідження полягала в тому, щоб оцінити тривалість імунітету (DOI) модифікованої живої вакцини проти європейського PRRS (вірусу, що кодує SEQ ID NO: 5) у свиней, вакцинованих у віці 1 дня внутрішньом'язовим (в.м., група T02) або інтраназальним (і.н., група T03) способом з подальшим респіраторним контрольним зараженням через 26 тижнів після вакцинації іншим європейським ізолятом PRRSV. Основною змінною під час визначення ефективності було вірусне навантаження в сироватці крові (віремія) в групах обробки T02 та T03 в порівнянні зі свинями T01. Ураження легень, ректальні температури, виділення, клінічні ознаки і маса тіла порівнювалися як вторинні змінні.

10 У віці 1 дня свиням з груп T02 та T03 вводили одноразову дозу IVP по 2 мл внутрішньом'язовим (T02) або інтраназальним (T03) способом. Свині з контрольної групи (T01) отримували 2 мл внутрішньом'язово та 2 мл інтраназально сольового фізіологічного розчину. Через 26 тижнів після вакцинації (182 дня) свиней контрольним заражали інтраназально ізолятом EU PRRSV Olot/91 (дивіться J. Duran et al., Virus Genes, vol 14 No. 1., 1997, pp 19-29 та Z. Lu et al., Virology Journal, vol 11, No 42, 2014) як респіраторне контрольне зараження. Під час фази контрольного зараження проби крові, мазки з носу та рота, клінічні спостереження та ректальні температури збирали кожні 3-4 дні до дня розтину. Свиней зважували перед вакцинацією, перед контрольним зараженням та під час розтину. Через дев'ять або десять днів після контрольного зараження свиней умертвляли і піддавали розтину. Після розтину легені оцінювали на наявність пошкоджень PRRSV та оцінювали. Дослідження було дійсним, так як всі свині T01 залишалися вірусно-негативними на PRRSV протягом періоду вакцинації, і не було виявлено жодних змішаних факторів захворювання.

25 Під час порівняння вірусного навантаження в сироватці крові між групами спостерігався захисний ефект вакцинації як в.м., так і і.н. Обидві групи, вакциновані IVP (T02 та T03), мали значно ($P \leq 0,05$) більш низькі титри вірусу в порівнянні з контрольною групою у всі дні забору проб після контрольного зараження (3, 6, 8 та 9/10, що відповідає дням дослідження 185, 188, 190 та 191/192). Ефективність також підтверджується значним зниженням уражень легень, зв'язаних з PRRSV, під час розтину, а також значним зниженням виділення з носу та рота в обох вакцинованих групах в порівнянні з контрольною групою.

30 Порівняння між вакцинованими групами показало, що через 3 дні після контрольного зараження група, вакцинована і.н. способом (T03), мала значно більш низьку віремію, виділення з носу та пероральне виділення в порівнянні з групою, вакцинованою в.м. способом (T02). Дані результати показують, що в умовах представленого дослідження захист, отриманий після вакцинації і.н. способом, був сильнішим, ніж після вакцинації в.м. способом.

35 Вакцинація індукувала розвиток PRRSV-специфічних антитіл в межах 28 днів після вакцинації. Всі вакциновані свині були серопозитивними до антитіл PRRS під час контрольного зараження (через 26 тижнів після вакцинації), що показує на те, що обидва способи введення могли викликати сильну та захисну відповідь антитіл на вакцинацію. Однак рівень титрів антитіл, виявлених під час контрольного зараження був значно вище у групі вакцинованою і.н. способом в порівнянні з групою, вакцинованою внутрішньом'язово, що пояснювало би значне зниження вірусного навантаження, виявленого як в сироватці, так і у шляхах екскреції у і.н. групі в порівнянні з в.м. групою через 3 дні після контрольного зараження.

45 На завершення, результати даного дослідження продемонстрували, що одноразове введення вакцини EU PRRSV MLV (SEQ ID NO:5), що містить дозу $2,5 \log_{10}$ CCID₅₀ поросят у віці 1 день внутрішньом'язовим або інтраназальним способом давало захисну тривалість імунітету 6,5 місяців (26 тижнів).

50 Скорочення, використовувані у прикладах 3-7, включають: AAALAC, Асоціація за оцінкою та акредитацією по догляду за лабораторними тваринами; AE, несприятлива подія; CCID₅₀, 50 % інфекційна доза клітинної культури; CP, контрольний продукт; DC, День контрольного зараження; DCF, форма збору даних; DRAC, щоденний огляд по догляду за тваринами; ID, ідентифікація; IF, імунофлуоресценція; в.м., внутрішньом'язово; і.н., інтраназально; в.в., внутрішньовенно; IVP, дослідницький ветеринарний продукт; MDA, материнські антитіла; MLV, модифікована жива вакцина; MSF, провідна документація дослідження; MSV, вихідний вакцинний вірус; NA, не застосовується; PAM, свинячі альвеолярні макрофаги; PRRSV, вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней; PBS, Фосфатний буферний сольовий розчин; RT-qPCR, кількісна зворотна транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція; SART, звіт про хворих тварин та лікування; SOP, стандартна операційна процедура; S/P, з до

позитивного; та TBD, підлягає визначенню.

Дизайн

Група	Опис обробки	Дозування (фактичний титр)	Спосіб	День введення	День контрольного зараження (DC)	Доза контрольного зараження (фактичний титр)	Кінець дослідження (DN)	N
T01	CP	2 мл + 2 мл	в.м. + і.н.	D0	D182	5.7 log ₁₀ CCID ₅₀ /свиня	D191/ D192	20
T02	IVP	2.2 log ₁₀ CCID ₅₀ /2.0 мл	в.м.	D0	D182		D191/ D192	18
T03	IVP	2.2 log ₁₀ CCID ₅₀ /2.0 мл	і.н.	D0	D182		D191/ D192	17

5 У віці 1-го дня дозу 2 мл (в.м. спосіб введення) і дозу 2 мл (і.н. спосіб введення) CP вводили поросят T01. Крім того, одноразову дозу 2,0 мл IVP вводили поросят T02 шляхом в.м. введення та поросят T03 шляхом і.н. введення. Через двадцять шість тижнів після вакцинації свиней здійснювали контрольне зараження PRRSV Olot/91, і через 9-10 після контрольного зараження їх піддавали евтаназії та розтину. День 0 = День вакцинації.

10 Рандомізація

Безпосередньо після народження поросят змішано вигодовували таким чином, що поросята були рандомізовані і як можна більш рівномірно розподілені по всім свиноматкам. Під час відлучення свиноматок видаляли, і поросят утримували в загонах на фермі-джерелі (1 загін на обробку).

15 Визначені параметри для тварин є наступними:

Види/породи:	Свинячий кросбред
Початковий вік на день 0:	1 денний (24±12 ч) вік
Початкова вага на день 0	NA
Стать:	Самець та самка
Походження:	Farm Cal Marquès Zoetis Manufacturing & Research Spain S.L. Ctra Camprodon s/n Finca "La Riba" 17813 Vall de Bianya (Girona), Spain
Серологічний статус:	Серонегативний до PRRSV
Репродуктивний статус:	NA
Спосіб ідентифікації:	ушна бірка
Форма власності:	Zoetis Manufacturing & Research Spain S.L.

20 Дванадцять вагітних свиноматок були використані для отримання 117 поросят. За день до передбачуваної дати опоросу пологи були викликані внутрішньом'язовою ін'єкцією клопростенолу (Cyclix® Porcino, Virbac). Всі свиноматки опоросились на наступний день (D-1). Для скорочення тривалості пологів і кількості мертвонароджених поросят всім свиноматкам, крім двох (71 та 78, у яких вже закінчився опорос), ін'єкційно вводили окситоцин (Partovet® DFV).

25 Під час фази вакцинації, 8 поросят померли або були піддані евтаназії. З решти 109 поросят, 55 були взяті для представленого дослідження.

30 Для того, щоб зменшити агресивну та сексуальну поведінку у самців свиней в більш старшому віці, поросят кастрували в 6-денному віці, слідуючи методам утримання тварин, специфічним для конкретної ділянки. Троє поросят (232, 284 та 286) не могли бути кастровані, тому що у них була мошонкова грижа. Приблизно через 1 місяць після вакцинації, дві раптові смерті з однаковими патологічними ознаками разом з наявністю білих плям на полу та у деяких свиней з білою сечею в кінці процесу сечовипускання свідчать про бактеріальну інфекцію, що вражає сечовивідні шляхи. Вважалося, що даний процес не вплинув на результати дослідження, оскільки всі тварини добре реагували на лікування, та жодних інших випадків не спостерігалось протягом решти фази вакцинації (наступні 3 місяці до контрольного зараження).

35 Будь-яка тварина з травмою або клінічним захворюванням, не зв'язаним з процедурою

дослідження, яка може вплинути на здоров'я тварини та оцінку результатів, може бути виключено з дослідження на розсуд дослідника. Дослідницький ветеринарний продукт (IVP) був отриманий з ліофілізованої фракції, яку знову суспендували у фізіологічному розчині при $2,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}/\text{мл}$ (SEQ ID NO: 5 вірус).

5 Реконструкція

В день 0, IVP розбавляли вакцинним розріджувачем (партія T22019), щоб відповідати цільовому титру ($2,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}/2 \text{ мл}$). Одну аліквоту IVP збирали для титрування на клітинах BHK-21-C12-26 для підтвердження дозування. Додатковий зразок IVP заморожували ($-80 \pm 10^\circ \text{C}$) та зберігали як контрольний зразок. Титрування на клітинах BHK-21-C12-26 проводили відповідно до місцевих стандартних процедур. Відновлена та розбавлена вакцина мала титр $10^{1,9} \text{CCID}_{50}/\text{мл}$, що відповідає $10^{2,2} \text{CCID}_{50}/2 \text{ мл}$ ($2,2 \log_{10} \text{CCID}_{50}/2 \text{ мл}$). В день 0 IVP розбавляли вакцинним розріджувачем (партія T22019) для того, щоб відповідати цільовому титру ($2,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}/2 \text{ мл}$). Одну аліквоту IVP збирали для титрування на клітинах BHK-21-C12-26 для підтвердження дозування. Додатковий зразок IVP заморожували ($-80 \pm 10^\circ \text{C}$) та зберігали як контрольний зразок. Титрування на клітинах BHK-21-C12-26 проводили відповідно до місцевих стандартних процедур. Відновлена та розбавлена вакцина мала титр $10^{1,9} \text{CCID}_{50}/\text{мл}$, що відповідає $10^{2,2} \text{CCID}_{50}/2 \text{ мл}$ ($2,2 \log_{10} \text{CCID}_{50}/2 \text{ мл}$), контрольний продукт (CP) являв собою розріджувач вакцини (фізіологічний розчин) та вводився у вигляді 4,0 мл (2,0 мл в.м. + 2,0 мл і.н.).

В день 0 поросят вакцинували IVP або CP, як описано. Поросятам груп T01 та T02 ін'єкційно вводили внутрішньом'язово у правий бік шиї. Поросятам груп T01 та T03 вводили інтраназально, доставляючи 1,0 мл в кожну ніздрю.

Введення контрольного зараження

Всіх свиней піддавали контрольному зараженню інтраназально (і.н.) із загальним об'ємом контрольного зараження 2,0 мл шляхом закапування 1,0 мл матеріалу контрольного зараження в кожну ніздрю з вірусом Olot/91 при титрі $10^{5,7} \text{CCID}_{50} / 2 \text{ мл}$.

Результати - вірусемія

Всі свині були негативними на ЗТ-кПЛР (кількісна полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією) PRRSV у сироватці крові перед вакцинацією (D0) та перед контрольним зараженням (D181). Після контрольного зараження, 100 % свиней з групи T01 ставали віремічними в день 185 (3 дня після зараження, DC+3) та залишали позитивними до кінця дослідження. У вакцинованих групах 100 % (група T02) та 88 % (T03) свиней також були позитивними в DC+3. Однак відсоток позитивних свиней в обох вакцинованих групах знизився у часі та став значно нижче в DC+8 та у день розтину (DN) в порівнянні з контрольною групою T01.

В обох вакцинованих групах кількість вірусного завантаження, виявленого у сироватці, також була значно зниженою в порівнянні з групою T01 у всі дні забору зразків після зараження. В день 185 (DC+3) також спостерігалось значне зниження вірусних титрів в групі T03 по відношенню до T02. Таблиця 1 підсумовує результати вірусемії протягом 10-денного періоду після контрольного зараження.

Таблиця 1

Підсумовування результатів вірусемії за групою та днем дослідження (дата фази контрольного зараження)

Група	День дослідження	№	Log ₁₀ РНК-копій / мл сироватки					% віремічних тварин
			Середнє значення, отримане методом найменших квадратів	SE	Діапазон	Нижче 95 % СВ	Вище 95 % СВ	
T01	D181 (DC-1)	20	1,69	0,18	1,70-1,70	1,31	2,08	0,0
T02	D181 (DC-1)	18	1,71	0,18	1,70-1,70	1,33	2,09	0,0
T03	D181 (DC-1)	17	1,70	0,26	1,70-1,70	1,17	2,22	0,0
T01	D185 (DC+3)	20	6,47	0,18	5,28-7,95	6,09	6,85	100,0
T02	D185 (DC+3)	18	5,77	0,18	3,94-7,13	5,38	6,15	100,0
T03	D185 (DC+3)	17	5,04	0,26	1,70-7,28	4,51	5,57	88,2
T01	D188 (DC+6)	20	5,24	0,18	3,89-6,40	4,86	5,62	100,0

Таблиця 1 (продовження)

Група	День дослідження	№	Log ₁₀ РНК-копій / мл сироватки					% віремічних тварин
			Середнє значення, отримане методом найменших квадратів	SE	Діапазон	Нижче 95 % СВ	Вище 95 % СВ	
T02	D188 (DC+6)	17	3,95	0,18	1,70-5,86	3,56	4,34	94,1
T03	D188 (DC+6)	17	3,73	0,26	1,70-5,45	3,20	4,26	82,4
T01	D190 (DC+8)	20	4,62	0,18	2,91-6,58	4,24	5,00	100,0
T02	D190 (DC+8)	17	2,12	0,18	1,70-4,17	1,74	2,51	35,3
T03	D190 (DC+8)	17	2,22	0,26	1,70-4,48	1,70	2,75	29,4
T01	D191/192 (DN)	20	5,90	0,18	4,51-7,35	5,52	6,28	100,0
T02	D191/192 (DN)	17	2,06	0,18	1,70-3,41	1,68	2,45	35,3
T03	D191/192 (DN)	17	1,99	0,26	1,70-2,95	1,46	2,51	29,4

N: кількість; SE: стандартна помилка; СВ: довірча межа; D = день дослідження; DC: день контрольного зараження; DN: день розтину; ЗТ-кПЛР-позитивна: > 1,7 log₁₀ РНК-копій/мл.

Назальні виділення

- Всі свині були негативними на PRRSV за ЗТ-кПЛР у назальних мазках перед контролним зараженням (D181). Після контрольного зараження, всі свині з Т01 почали мати назальні виділення. У вакцинованих групах, відсоток свиней, які мали виділення назальним шляхом, складав 94 % (Т02 група) та 88 % (Т03 група). Що стосується групи Т01, значне зниження відсотка назальних виділень спостерігалось у групі Т03 на день 185, 188 та 191/192 (DC+3, DC+6 та DN) та у групі Т02 на день 191/192 (DN). Жодних значних різниць у відсотку назальних виділень між вакцинованими групами виявлено не було. Кількість вірусу, що виділяється назальним шляхом, була в значній мірі вище у групі Т01 в порівнянні з групою Т02 в DC+6 та DN, та у порівнянні з групою Т03 в DC+3, DC+6 та DN. Порівняння між вакцинованими групами продемонструвало, що вірусні титри у групі Т02 були в значній мірі більш високими у порівнянні з Т03 в DC+3. Таблиця 2 підсумовує результати назальних виділень протягом 10-денного періоду після контрольного зараження.

Таблиця 2

Підсумовування результатів назальних виділень за групою та днем дослідження (дата фази контрольного зараження)

Група	День дослідження	№	Log ₁₀ копій РНК/мл					% назальних виділень
			Середнє значення отримані методом найменших квадратів	SE	Діапазон	Нижче 95 % СВ	Вище 95 % СВ	
T01	D181 (DC-1)	20	1,70	0,19	1,70-1,70	1,32	2,08	0,0
T02	D181 (DC-1)	18	1,68	0,20	1,70-1,70	1,28	2,08	0,0
T03	D181 (DC-1)	16	1,69	0,21	1,70-1,70	1,27	2,11	0,0
T01	D185 (DC+3)	20	4,61	0,19	3,70-5,51	4,23	4,99	100,0
T02	D185 (DC+3)	18	4,66	0,20	1,70-6,49	4,26	5,06	88,9
T03	D185 (DC+3)	17	3,35	0,21	1,70-5,44	2,94	3,75	70,6
T01	D188 (DC+6)	20	4,36	0,19	3,44-5,25	3,98	4,75	100,0
T02	D188 (DC+6)	17	3,33	0,21	1,70-5,21	2,92	3,74	94,1
T03	D188 (DC+6)	17	3,02	0,21	1,70-5,22	2,62	3,43	76,5
T01	D190 (DC+8)	20	2,21	0,19	1,70-3,69	1,83	2,59	40,0
T02	D190 (DC+8)	17	2,39	0,21	1,70-4,73	1,98	2,80	35,3

Таблиця 2 (продовження)

Група	День дослідження	№	Log ₁₀ копій РНК/мл					% назальних виділень
			Середні значення отриманні методом найменших квадратів	SE	Діапазон	Нижче 95 % СВ	Вище 95 % СВ	
T03	D190 (DC+8)	17	2,21	0,21	1,70-3,92	1,80	2,61	35,3
T01	D191/192 (DN)	20	2,55	0,19	1,70-5,98	2,17	2,94	50,0
T02	D191/192 (DN)	17	1,81	0,21	1,70-3,25	1,40	2,22	11,8
T03	D191/192 (DN)	17	1,82	0,21	1,70-2,84	1,41	2,22	11,8

N: кількість; SE: стандартна помилка; СВ: довірча межа; D = день дослідження; DC: день контрольного зараження; DN: день розтину; ЗТ-кПЛР-позитивна: > 1,7 log₁₀ РНК-копій/мл.

Виділення з ротової порожнини

- Всі свині були негативними на PRRSV за ЗТ-кПЛР у виділеннях з порожнини рота перед контрольним зараженням (D181). Після контрольного зараження, частина свиней, які мали виділення оральним шляхом складала 9/20 (45 %), 8/18 (44 %) та 7/17 (41 %) у групах T01, T02 та T03, відповідно. До кінця дослідження, всі свині з групи T02 та всі крім однієї в групі T03 були негативними у виділеннях з порожнини рота. У контрольній групі T01, 5/20 були все ще позитивними на той момент часу; відмінності у відсотку виділень з порожнини рота між T01 та T02 були статистично значущими у кінці дослідження (DN). Кількість вірусу, що виділяється оральним шляхом, була в значній мірі вище у групі T01 у порівнянні з групою T03 на день розтину, що відповідає 9/10 дням після контрольного зараження. Вірусне навантаження також було в значній мірі більш високим у групі T02 у порівнянні з як T01, так і T03 на день 185 (DC+3). Таблиця 3 підсумовує результати виділень з порожнини рота протягом 10-денного періоду після контрольного зараження.

Таблиця 3

Підсумовування результатів виділень з порожнини рота за групою та днем дослідження (дата фази контрольного зараження)

Група	День дослідження	№	Log ₁₀ копій РНК / мл					% виділень з порожнини рота
			Середні значення отримані методом найменших квадратів	SE	Діапазон	Нижче 95 % СВ	Вище 95 % СВ	
T01	D181 (DC-1)	20	1,70	0,07	1,70-1,70	1,57	1,83	0,0
T02	D181 (DC-1)	18	1,70	0,12	1,70-1,70	1,45	1,95	0,0
T03	D181 (DC-1)	17	1,70	0,08	1,70-1,70	1,54	1,86	0,0
T01	D185 (DC+3)	20	1,79	0,07	1,70-2,71	1,66	1,93	10,0
T02	D185 (DC+3)	18	2,17	0,12	1,70-5,65	1,92	2,42	27,8
T03	D185 (DC+3)	17	1,79	0,08	1,70-2,52	1,64	1,95	11,8
T01	D188 (DC+6)	20	1,85	0,07	1,70-2,86	1,72	1,98	15,0
T02	D188 (DC+6)	17	1,95	0,13	1,70-2,59	1,70	2,20	23,5
T03	D188 (DC+6)	17	2,11	0,08	1,70-3,66	1,95	2,26	35,3
T01	D190 (DC+8)	20	1,70	0,07	1,70-1,70	1,57	1,83	0,0
T02	D190 (DC+8)	17	1,75	0,13	1,70-1,70	1,49	2,00	0,0
T03	D190 (DC+8)	17	1,70	0,08	1,70-1,70	1,54	1,86	0,0
T01	D191/192 (DN)	20	1,95	0,07	1,70-3,16	1,81	2,08	25,0

Таблиця 3 (продовження)

Група	День дослідження	№	Log ₁₀ копій РНК / мл					% виділень з порожнини рота
			Середні значення отримані методом найменших квадратів	SE	Діапазон	Нижче 95 % СВ	Вище 95 % СВ	
T02	D191/192 (DN)	17	1,73	0,13	1,70-1,70	1,48	1,99	0,0
T03	D191/192 (DN)	17	1,72	0,08	1,70-2,00	1,56	1,87	5,9

N: кількість; SE: стандартна помилка; СВ: довірча межа; D = день дослідження; DC: день контрольного зараження; DN: день розтину; ЗТ-кПЛР-позитивна: > 1,7 log₁₀ РНК-копій/мл.

Клінічні спостереження

У жодної зі свиней не було ненормального загального стану, депресії, дихальної недостатності, кашлю або чхання протягом всього періоду після контрольного зараження.

Ректальні температури

Таблиця 4 підсумовує результати ректальної температури протягом періоду після контрольного зараження. У групі T01, у 5/20 свиней (25 %) була лихоманка (RT ≥ 40,5), щонайменше, один раз протягом періоду після контрольного зараження. У вакцинованих групах T02 та T03, частина свиней, у якої була лихоманка після контрольного зараження, складала 8/18 (44 %) та 12/17 (71 %), відповідно. Ректальні температури були у значній мірі вище в обох вакцинованих групах T02 та T03 у порівнянні з групою T01, на день 185 (DC+3).

Таблиця 4

Підсумовування результатів ректальної температури у поросят за групою та днем дослідження

Група	День дослідження	№	Ректальні температури (°C)					% свиней з лихоманкою (RT≥40,5)
			LSM	SE	Діапазон	Нижче 95 % СВ	Вище 95 % СВ	
T01	D182 (DC)	20	39,5	0,09	39-40,32	39,3	39,7	0,0
T02	D182 (DC)	18	39,7	0,13	39-40,85	39,4	39,9	5,6
T03	D182 (DC)	17	39,7	0,12	38,94-40,43	39,4	39,9	0,0
T01	D185 (DC+3)	20	39,9	0,09	39,06-40,82	39,7	40,1	5,0
T02	D185 (DC+3)	18	40,3	0,13	39,39-41,54	40,1	40,6	33,3
T03	D185 (DC+3)	17	40,4	0,12	39,3-41,14	40,1	40,6	52,9
T01	D188 (DC+6)	20	40,0	0,09	39,14-40,8	39,8	40,1	25,0
T02	D188 (DC+6)	17	40,1	0,14	39,14-41,02	39,9	40,4	29,4
T03	D188 (DC+6)	17	40,2	0,12	39,36-41,38	39,9	40,4	29,4
T01	D190 (DC+8)	20	39,5	0,09	38,9-40,26	39,3	39,7	0,0
T02	D190 (DC+8)	17	39,7	0,14	39,02-40,75	39,4	39,9	5,9
T03	D190 (DC+8)	17	39,6	0,12	39,07-40,86	39,4	39,9	17,6
T01	D191 (DC+9)	20	39,5	0,09	38,85-39,95	39,3	39,7	0,0
T02	D191 (DC+9)	17	39,7	0,14	39,02-40,2	39,4	40,0	0,0
T03	D191 (DC+9)	17	39,7	0,12	38,9-41,15	39,5	40,0	5,9

LSM: Середні значення отримані методом найменших квадратів; SE: Стандартна помилка; СВ: довірча межа; RT: Ректальної температури.

Ураження легень

Відсоток легень з ураженнями для кожної групи лікування показаний у таблиці 5. Візуальні оцінки легень показані у таблиці 6. Під час розтину, 18/20 свиней (90 %) з контрольної групи T01 мали позитивний візуальний бал легень, що свідчить про те, що контрольне зараження PRRSV було вдалим в індукуванні уражень легень. В групах T02 та T03, 12/17 (71 %) та 7/16 (44 %) свиней також отримали позитивні результати. У одній свині з групи T03 (#300) спостерігалась катарально-гнійна плевропневмонія, яка вражає від 10 до 70 % правих часток легені, від 2 до

- 30 % лівих часток легені та 70 % від додаткової частки, таким чином маскуючи присутність будь-якого потенційного ураження, пов'язаного з PRRSV. Дані від цієї свині були марковані з аналізу (дивіться доповідь з маркування у MSF). Відсоток легень з ураженнями, який спостерігався під час розтину, був значно вищий у контрольній групі T01 в порівнянні з вакцинованими групами T02 та T03. Не було виявлено жодних розбіжностей між вакцинованими групами.

Таблиця 5

Підсумовування результатів відсотка легень з ураженнями

Група	№	Зворотно перетворені LSM*	SE	Нижче 95 % СВ	Вище 95 % СВ	Діапазон
T01	20	3,7 ^A	0,61	2,6	5,0	0,2-13,5
T02	17	1,0 ^B	0,35	0,5	1,9	0,0-4,4
T03	16	0,7 ^B	0,30	0,2	1,5	0,0-5,2

* Різні літерні позначення вказують на статистично значущу відмінність.

Таблиця 6

Візуальна оцінка легень за групами лікування

Група	Візуальна оцінка								Загальні спостереження
	0 (жодних уражень)		1 (слабкі ураження)		2 (помірні ураження)		3 (важкі ураження)		
	Кількість	%	Кількість	%	Кількість	%	Кількість	%	Кількість
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

Результати серології (ІФА)

- Короткий опис результатів серології показаний в таблиці 7. Результати ІФА, отримані зі зразків, зібраних з місячними інтервалами під час фази вакцинації, підсумовані лише з описовою статистикою (середнє геометричне значення та стандартні відхилення); розбіжності між групами не могли бути оцінені, тому що не було реплікації експериментальної одиниці (лікування не було замасковане). Розбіжності між групами були досліджені лише на 181-й день дослідження, після того, як тварини з'явилися у фазі контрольного зараження. Всі свині були негативними за ІФА перед вакцинацією (співвідношення IDEXX S/P < 0,4). Свині з контрольної групи T01 залишалися негативними до контрольного зараження. Через один місяць після вакцинації (28-ий день) всі свині з груп T02 та T03 вже виробили антитіла до PRRSV, і всі вони залишалися позитивними на момент контрольного зараження (через 6,5 місяців після вакцинації). Порівняння між групами на день 181 (DC-1) продемонструвало значно більш високі середні значення за методом найменших квадратів титрів антитіл у групі T03 в порівнянні з групою T02.

Таблиця 7

Підсумовування результатів співвідношення S/P за ІФА.

Кількість лікувань	день дослідження	№	Середнє геометричне значення/LSM*	SD/SE	Діапазон	% серо-позитивності
T01	День 0	20	0,023	0,002	-0,019-0,239	0,0
T02	День 0	18	0,006	0,000	-0,015-0,140	0,0
T03	День 0	17	0,001	0,000	-0,018-0,100	0,0
T01	День 28	20	-0,013	-0,000	-0,025-0,018	0,0
T02	День 28	18	2,487	0,174	2,112-2,923	100,0
T03	День 28	17	2,496	0,218	2,022-3,037	100,0

Таблиця 7 (продовження)

Кількість лікувань	день дослідження	№	Середнє геометричне значення/LSM*	SD/SE	Діапазон	% серо-позитивності
T01	День 56	20	-0,010	-0,001	-0,079-0,182	0,0
T02	День 56	18	2,366	0,832	-0,078-3,591	94,4
T03	День 56	17	2,523	0,317	1,656-3,452	100,0
T01	День 83	20	0,011	0,000	-0,013-0,080	0,0
T02	День 83	18	2,249	0,328	1,556-2,852	100,0
T03	День 83	17	2,281	0,322	1,582-3,162	100,0
T01	День 113	20	0,042	0,001	-0,003-0,091	0,0
T02	День 113	18	1,598	0,333	0,692-2,606	100,0
T03	День 113	17	1,797	0,360	0,956-2,938	100,0
T01	День 140	20	0,023	0,001	-0,005-0,118	0,0
T02	День 140	18	1,270	0,249	0,612-2,076	100,0
T03	День 140	17	1,461	0,316	0,526-2,534	100,0
T01	День 168	20	0,034	0,001	-0,002-0,122	0,0
T02	День 168	18	1,433	0,329	0,709-2,780	100,0
T03	День 168	17	1,674	0,427	0,677-3,175	100,0
T01	День 181	20	0,055	0,001	0,006-0,200	0,0
T02	День 181	18	1,190	0,060	0,477-1,959	100,0
T03	День 181	17	1,527	0,068	0,665-2,422	100,0

*Результати з днів 0, 28, 56, 83, 113, 140 та 168 виражаються у вигляді середнього геометричного значення та стандартного відхилення (SD). День 181 у вигляді зворотно перетворених – середнього значення за методом найменших квадратів (LSM) та стандартної помилки (SE); ІФА позитивний: співвідношення S/P $\geq 0,4$

Вірусемія та виділення

5 Перед статистичним аналізом 3Т-кПЛР перетворили з використанням відповідного логарифмічного перетворення. Перетворені дані були проаналізовані з використанням загальної лінійної змішаної моделі з повторними вимірюваннями. Попарне порівняння обробки проводилось у кожний момент часу, якщо ефект лікування або лікування на момент часу було значним ($P \leq 0,05$). Середнє значення за методом найменших квадратів та 95 % довірчі інтервали лікування були зворотно перетворені для представлення. Відсоток вірусемічних/з виділеннями тварин також був розрахований. Кожний зразок був визначений як позитивний, якщо > 50 копій РНК PRRSV/мл (1,7 log₁₀ копій РНК PRRSV/мл), що відповідає половині межі виявлення методу (100 копій РНК PRRSV/мл). Крім того, було визначено, чи була тварина коли-небудь вірусемічною або коли-небудь були у неї виділення протягом Днів $\leq$ DC (стосується періоду перед контрольним зараженням) та Днів > DC (після контрольного зараження). Таблиці частот для статусу вірусемія були розраховані для кожної точки часу, якщо у тварини коли-небудь була вірусемія протягом декількох днів до контрольного зараження та днів після контрольного зараження.

Ректальні температури

20 Ректальні температури були проаналізовані з використанням аналізу загальної лінійної змішаної моделі з повторними вимірюваннями. Попарне порівняння обробки проводилось у кожний момент часу, якщо ефект лікування або лікування на момент часу був значним ($P \leq 0,05$). Середнє значення лікування за методом найменших квадратів, 95 % довірчі інтервали, максимум та мінімум були розраховані для кожної часової точки. Описові статистичні дані, середні значення, стандартні відхилення та діапазони були розраховані для кожного лікування і дня дослідження до контрольного зараження.

25 Розподілення частот тварин з лихоманкою (ректальна температура 40,5°C) розраховували для кожної обробки та збирали дані за часовими точками. Було визначено, чи була у тварини лихоманка протягом днів $\leq$ DC і днів > DC. Таблиці частот для випадків, коли у тварини коли-небудь була лихоманка, були розраховані для кожного періоду, дні $\leq$ DC і дні > DC.

Серологія (ІФА)

30 Перед статистичним аналізом серологія була перетворена, де це необхідно, з використанням відповідного логарифмічного перетворення. Перетворені серологічні дані

аналізували з використанням загальної лінійної змішаної моделі з повторними вимірюваннями. Порівняння парного лікування проводили у кожний момент часу, якщо ефект лікування або лікування на момент часу було значимим ($P \leq 0,05$). Середнє значення за методом найменших квадратів та 95 % довірчі інтервали лікування були зворотно перетворені для представлення.

Крім того, частотні розподілення позитивних/негативних результатів були розраховані для кожної обробки у кожний момент часу. Крім того, для кожної тварини було визначено, чи є вона сероконвертованою ($\geq 0,4$ співвідношення S/P) в будь-який час протягом дослідження. Розподілення частот того, чи є тварина сероконвертованою або ні, розраховували для кожної обробки. Описові статистичні дані, середні значення, стандартні відхилення та діапазони були розраховані для кожної обробки, перед контрольним зараженням.

Клінічні спостереження

Частотні розподілення клінічних ознак перед контрольним зараженням та клінічних ознак після контрольного зараження розраховували окремо для кожної обробки та збирали дані у певні точки часу. Частотні розподілення того, чи мала тварина коли-небудь клінічну ознаку, для кожної фази (дні $\leq DC$ та дні $> DC$), розраховували для кожної обробки.

Маси тіла

Маси тіла аналізували з використанням загальної лінійної змішаної моделі з повторними вимірюваннями. Середнє значення лікування за методом найменших квадратів, стандартні помилки, 95 % довірчі інтервали, максимуми та мінімуми були розраховані для кожної обробки у кожній часовій точці. Порівняння парного лікування проводили між обробками у кожний момент часу, якщо ефект лікування або лікування за взаємодією на момент часу був значимим ($P \leq 0,05$). Стандартні помилки та 95 % довірчі інтервали оцінок були розраховані. Описові статистичні дані, середні значення, стандартні відхилення та діапазони були розраховані для кожної обробки, перед контрольним зараженням. Оцінки середнього щоденного приросту та порівняння були розраховані з використанням оцінок параметрів з моделі.

Ураження легень

Відсоток всієї легені з ураженнями розраховували за наступною формулою: Відсоток всієї легені з ураженнями = $(0,10 \times \text{лівої краніальної частки}) + (0,10 \times \text{лівої середньої частки}) + (0,25 \times \text{лівої каудальної частки}) + (0,10 \times \text{правої краніальної частки}) + (0,10 \times \text{правої середньої частки}) + (0,25 \times \text{правої каудальної частки}) + (0,10 \times \text{додаткової частки})$. Перетворення квадратного кореня арксинуса застосовували до відсотку від загальної частини легень з ураженнями до аналізу. Трансформовані ураження легень аналізували за загальною лінійною змішаною моделлю. Попарне порівняння було зроблене між групами лікування, якщо ефект лікування був значимим. Розраховували зворотно перетворені середні значення за методом найменших квадратів відсотка загальної частини легені з ураженнями, їх стандартні помилки, та їх 95 % довірчі інтервали, а також мінімуми та максимуми.

Бали оцінки ураження легені

Частотні розподілення балів оцінки ураження легень розраховували для кожної обробки. Бали, нормальні або ненормальні, були проаналізовані з використанням узагальненої лінійної змішаної моделі для біноміальних даних. Якщо загальна лінійна змішана модель не сходилась, для аналізу даних використовувався точний критерій Фішера. Якщо основний ефект лікування був значимим, то проводилось попарне порівняння лікування.

Моделі для аналізів

Перетворений відсоток від загальної частини легені з ураженнями аналізували з використанням загальної лінійної змішаної моделі з фіксованими ефектами, лікуванням, та випадковими ефектами загону та блоку в межах загону. Лінійні комбінації оцінок параметрів використовувались у апіорних контрастах після тестування стосовно значного ($P \leq 0,05$) ефекту лікування. Порівняння були зроблені між обробками. Рівень значущості 5 % ($P \leq 0,05$) використовувався для оцінки статистичних розбіжностей. Середні значення за методом найменших квадратів (зворотне перетворення), стандартні помилки, 95 % довірчі інтервали середніх значень та діапазонів були розраховані для кожної обробки.

Статус вірусемії аналізували з використанням загальної лінійної змішаної моделі з повторними вимірюваннями з логіт-зв'язком з фіксованими ефектами: обробка, момент часу та вплив контрольного моменту часу на результати лікування, а також випадкові ефекти: загін, блок в межах загону та тварина в межах блоку, загін та лікування, яке відноситься до терміну "тварина". Лінійні комбінації оцінок параметрів використовувались у апіорних контрастах після дослідження стосовно значного ($P \leq 0,05$) ефекту лікування або впливу контрольного моменту часу на результати лікування. Порівняння були зроблені між обробками у кожний момент часу. Рівень значущості 5 % ($P \leq 0,05$) використовували для оцінки статистичних розбіжностей. Середні значення за методом найменших квадратів (зворотне перетворені), стандартні

помилки, та 95 % довірчі інтервали середніх значень були розраховані для кожної обробки та моменту часу. Якщо модель не сходилась, для аналізу даних використовувався точний критерій Фішера.

Бали оцінки легені, нормальні/ненормальні, і, якщо коли-небудь, вірусемії були проаналізовані з використанням узагальненої лінійної змішаної моделі з фіксованими ефектами лікування та випадковими ефектами: загін, блок в межах загону з використанням GLIMMIX. Якщо основний ефект лікування був значним, то проводились попарні порівняння лікування. Якщо GLIMMIX не сходився, для аналізу даних використовувався точний критерій Фішера.

Вірусне навантаження, серологія, маса тіла, та ректальні температури аналізувалися з використанням узагальненої лінійної змішаної моделі з повторними вимірюваннями з фіксованими ефектами: обробка, момент часу, та вплив контрольного моменту часу на результати лікування, та випадкові ефекти: загін, блок в межах загону та тварина в межах блоку, загін та лікування, яке відноситься до терміну "тварина". Лінійні комбінації оцінок параметрів використовувались в апіорних контрастах після дослідження стосовно значного ($P \leq 0,05$) ефекту лікування або впливу контрольного моменту часу на результати лікування. Порівняння були зроблені між обробками у кожний момент часу. Рівень значущості 5 % ($P \leq 0,05$) використовували для оцінки статистичних розбіжностей. Середні значення за методом найменших квадратів (зворотно перетворені стосовно вірусного навантаження та серології), стандартні помилки, 95 % довірчі інтервали середніх значень та діапазонів були розраховані для кожної обробки та моменту часу. Всі дослідження гіпотез були проведені на рівні значущості 0,05 з використанням двосторонніх критеріїв.

Обговорення

Таким чином, мета представленого дослідження складалась в тому, щоб оцінити тривалість імунітету (DOI) модифікованої живої вакцини ЄС PRRS (SEQ ID NO: 5) у свиней, вакцинованих у віці 1-ого дня шляхом внутрішньом'язового (в.м., група T02) та інтраназального (і.н., група T03) введення під час інокуляції ізолятом PRRS генотипу I як респіраторне контрольне зараження через 26 тижнів після вакцинації. Основною змінною під час визначення ефективності була вірусне навантаження у сироватці крові (вірусемія) в групах обробки T02 та T03 в порівнянні зі свинями T01. Ураження легень, ректальні температури, виділення, клінічні ознаки та маса тіла порівнювались як вторинні змінні.

Дослідження було дійсним, оскільки всі свині T01 залишалися вірусно-негативними на PRRSV протягом періоду вакцинації, та не було виявлено жодних змішаних факторів захворювання. Захисний ефект вакцинації як в.м., так і і.н. спостерігався під час порівняння вірусного навантаження у сироватці крові між групами; контрольна група T01 мала значно більш високі вірусні титри в порівнянні з вакцинованими групами T02 та T03 у всі дні забору проб після контрольного зараження. Крім того, по відношенню до контрольної групи частина віремічних свиней також була значно зниженою на 8-ий та 9/10-ий день після контрольного зараження в обох вакцинованих групах. Коли порівнювали вакциновані групи, значно більш низькі титри вірусу були виявлені на 185 день (DC+3) в групі, вакцинованої і.н. шляхом (T03), в порівнянні з групою, вакцинованою внутрішньом'язово (T02). Перевага як в.м., так і і.н. вакцинації відносно реплікації вірусу також підтверджується значним зниженням, яке спостерігається в обох вакцинованих групах, кількість вірусу, який виділяється назальним шляхом, а також відсотка назальних виділень. Крім того, позитивний ефект вакцинації також спостерігався за виділеннями порожнини рота на 9/10-ті дні після контрольного зараження, про що свідчить значне зниження вірусного навантаження (група T03) або відсоток позитивних свиней за виділеннями з порожнини рота (група T02) відносно контрольної групи.

Після контрольного зараження, ректальні температури були в значній мірі вище в обох вакцинованих групах в порівнянні з контрольною групою в DC+3. В той же час частина свиней з лихоманкою ($RT \geq 40,5^\circ\text{C}$) в групах, вакцинованих IVP в.м. та і.н. способом, складала 6/18 (33 %) та 9/17 (53 %), відповідно. У контрольній групі, лише у 1/20 (5 %) була лихоманка в DC+3. Однак слід відмітити, що в той час (DC+3) вірусне навантаження, виявлене у сироватці крові, дійсно значно знижувалось в обох вакцинованих групах в порівнянні з контрольною групою, що дозволяє припустити, що реплікація PRRSV, ймовірно, була не єдиною причиною підвищеної ректальної температури, яка спостерігалась у вакцинованих свиней незабаром після контрольного зараження. Крім того, з того моменту ректальні температури у вакцинованих свиней знижувались, і до 8-ого дня після зараження середні ректальні температури у всіх групах вже були нижче 40°C .

Крім підвищених ректальних температур, в жодної зі свиней в жодній групі не було клінічних ознак, зіставних з PRRSV (ненормальний стан тіла, депресія, респіраторний дистрес, кашель або чхання) протягом всього періоду після контрольного зараження. Крім того, між групами не

було виявлено жодних розбіжностей у масі тіла або середньодобовому прирості маси.

Під час розтину 18/20 свиней (90 %) з контрольної групи T01 мали позитивний візуальний показник легень, що свідчить про те, що зараження PRRSV було вдалим стосовно індукування ураження легень. В групах T02 та T03 12/17 (71 %) та 7/16 (44 %) свиней також дали позитивні результати. Порівняння між групами лікування показало значно більш високий % легень з ураженнями в контрольній групі, ніж у вакцинованих групах, демонструючи перевагу вакцинації за рахунок зменшення уражень легень, зв'язаних з PRRSV, незалежно від способу введення.

Серологічні дані продемонстрували, що вакцинація з використанням IVP з використанням в.м. або і.н. способу індукувала розвиток PRRSV-специфічних антитіл протягом 28 днів після вакцинації. Всі вакциновані свині були серопозитивними до антитіл PRRSV під час контрольного зараження (через 6,5 місяців після вакцинації), що свідчить про те, що обидва способи введення могли викликати сильну та захисну відповідь антитіл на вакцинацію. Однак порівняння між вакцинованими групами показало значно більш високі титри антитіл в групі, вакцинованої і.н. способом введення, в порівнянні з групою, вакцинованою в.м. способом введення.

Хоча вакцинація і.н. та в.м. способом забезпечувала чіткий захист від PRRSV в контрольному зараженні через 26 тижнів після вакцинації, порівняння між групами продемонструвало, що через 3 дні після контрольного зараження у групи, вакцинованої і.н. способом (T03), була значно більш низька вірусемія, виділення з носа та виділення з порожнини рота в порівнянні з групою, вакцинованою внутрішньом'язово (T02). Дані результати показують, що в умовах представленого дослідження захист, отриманий після і.н. вакцинації, був сильніше, ніж після в.м. вакцинації. Дані розбіжності у вірусологічному результаті могли б бути пояснені значно більш високими титрами антитіл, виявленими ІФА перед контролним зараженням в групі, вакцинованою і.н. (діапазон співвідношення S/P: 0,665-2,422), в порівнянні з групою вакцинованою в.м. (діапазон співвідношення S/P: 0,477-1,959).

Вакцинація шляхом одноразового введення вакцини MLV EU PRRS (SEQ ID NO: 5), що містить дозу 2,5 log₁₀ CCID₅₀, серонегативним свиням у 1-денному віці, або в.м., або і.н. способом, забезпечувала імунітет тривалістю 26 тижнів, так як це видно по значному зниженню вірусного навантаження, виявленого у сироватці після контрольного зараження патогенним штамом EU PRRSV через 26 тижнів після вакцинації. Ефективність також була підтверджена значним зниженням відсотка уражень легень під час розтину, а також зменшенням виділення з носа та порожнини рота.

Лабораторні способи

Стосовно ЗТ-кПЛР, вірусемія (навантаження PRRSV в сироватці) та виділення (навантаження PRRSV в матеріалі мазку) вимірювали за допомогою кПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ), яка виконується після локальної SOP на зразках сироватки, зібраних перед вакцинацією (D-1), перед контролним зараженням (D62) та у 3, 5, 7 та 10-ий дні після контрольного зараження (D66, D68, D70 та D73). Коротко, очищена вірусна РНК використовувалась як матриця, транскрибована зворотно при 50 °C протягом 30 хвилин та денатурована при 95 °C протягом 5 хвилин. ПЛР програма відповіді складалася з 40 циклів денатурації при 95 °C протягом 20 секунд та ренатурації при 53 °C протягом 40 секунд. ЗТ-кПЛР проводили у термоблоці системи ПЛР в реальному часі 7500. Праймери, що підходять і зонд були вибрані для вірусу Лелістада наступним чином:

Прямий праймер (Лелістад F): 5'-GCACCACCTCACCCAGAC-3' (SEQ ID NO: 6, кінцева концентрація 0,5 мікромоль).

Зворотний праймер (Лелістад R): 5'-CAGTTCCTGCGCCTTGAT-3' (SEQ ID NO:7, кінцева концентрація 0,5 мікромоль).

Зонд (Лелістад S): 5'-6-FAM-CCTCTGCTTGCAATCGATCCAGAC –TAMRA-3" (SEQ ID NO:8, кінцева концентрація 0,6 мікромоль).

Серологія (ІФА)

Сироватки, зібрані перед вакцинацією (D0), перед контролним зараженням (D67) та під час розтину (D77), досліджували на антитіла до PRRSV з використанням ІФА IDEXX PRRS X3, дотримуючись інструкцій виробника. Коротко, зразки сироватки розводили 1:40 у 96-лунковому планшеті, покритому рекомбінантним антигеном PRRSV, та інкубували 30 хвилин при 18-26 °C. Після промивання додавали анти-свинячий пероксидазний кон'югат хрину, та планшети інкубували протягом ще 30 хвилин при 18-26 °C. Незв'язаний кон'югат вимивали і у лунки додавали субстрат ТМВ. Розвиток кольору вимірювали за 650 нм. Значення S/P були записані для кожного зразка. Якщо співвідношення S/P складало $\geq 0,4$, зразок був класифікований як позитивний на антитіла до РРСС. Якщо співвідношення S/P складало $< 0,4$, то зразок був класифікований як негативний. Інструкції ІФА були включені до файлу дослідження.

Приклад 4 - Виникнення імунітету (ООІ) від модифікованої живої вакцини EU PRRSV,

введеної 2-тижневим свиням проти контрольного зараження європейським ізолятом PRRS через 4 тижні після вакцинації.

Мета даного дослідження полягала у тому, щоб оцінити виникнення імунітету (ООІ) від експериментальної вакцини MLV ЄС PRRSV (вірус SEQ ID NO: 5), яку вводять свиням 2-тижневого віку для профілактики респіраторного захворювання, викликаного PRRSV, через 4 тижні після вакцинації. Первинною змінною під час визначення профілактики захворювання було вірусне навантаження у сироватці крові в групі лікування T02 (вакцинованою досліджуваним об'єктом) в порівнянні з групою T01 (вакцинованою контрольним продуктом), що підтверджується ураженнями легень, виділенням з ротової порожнини та назальним виділенням, клінічними спостереженнями, ректальними температурами та масою тіла.

У віці 14-15 днів, одноразову дозу 2,0 мл контрольного продукту (CP) або досліджуваного об'єкту (вірус TI, SEQ ID NO:5) вводили у вигляді внутрішньом'язової ін'єкції кожній тварині. Через чотири тижні після вакцинації, свиней піддавали контрольному зараженню інтраназально ізолятом EU PRRSV Olot/91 як респіраторне контрольне зараження. Під час фази контрольного зараження, зразки крові, назальні виділення та виділення з порожнини рота, клінічні спостереження та ректальні температури збирались кожні 2-3 дні до дня розтину. Свиней зважували за день перед вакцинацією, перед контрольним зараженням та під час розтину. Через десять днів після контрольного зараження, свиней анестезували, піддавали евтаназії та розтину. Після розтину легені оцінювали на наявність уражень та осередків PRRSV. Дане дослідження було дійсним, оскільки свині T01 залишалися PRRSV серо- та вірусно-негативними протягом періоду вакцинації, та не було виявлено жодних змішаних факторів захворювання.

Захисний ефект вакцинації спостерігався під час порівняння вірусного навантаження у сироватці крові між групами. Група, вакцинована T1 (T02), мала значно більш низькі вірусні титри в порівнянні з контрольною групою у всі дні забору зразків після контрольного зараження.

Ефективність також була підтверджена значним зниженням відсотка легень з ураженнями під час розтину (через 10 днів після контрольного зараження), зниженням назальних виділень та виділень з порожнини рота, а також зниженням ректальних температур через 7 днів після контрольного зараження. Жодних розбіжностей у масі тіла виявлено не було. Вакцинація індукувала розвиток PRRSV-специфічних антитіл протягом 4 тижнів після вакцинації. Через десять днів після контрольного зараження, титри антитіл залишалися значно вищі в групі T02 в порівнянні з контрольною групою (T01). На завершення слід зазначити, що одноразове внутрішньом'язове введення експериментальної вакцини EU PRRSV MLV, що містить дозу 2,0 $\log_{10}$ CCID₅₀ свиням 14-15 денного віку (серонегативні відносно PRRSV) захищало від респіраторного захворювання, викликаного після контрольного зараження патогенним штамом EU PRRS через 4 тижні після вакцинації. Дизайн експерименту виглядає наступним чином:

Група	ВАКЦИНАЦІЯ (День 0)		КОНТРОЛЬНЕ ЗАРАЖЕННЯ (День 27)		№
	Досліджуваний матеріал	Доза	Досліджуваний матеріал	Доза	
T01	Контрольний продукт	2 мл	PRRSV Olot/91	5.4 $\log_{10}$ CCID ₅₀ /2 мл	20
T02	Досліджуваний продукт	2,0 $\log_{10}$ CCID ₅₀ /2 мл	PRRSV Olot/91	5.4 $\log_{10}$ CCID ₅₀ /2 мл	20

На 27-ий день після повторного розміщення у стайнях свиней, всіх тварин піддавали контрольному зараженню 2 мл контрольного штаму Olot/91 інтраназальним (IN) способом. Свиней піддавали контрольному зараженню загальним об'ємом контрольного зараження 2,0 мл шляхом закапування 1,0 мл матеріалу, що зараджує в кожну ніздрю. Свині утримувались в положенні з піднятою головою протягом декількох секунд після контрольного зараження.

Клінічні спостереження та ректальні температури

Клінічні спостереження включали загальний стан, депресію, чхання, кашель та дихальну недостатність. Ректальні температури реєстрували відповідно з місцевими стандартними процедурами. В ті дні (перед та після вакцинації/контрольної імунізації), коли повне клінічне обстеження не проводилось, загальний стан здоров'я свиней спостерігали та реєстрували у формах щоденного огляду по догляду за тваринами (DRAC), дотримуючись стандартної SOP.

Розтин та оцінка легені.

Під час розтину ураження легень оцінювали з використанням наступних способів: 1) відсоток ущільнення для кожної частки (лівої краніальної частки, лівої середньої частки, лівої каудальної частки, правої краніальної частки, правої середньої частки, правої каудальної частки та додаткової частки) буде оцінюватися та реєструватися як відсоток частки, що спостерігається

з ураженнями; та 2) числовий візуальний бал (0, 1, 2, 3).

ЗТ кПЛР

Вірусемія (навантаження PRRSV у сироватці) та виділення (навантаження PRRSV у назальних виділеннях та виділеннях з порожнини рота) вимірювались за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (кПЛР) зі зворотною транскриптазою (ЗТ), що здійснюється відповідно до стандартних процедур. Коротко, очищену вірусну РНК використовували як матрицю, зворотно транскрибували при 50 °С протягом 30 хвилин та денатурували при 95 °С протягом 5 хвилин. Програма ПЛР реакцій складалася з 40 циклів денатурації при 95 °С протягом 20 секунд та ренатурації при 53 °С протягом 40 секунд. ЗТ-кПЛР проводили у системному термоблоці ПЛР у реальному часі 7500. Результати виражали у вигляді копій РНК/мл.

Серологія

Сироватки, зібрані перед вакцинацією, перед контрольним зараженням та під час розтину, були досліджені на антитіла до PRRSV з використанням ІФА IDEXX PRRS X3, дотримуючись інструкцій виробника. Коротко, зразки сироватки розводили 1:40 у 96-лунковому планшеті, покритому рекомбінантним антигеном PRRSV, та інкубували 30 хвилин при 18-26 °С. Після промивання додавали анти-свинячий кон'югат пероксидази хрину, та планшети інкубували протягом ще 30 хвилин при 18-26 °С. Незв'язаний кон'югат вимивали та у лунки додавали субстрат ТМВ. Розвиток кольору вимірювали при 650 нм. Значення S/P були записані для кожного зразка. Якщо співвідношення S/P складало $\geq 0,4$ зразок був класифікований як позитивний на антитіла до PRRS. Якщо співвідношення S/P складало $< 0,4$ зразок був класифікований як негативний. Інструкції за ІФА включаються у файл дослідження. Дослідження закінчилось на 37 день (евтаназія).

Вірусемія та виділення

Перед статистичним аналізом дані ЗТ-кПЛР були перетворені з використанням відповідного логарифмічного перетворення. Перетворені дані були проаналізовані з використанням загальної лінійної змішаної моделі з повторними вимірюваннями. Попарне порівняння лікування проводилось у кожний момент часу, якщо ефект лікування або вплив контрольного моменту часу на результати лікування є значним ($P \leq 0,05$). Середнє значення за методом найменших квадратів та 95 % довірчі інтервали були зворотно перетворені для представлення. Відсоток днів вірусемії/виділень був також розрахований. Кожний зразок був визначений як позитивний, якщо >250 PRRSV копій РНК/мл, що відповідало половині межі виявлення методу (500 PRRSV копій РНК/мл зразка). Також було визначено, чи була тварина коли-небудь вірусемічною або коли-небудь мала виділення протягом днів ≤ 27 (стосується перед контрольним зараженням) та днів >27 (після контрольного зараження).

Ураження легень

Відсоток від загальної частини легені з ураженнями розраховували, використовуючи наступну формулу: Відсоток від загальної частини легені з ураженнями = $(0,10 \times \text{лівої краніальної частки}) + (0,10 \times \text{лівої середньої частки}) + (0,25 \times \text{лівої каудальної частки}) + (0,10 \times \text{правої краніальної частки}) + (0,10 \times \text{правої середньої частки}) + (0,25 \times \text{правої каудальної частки}) + (0,10 \times \text{додаткової частки})$. Перетворення квадратного кореня арксинуса застосовували до відсотку від загальної частини легень з ураженнями до аналізу. Трансформовані ураження легень аналізували за загальною лінійною змішаною моделлю. Попарне порівняння було зроблене між групами лікування, якщо ефект лікування був значним. Розраховували зворотно перетворені середні значення за методом найменших квадратів відсотка загальної частини легень з ураженнями, їх стандартні помилки, та їх 95 % довірчі інтервали, а також мінімуми та максимуми. Частотні розподілення балів оцінки ураження легень розраховували для кожної процедури. Бали, нормальні або ненормальні, були проаналізовані з використанням загальної лінійної змішаної лінійної моделі для біноміальних даних. Якщо загальна лінійна змішана модель не сходилась, для аналізу даних використовувався точний критерій Фішера. Якщо основний ефект лікування був значним, то проводилось парне порівняння лікування.

Оцінка легені

Відсоток легень з ураженнями для кожної групи лікування показаний в таблиці 8. Візуальні оцінки легень представлені в таблиці 9. Під час розтину 17/18 свиней (94,4 %) з контрольної групи T01 мали позитивний візуальний показник легень, який свідчить про те, що контрольне зараження PRRSV було вдалим в індукуванні уражень легень. В групі T02, 14/19 (73,7 %) свиней також були оцінені як позитивні. Контрольна група T01 мала в значній мірі більш високий середній відсоток LS легень з ураженнями в порівнянні з групою T02. Що стосується загального візуального показника легені, то легені від усіх свиней групи T02 були оцінені як 0 (без уражень) або 1 (легкі ураження). В контрольній групі T01 7/18 (38,9 %) свиней отримали візуальний бал 2

(помірні ураження). Жодній з легень в жодній з груп не було надано візуальне значення 3 (тяжкі ураження).

Таблиця 8

Підсумовування результатів відсотка легень з ураженнями

	№	Зворотно перетворене середнє значення LS	Стандартна помилка	Нижче 95 % CL	Вище 95 % CL	Діапазон
T01	18	7 ^a	2	4	11	От 0 до 29
T02	19	2 ^b	1	1	5	От 0 до 10

Різні індекси означають значні розбіжності між групами.

Таблиця 9

Візуальний показник легені за групами лікування

Обробка	Візуальний показник						Загальні спостереження
	0 (жодних уражень)		1 (слабкі ураження)		2 (помірні ураження)		
	Кількість	%	Кількість	%	Кількість	%	Кількість
T01	1	5,6	10	55,6	7	38,9	18
T02	4	26.3	14	73.7	0	0.0	19

5

Результати ЗТ-кПЛР, вірусемія (навантаження PRRSV у сироватці крові)

Всі свині, як було виявлено, є PRRSV-негативними за ЗТ-кПЛР в крові на день 0. Під час контрольного зараження (27-ий день), РНК PRRSV можна було виявити у 100 % свиней, вакцинованих Т1 (група Т02). До того часу всі свині Т01 були все ще PRRSV-негативними. У контрольних свиней, вірусемія була вперше виявлена на 29 день (через 2 дні після контрольного зараження), і свині залишалися позитивними на PRRSV до кінця дослідження. У всі дні забору зразків після контрольного зараження, вірусні навантаження, виявлені у контрольній групі Т01, були значно вище, виявлені у групі Т02. В таблиці 10 підсумовані результати вірусемії з 27-го дня (дня контрольного зараження) по 36-ий день. Підсумовування результатів середніх значень, отриманих методом найменших квадратів та розбіжностей середніх значень LS між групами показана у таблиці 11.

10

15

Таблиця 10

Підсумовування результатів вірусемії за групами та днем дослідження

	День дослідження	Log10копій РНК / мл сироватки					% вірусемічних свиней
		Середнє значення за методом найменших квадратів	Стандартна помилка	Діапазон	Нижче 95 % довірчої межі	Вище 95 % довірчої межі	
T01	День 27	2,4	0,16	від 2,4 до 2,4	2,0	2,8	0,0 %
T02	День 27	6,0	0,16	від 4,6 до 7,8	5,6	6,4	100,0 %
T01	День 29	7,4	0,25	від 5,3 до 9,4	6,8	7,9	100,0 %
T02	День 29	5,6	0,25	від 3,8 до 7,8	5,1	6,1	100,0 %
T01	День 31	8,1	0,27	від 6,3 до 9,2	7,5	8,6	100,0 %

Таблиця 10 (продовження)

	День дослідження	Log10копій РНК / мл сироватки					% вірусемічних свиней
		Середнє значення за методом найменших квадратів	Стандартна помилка	Діапазон	Нижче 95 % довірчої межі	Вище 95 % довірчої межі	
T02	День 31	6,9	0,27	від 4 до 8,9	6,4	7,5	100,0 %
T01	День 34	7,3	0,24	від 5,4 до 8,4	6,8	7,8	100,0 %
T02	День 34	6,4	0,24	від 4,2 до 8	5,9	6,9	100,0 %
T01	День 36	7,2	0,28	від 5,7 до 8,6	6,6	7,7	100,0 %
T02	День 36	5,6	0,28	від 2,7 до 8,4	5,0	6,2	100,0 %

Позитивна ЗТ-кПЛР: > 2,4 log10 копій РНК/мл

Таблиця 11

Підсумовування результатів таблиці середніх значень, отриманих методом найменших квадратів для результатів за вірусемією

Номер лікування	Середнє значення за методом найменших квадратів на різні дати дослідження				
	День 27	День 29	День 31	День 34	День 36
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

Різні індекси означають значні розбіжності між групами.

Назальні виділення та виділення з порожнини рота

- 5 Всі свині, як було виявлено, є PRRSV-негативними за ЗТ-кПЛР у мазках з носа та порожнини рота на день 0. Під час контрольного зараження (27-ий день), у 70 % та 85 % свиней вакцинованих T1 (група T02) виявлялася РНК PRRSV в назальних виділеннях та виділеннях з порожнини рота, відповідно. Жодна свиня з групи T01 не виділяла в той момент часу. Протягом
- 10 періоду після контрольного зараження, відсоток назальних виділень в групі T01 знаходився в діапазоні від 85 % (34-ий День) до 100 % (29-ий День). В групі T02, відсотки назальних виділень знаходились в діапазоні від 42 % (36-ий День) до 90 % (29-ий День). Що стосується виділення з порожнини рота, відсоток позитивних свиней знаходився в діапазоні від 95 до 100 % в групі T01 та від 73,7 до 100 % в групі T02. Порівняння LSM між групами продемонструвало значні, більш
- 15 високі вірусні навантаження в групі T01 у всі дні після контрольного зараження, але на 34-ий день для назальних мазків та на 31-ий і 36-ий день для виділень з порожнини рота.

Результати стосовно назальних виділень та виділень з порожнини рота з 27-ого дня (дня контрольного зараження) до 36-ого дня підсумовані у таблиці 12, і таблиці 14 відповідно. Короткий виклад LSM та LS середніх значень відмінностей між групами показані у таблицях 13 та 15.

Таблиця 12

Підсумовування результатів назальних виділень за групою та днем дослідження

	День дослідження	Копій РНК / мл (на мазок)					% виділення свиней
		Середнє значення за методом найменших квадратів	Стандартна помилка	Діапазон	Нижче 95 % довірчої межі	Вище 95 % довірчої межі	
T01	День 27	2,4	0,19	від 2,4 до 2,4	2,0	2,8	0,0 %
T02	День 27	3,5	0,26	від 2,4 до 4,9	3,0	4,1	70,0 %
T01	День 29	6,5	0,19	від 5,4 до 7,6	6,1	6,9	100,0 %
T02	День 29	4,8	0,26	від 2,4 до 6,8	4,2	5,3	90,0 %
T01	День 31	6,4	0,19	від 5,2 до 7,7	6,0	6,8	100,0 %
T02	День 31	5,0	0,27	від 2,4 до 6,8	4,5	5,5	94,7 %
T01	День 34	4,5	0,19	від 2,4 до 6,9	4,1	4,9	85,0 %
T02	День 34	4,2	0,27	від 2,4 до 7,2	3,7	4,8	84,2 %
T01	День 36	4,7	0,20	від 2,4 до 6,5	4,3	5,1	88,9 %
T02	День 36	3,3	0,27	від 2,4 до 5,6	2,8	3,9	42,1 %

Позитивна ЗТ-кПЛР: > 2,4 log₁₀ копій РНК/мл

Таблиця 13

Підсумовування результатів таблиці середніх значень, отриманих методом найменших квадратів для назальних виділень

Номер лікування	Середнє значення за методом найменших квадратів на різні дати дослідження				
	День 27	День 29	День 31	День 34	День 36
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

Таблиця 14

Підсумовування результатів виділень з ротової порожнини за групою та днем дослідження

	День дослідження	Копій РНК / мл (на мазок)					% виділення свиней
		Середнє значення за методом найменших квадратів	Стандартна помилка	Діапазон	Нижче 95 % довірчої межі	Вище 95 % довірчої межі	
T01	День 27	2,4	0,19	від 2,4 до 2,4	2,0	2,8	0,0 %
T02	День 27	4,9	0,26	від 2,4 до 7,4	4,3	5,4	85,0 %
T01	День 29	4,2	0,19	від 2,4 до 5,9	3,8	4,6	95,0 %
T02	День 29	4,0	0,26	від 2,4 до 5,2	3,5	4,6	90,0 %
T01	День 31	5,2	0,19	від 4 до 6,9	4,8	5,6	100,0 %

Таблиця 14 (продовження)

	День дослідження	Копій РНК / мл (на мазок)					% виділення свиней
		Середнє значення за методом найменших квадратів	Стандартна помилка	Діапазон	Нижче 95 % довірчої межі	Вище 95 % довірчої межі	
T02	День 31	4,4	0,26	від 2,4 до 6,6	3,8	4,9	94,7 %
T01	День 34	4,9	0,19	від 3,7 до 6,7	4,5	5,3	100,0 %
T02	День 34	4,6	0,26	від 3 до 5,8	4,1	5,1	100,0 %
T01	День 36	4,6	0,20	від 3,5 до 6,1	4,2	5,0	100,0 %
T02	День 36	3,8	0,26	від 2,4 до 5,2	3,3	4,4	73,7 %

Позитивна ЗТ-кПЛР: > 2,4 log₁₀ копій РНК/мл

Таблиця 15

Підсумовування результатів таблиці середніх значень, отриманих методом найменших квадратів для виділень з ротової порожнини

Номер лікування	Середнє значення за методом найменших квадратів на різні дати дослідження				
	День 27	День 29	День 31	День 34	День 36
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

Різні індекси означають значні розбіжності між групами.

Серологія

- 5 Всі свині були серологічно негативними відносно PRRSV перед вакцинацією (співвідношення S/P IDEXX <0,4). Під час контрольного зараження (через 4 тижні після вакцинації), всі контрольні свині залишалися серонегативними, в той час як 90 % свиней, вакцинованих Т1 були сероконвертовані PRRSV (співвідношення S/P IDEXX > 0,4). На 36-ий день (через 9 днів після контрольного зараження), всі свині були серопозитивними до PRRSV.
- 10 Свині з групи T02 мали в значній мірі більш високі середні значення LS титрів антитіл в порівнянні з контрольною групою T01. В таблиці 16 підсумовані серологічні результати, отримані за допомогою ІФА.

Таблиця 16

Результати співвідношення S/P за ІФА (середні значення LS і діапазон) та % серопозитивності свиней за групою та днем лікування

Обробка	День 27		День 36	
	середні значення LS (діапазон)	% серопозитивності	середні значення LS (діапазон)	% серопозитивності
T01	0,011 ^a (від -0,087 до 0,123)	0,0 %	1,582 ^a (від 0,846 до 2,357)	100 %
T02	1,617 ^b (від 0,31 до 2,561)	90 %	1,960 ^b (від 0,762 до 2,884)	100 %

Різні індекси означають значні розбіжності між групами.

Обговорення

- 15 В даному дослідженні оцінювали виникнення імунітету (ООІ) від модифікованої живої вакцини проти PRRSV у свиней, вакцинованих у віці 14-15 днів після інюкуляції патогенним ізолятом PRRSV генотипу І, як респіраторне контрольне зараження через 4 тижні після вакцинації. Дослідження було дійсним, оскільки всі свині T01 залишалися PRRSV серо- та віро-
- 20 негативними протягом періоду вакцинації, та не було виявлено жодних змішаних факторів

захворювання.

Первинною змінною під час виявлення ефективності було вірусне навантаження у сироватці крові групи лікування T02 в порівнянні зі свинями T01. Ураження легень, ректальні температури, виділення, клінічні ознаки та маса тіла порівнювались як вторинні змінні.

Захисний ефект вакцинації спостерігався під час порівняння вірусного навантаження у сироватці крові між групами T01 та T02; група, вакцинована T1, мала значно більш низькі титри вірусу в порівнянні з контрольною групою T01 у всі дні забору проб після контрольного зараження.

Після контрольного зараження у всіх свиней можуть бути виявлені виділення з порожнини рота та носа незалежно від групи обробки. Проте, значно більш високі вірусні навантаження були виявлені у групі T01, причому всі дні, крім дня 34, для мазків з носа та на 31-ий та 36-ий день для виділень з порожнини рота.

Що стосується уражень легень, захисний ефект вакцини також спостерігався у свиней T02 під час порівняння середнього значення зворотного перетворення за методом найменших квадратів відсотка уражень легень між групами. Крім того, всі 14 свиней з групи T02, яким під час розтину дали позитивний візуальний бал, були оцінені як 1 (слабкі ураження). Навпаки, легені з 17 свиней в групі T01, які також отримали позитивний результат, 10 отримали оцінку 1 (слабкі ураження) і 7 – оцінку 2 (помірні ураження).

Протягом періоду після контрольного зараження, ректальні температури були значно нижче у свиней, вакцинованих T1, на 7-ий день після контрольного зараження. До цього часу у 20 % свиней з групи T01 була лихоманка, тоді як у жодної свині з групи T02 лихоманки не було. Перед контрольним зараженням, ректальні температури в групі T02 були значно нижче в порівнянні з T01. Однак у жодної зі свиней не було лихоманки, і в цій групі не було явного клінічного стану, який міг би викликати підвищення ректальної температури. Крім підвищення ректальної температури, жодних інших клінічних спостережень, сумісних з PRRS (депресія, респіраторний дистрес, кашель або чхання), не спостерігалось у жодної свині протягом всього періоду часу. Крім того, жодних розбіжностей у масі тіла не могло бути виявлено в будь-який момент часу між групами.

Серологічні дані продемонстрували, що вакцинація T1 (група T02) викликала розвиток PRRSV-специфічних антитіл протягом 4 тижнів після вакцинації. Титри антитіл в групі T02 збільшувались до кінця дослідження і були в значній мірі вище, ніж титри, виявлені до того часу в невакцинованій групі T01 з контрольним зараженням.

Вакцинація одноразовим внутрішньом'язовим введенням експериментальної вакцини MLV EU PRRSV, що містить дозу 2,0 log₁₀ CCID₅₀ свиням 14-15 денного віку захищала від PRRSV, про що свідчить значне зниження вірусного навантаження, виявленого у сироватці крові після контрольного зараження патогенним штамом EU PRRS через 4 тижні після вакцинації. Ефективність була також підтверджена захисним ефектом, що спостерігається відносно відсотка уражень легень під час розтину (через 10 днів після контрольного зараження), зниженням виділень з ротової порожнини та назальних виділень, а також зниженням ректальної температури через 7 днів після контрольного зараження.

Приклад 5.- Оцінка потенційного впливу антитіл материнського походження на ефективність модифікованої живої вакцини EU PRRSV, введеної одноденним серопозитивним свиням проти зараження європейським ізолятом PRRSV.

Мета представленого дослідження полягала в тому, щоб оцінити вплив антитіл материнського походження (MDA) на ефективність MLV EU PRRS (вірус, що експресується з SEQ ID NO: 5) під час введення поросят у 1-денному віці внутрішньом'язовим (в.м., група T02) або інтраназальним (і.н., група T03) способом.

Дослідження було розроблене на основі рекомендацій EMA/CVMP/WP/439467/2007: "Reflection paper on the demonstration of a possible impact of maternally derived antibodies on vaccine efficacy in young animals" та Європейської фармакопеї (Ph. Eur.) Монографія 04/2008:50207: "Evaluation of efficacy of veterinary vaccines and immunosera". Обидва документи рекомендують, що слід адекватно оцінити вплив пасивно здобутих та отриманих від матері антитіл на ефективність вакцини. Крім того, у EMA/CVMP/WP/439467/2007 говориться, що ефективність вакцини у тварин, вакцинованих в присутності MDA, повинна, незважаючи на нормальні біологічні варіації, бути аналогічній тій, яка була отримана у тварин того ж віку, але вакцинованої у відсутності MDA.

На основі вищезгаданих специфікацій виникнення захисного імунітету (OOI) модифікованої живої вакцини проти EU PRRSV було оцінено у серопозитивних свиней, вакцинованих (в.м. та і.н. способом), у 1-денному віці після інюкуляції патогенним ізолятом PRRSV генотипу I як респіраторне контрольне зараження. Тварин піддавали контрольному зараженню в той час,

коли рівні MDA, виявлені з використанням тесту серонейтралізації (SNT) у контрольній групі (T01), ставали такими, що не виявляються. Для того, щоб продемонструвати захист проти зараження, були оцінені ті ж параметри, які оцінювались у попередньому дослідженні, проведеному на серонегативних тваринах (вірусне навантаження у сироватці крові, ураження легень, ректальні температури, виділення, клінічні ознаки та маса тіла).

Дослідження було дійсним, так як всі контрольні свині (група T01) залишалися віро-негативними на PRRSV протягом періоду вакцинації, і не було виявлено жодних супутніх факторів захворювання.

Коли MLV EU PRRS вводили в.м. способом, спостерігався захисний ефект вакцинації, про що свідчить значне зниження вірусного навантаження у сироватці в порівнянні з контрольною групою; ефективність також була підтверджена значним зниженням назальних виділень та виділень з порожнини рота, а також значним зниженням ректальної температури. Розбіжності у середньому значенні відсотка уражень легень були близькі до значення ($p = 0,092$). Ефективність, яка спостерігається після в.м. введення у представленому дослідженні, є аналогічною ефективності, отриманої у попередньому дослідженні, в якому ефективність оцінюється у серонегативних тварин; в обох дослідженнях значний вплив вакцинації спостерігався на первинну змінну (зниження вірусемії), а також підтверджувалось зниженням назальних виділень та ректальної температури.

Коли MLV EU PRRS вводився і.н. способом, не було досягнуто жодного захисту від контрольного зараження PRRSV, про що свідчить відсутність значних розбіжностей в жодному з оцінюваних параметрів.

На закінчення слід зазначити, що результати представленого дослідження демонструють відсутність інтерференції материнських антитіл з ефективністю вакцини, коли вакцина вводиться внутрішньом'язово поросят у 1-денному віці. Однак, коли вакцина вводиться і.н. способом, у більшості свиней імунна відповідь після вакцинації не викликала, очевидно, через нейтралізацію вакцини MDA. Для отримання позитивних на PRRSV MDA поросят шість вагітних свиноматок були вакциновані вакциною MLV EC PRRSV партії VMRD13-015 ($5 \log_{10} \text{CCID}_{50}/2 \text{ мл}$) протягом першої половини вагітності (45 днів вагітності). За день до передбачуваної дати опоросу погоди були викликані внутрішньом'язовою ін'єкцією клопростенолу (Cyclix® Porcino, Virbac). Всі свиноматки опоросились на наступний день. Всі свиноматки були серопозитивними до PRRS на 0-ий день. Результати показані.

Вакцинний вірус вводили із вмістом діючої речовини $6,0 \log_{10} \text{CCID}_{50}/\text{мл}$. На день 0, IVP розбавляли вакцинним розріджувачем (партія T22019) для того, щоб відповідати цільовому титру ($2,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}/2 \text{ мл}$). Одну аліквоту IVP збирали для титрування на клітинах BHK-21-C12-26 для підтвердження дозування. Додатковий зразок IVP заморожували ($-80 \pm 10^\circ \text{C}$) та зберігали як контрольний зразок. Титрування на клітинах BHK-21-C12-26 проводили відповідно до місцевих стандартних процедур. Відновлена та розбавлена вакцина мала титр $101,8 \text{CCID}_{50}/\text{мл}$, який відповідає $102,1 \text{CCID}_{50}/2 \text{ мл}$ ($2,1 \log_{10} \text{CCID}_{50}/2 \text{ мл}$).

На день 0, поросят вакцинували IVP або CP як описано у розділі 4. Поросят груп T01 та T02 ін'єкційно внутрішньом'язово вводили в правий бік шиї. Поросят груп T01 та T03 вводили інтраназально, доставляючи 1,0 мл у кожную ніздрю. Матеріалом для контрольного зараження був іспанський ізолят Olot/91 PRRSV генотипу 1, вирощений у свинячих альвеолярних макрофагах (PAM). Даний штам був виділений у 1991 році під час випадку пізнього аборт у свиноматок.

Вірусемія

Всі свині, як було виявлено, є PRRSV-негативними за ЗТ-кПЛР у сироватці крові перед вакцинацією (D0), і всі свині з групи T01 залишалися такими до контрольного зараження. Навпаки, 8/16 (50 %) поросят з групи T02 (вакциновані в.м) та 1/19 (5,3 %) поросят з групи T03 (вакциновані і.н.) були PRRSV-позитивними ЗТ-кПЛР під час контрольного зараження (через 67 днів після вакцинації).

Після контрольного зараження, 100 % свиней з групи T01 ставали вірусемічними у D70 (через 3 дні після контрольного зараження) та залишалися позитивними до кінця дослідження (DC+10). У вакцинованих групах (T02 та T03), у всіх свиней був виявлений позитивний результат PRRSV, щонайменше, один раз; однак, до кінця дослідження (DC+10), лише 11/16 свиней T02 (68,8 %) все ще були вірусемічними. Навпаки, всі свині T03, крім однієї, були позитивними у всіх точках забору зразків після контрольного зараження.

Свині з групи T02 мали в значній мірі нижче вірусне навантаження у сироватці, ніж у свиней з контрольної групи T01 у всі дні забору зразків після контрольного зараження. Під час DC+3 та DC+10, вірусне навантаження у групі T02 також було у значному ступені нижче, ніж у групі T03. Жодних значних різниць не було виявлено між групами T01 та T03.

Таблиця 17 підсумовує результати вірусемії протягом 10-денного періоду після контрольного зараження.

Таблиця 17

Підсумовування результатів вірусемії за групою та днем дослідження (дата фази контрольного зараження)

Група	День дослідження	№	Log10копій РНК / мл сироватки					% віремичних тварин
			Середні значення отримані методом найменших квадратів	SE	Діапазон	Нижче 95 % СВ	Вище 95 % СВ	
T01	D67 (DC)	18	1,65	0,20	от 1,70 до 1,70	1,24	2,05	0,0
T02	D67 (DC)	16	2,25	0,36	от 1,70 до 3,84	1,53	2,97	50,0
T03	D67 (DC)	19	1,82	0,29	от 1,70 до 3,80	1,25	2,40	5,3
T01	D70 (DC+3)	18	6,60	0,20	от 5,23 до 7,66	6,20	7,01	100,0
T02	D70 (DC+3)	16	2,87	0,36	от 1,70 до 6,59	2,15	3,59	50,0
T03	D70 (DC+3)	19	6,30	0,29	от 1,70 до 8,10	5,72	6,87	94,7
T01	D73 (DC+6)	18	6,39	0,20	от 4,87 до 7,44	5,99	6,80	100,0
T02	D73 (DC+6)	16	5,18	0,36	от 1,70 до 7,00	4,45	5,90	93,8
T03	D73 (DC+6)	19	5,80	0,29	от 1,70 до 7,70	5,22	6,37	94,7
T01	D75 (DC+8)	18	5,32	0,20	от 3,32 до 7,21	4,92	5,73	100,0
T02	D75 (DC+8)	16	4,18	0,36	от 2,25 до 6,22	3,46	4,90	100,0
T03	D75 (DC+8)	19	5,07	0,29	от 1,70 до 7,13	4,50	5,65	94,7
T01	D77 (DC+10)	18	5,29	0,20	от 3,51 до 6,47	4,89	5,70	100,0
T02	D77 (DC+10)	16	2,96	0,36	от 1,70 до 5,86	2,23	3,68	68,8
T03	D77 (DC+10)	19	5,42	0,29	от 2,16 до 7,08	4,85	6,00	100,0

N: кількість; SE: Стандартна помилка; СВ: довірна межа; D= день дослідження; DC: день контрольного зараження; ЗТ-кПЛР позитивний: $> 1,7 \log_{10}$ копій РНК/мл

5 Вірусемія та виділення

Перед статистичним аналізом дані ЗТ-кПЛР були перетворені з використанням відповідного логарифмічного перетворення. Перетворені дані були проаналізовані з використанням загальної лінійної змішаної моделі з повторними вимірюваннями. Попарне порівняння лікування проводилось у кожний момент часу, якщо ефект лікування або вплив контрольного моменту часу на результати лікування були значними ($P \leq 0,05$). Середнє значення за методом найменших квадратів та 95 % довірчі інтервали були зворотно перетворені для представлення. Відсоток днів вірусемії/виділень також був розрахований. Кожний зразок, як було визначено, був позитивним якщо > 50 копій РНК/мл PRRSV, що відповідає половині межі виявлення методу (100 PRRSV копій РНК/мл). Крім того, було визначено, чи була тварина коли-небудь віремичною або коли-небудь мала виділення протягом днів $\leq DC$ (стосується перед контролним зараженням) та

днів >DC (після контрольного зараження).

Метою представленої дослідження було оцінити вплив антитіл материнського походження (MDA) на ефективність MLV EU PRRS, коли їх вводять поросятam 1-денного віку внутрішньом'язовим (в.м., група T02) або інтраназальним (і.н., група T03) способом. Ефективність оцінювали у серопозитивних свиней, вакцинованих у 1-денному віці після інокуляції патогенним ізолятом PRRSV генотипу I як респіраторне контрольне зараження. Тварин піддавали контрольному зараженню в той час, коли рівні MDA, виявлені SNT в групі T01, ставали такими, що не виявляються (День 67).

Первинною змінною під час визначення ефективності було вірусне навантаження у сироватці крові (вірусемія) в групах обробки T02 та T03 в порівнянні зі свинями групи T01. Ураження легень, ректальні температури, виділення, клінічні ознаки та маса тіла порівнювались як вторинні змінні.

Дослідження було дійсним, оскільки всі свині T01 залишалися вірусно-негативними на PRRSV протягом періоду вакцинації, і не було виявлено жодних змішаних факторів захворювання.

Захисний ефект вакцинації в.м. спостерігався під час порівняння вірусного навантаження у сироватці крові між групами T01 та T02; група, вакцинована IVP в.м. способом, мала значно більш низькі титри вірусу в порівнянні з контрольною групою T01 у всі дні забору зразків після контрольного зараження. Між групами T01 та T03 не було виявлено жодних відмінностей у титрах вірусу, що вказує на відсутність захисного ефекту від і.н. вакцинації на вірусне навантаження після контрольного зараження. Відсутність ефективності у групі T03 також була підтверджена значним збільшенням вірусного навантаження, що спостерігається в цій групі, в порівнянні з групою T02 через 3 та 10 днів після контрольного зараження.

Захист, забезпечений після в.м. вакцинації (група T02), був підтверджений значним зниженням відсотка назальних виділень, а також кількості вірусу, виявленого у назальних виділеннях та виділеннях з ротової порожнини в групі T02 в порівнянні з контрольною групою T01. Подібно тому, що спостерігалось для вірусемії, жодного позитивного ефекту вакцинації не спостерігалось під час виділення вірусу, коли IVP вводили і.н. способом (T03 група), оскільки не було виявлено жодних розбіжностей між групами T01 та T03. Фактично, кількість вірусу, що виділяється як назальним, так і оральним шляхом в групі T03 також була в значній мірі вище, ніж у групі T02.

Вакцинація в.м. способом також позитивно вплинула на ректальну температуру. Перед контрольним зараженням (D67), середні значення ректальних температур були в значній мірі нижче в групі T02 в порівнянні з T01 та T03; однак, оскільки у жодної зі свиней з будь-якої групи не було лихоманки ($RT \geq 40,5$) в той же час і ректальні температури на D67 реєструвалися до того, як тварини були взяті на фазу контрольного зараження, то можна зробити висновок, що дані розбіжності, ймовірно, пояснюються стресом тварин які були вперше оцінені. Протягом періоду після контрольного зараження, відсоток свиней, у яких була лихоманка, щонайменше, один раз складав 61 %, 31 %, та 42 % в групах T01, T02 та T03, відповідно. Контрольні свині (T01) мали в значній мірі більш високі ректальні температури, ніж свині, вакциновані IVP (групи T02 та T03) на день 70 (через 3 дні після контрольного зараження); однак, на DC+10, ректальні температури групи T03 були в значній мірі більш високі, ніж в групах T01 та T02. Крім підвищення ректальної температури, інших клінічних ознак, сумісних з інфекцією PRRSV, не спостерігалось. Що стосується маси тіла, жодного ефекту від вакцинації не спостерігалось, що видно по відсутності значних розбіжностей між групами.

Під час розтину 13/18 свиней (72 %) з контрольної групи T01 мали позитивний бал за візуальною оцінкою легень. В групах T02 та T03, 7/16 (44 %) та 13/19 (68 %) свиней також отримали позитивний бал. Порівняння між групами лікування не показало жодних значних розбіжностей у % легень з ураженнями. Однак розбіжності, що спостерігаються між контрольною групою T01 та групою, вакцинованою IVP в.м. способом (T02) були близькі до значущості ($p=0.092$).

Всі свині мали присутність PRRSV-специфічних антитіл перед вакцинацією, як було виміряно за допомогою ІФА (співвідношення S/P $\geq 0,4$), таким чином, відповідаючи критеріям включення. Перед контрольним зараженням (через 67 днів після вакцинації), 39 % свиней в контрольній групі все ще залишалися серопозитивними, що вказувало на наявність MDA, що залишилися на той час (середнє значення співвідношення S/P: 0,279). Однак той факт, що у всіх свиней з контрольної групи розвинулась вірусемія після контрольного зараження, і що 13/18 мали також позитивний бал при оцінці легень під час розтину, свідчить про те, що MDA, що залишився, виявлений за допомогою ІФА, не заважав проведенню контрольного зараження. Фактично, коли рівні PRRSV-специфічних нейтралізуючих антитіл були визначені у даних

свиней з використанням SNT, негативні результати були виявлені у всіх свиней T01 перед контрольним зараженням (день 52). У групі, вакцинованої IVP в.м. способом, у 9/16 свиней спостерігалось збільшення рівнів антитіл, визначених з використанням ІФА, з дня вакцинації до 67 днів після вакцинації, і всі вони були серопозитивними перед контрольним зараженням (середнє значення співвідношення S/P: 1,803), що вказує на розвиток антитільної відповіді після в.м. вакцинації навіть на фоні MDA. Навпаки, лише у 2/19 свиней, вакцинованих IVP і.н. способом було збільшення антитіл до PRRS від вакцинації до контрольного зараження, і лише 32 % було серопозитивні на D67 (середнє значення співвідношення S/P: 0,328), яке свідчить про те, що жодної гуморальної імунної відповіді не було індуковано у інших 17 свиней через нейтралізацію вакцини MDA. Після контрольного зараження (D77), всі свині, незалежно від групи лікування, були серопозитивними і жодних значних розбіжностей у титрах ІФА не було виявлено між групами.

У посібнику EMA/CVMP/WP/439467/2007 "Reflection paper on the demonstration of a possible impact of maternally derived antibodies on vaccine efficacy in young animals" говориться, що ефективність вакцини у тварин, вакцинованих в присутності MDA, повинна бути такою: не дивлячись на нормальну біологічну мінливість, подібну тій, яка отримана у тварин такого ж віку, але вакцинованих у відсутність MDA. На основі цих специфікацій ефективність, що спостерігається в даному дослідженні, повинна бути аналогічною ефективності, отриманої у попередньому дослідженні (C/394/13), в якому ООІ оцінювали у серонегативних тварин, вакцинованих в 1-денному віці і.н. та в.м. способами.

Коли MLV EU PRRS вводили в.м. способом, ефективність могла бути продемонстрована незалежно від серологічного статусу свиней, так як в обох дослідженнях спостерігалось значне зниження вірусемії (первинної змінної). Захисний ефект в.м. вакцинації також був продемонстрований для назального виділення та ректальної температури в обох випадках. Крім того, після в.м. вакцинації свиней MDA+, виділення з ротової порожнини також було в значній мірі знижено, і розбіжності у % легень з ураженнями були близькі до значних. В цілому, ці дані ясно демонструють відсутність впливу MDA на ефективність вакцини, коли вакцина вводиться поросятam 1-денного віку внутрішньом'язово.

Коли MLV EU PRRS вводили і.н. способом, ефективність могла бути продемонстрована лише у відсутності MDA, про що свідчить значне зниження вірусемії та назального виділення, що спостерігається у серонегативних тварин. У свиней з MDA+ і.н. вакцинація не індукувала захисту, про що свідчить відсутність значних розбіжностей ні за будь-яким одним з оцінюваних параметрів.

Таким чином, вакцинація одноразовим введенням вакцини MLV EU PRRSV, що містить дозу $2,5 \log_{10}$ CCID₅₀ серопозитивним свиням 1-денного віку в.м. способом захищала від PRRSV, про що свідчить значне зниження вірусного навантаження, виявленого у сироватці крові після контрольного зараження патогенним штамом EU PRRS через 67 днів (9,6 тижнів) після вакцинації. Ефективність також підтверджувалась значним зниженням назальних виділень та виділень з порожнини рота, а також ректальних температур після контрольного зараження. Крім того, розбіжності в середньому значенні відсотка уражень легень були близькі до значущості ($p = 0,09$). Вакцинація одноразовим введенням вакцини MLV EU PRRSV вакцина, що містить дозу $2,5 \log_{10}$ CCID₅₀ серопозитивним свиням 1-денного віку і.н. способом не захищала від PRRSV під час контрольного зараження. Результати представленого дослідження демонструють відсутність інтерференції материнських антитіл з ефективністю вакцини, коли вакцина вводиться внутрішньом'язово в 1-денному віці. Коли вакцина вводиться і.н. способом, більшості свиней (17/19) не вдається виробити імунну відповідь після вакцинації, яка вимірювалась методом ІФА. Це вказує на нейтралізацію вакцини MDA, що може поставити під загрозу ефективність вакцини на рівні стада.

Приклад 6- Поширення, розподілення та безпека введення одної дози, повторної дози та передозування модифікованою живою вакциною EU PRRSV 96V198 слона 1 MSV+3 свиням 1-денного віку

Мета даного дослідження полягала в тому, щоб оцінити безпечність повторної дози та передозування, а також розповсюдження, розподілення та безпечність однієї дози модифікованої живої вакцини проти PRRSV 96 к198 клону 1, що вводиться свиням 1-денного віку в.м. та і.н. способом. Дослідження проводилось з використанням MSV+3, який є найменш атенуйованим рівнем пасажу (дивіться сторінку 8, MSV+5 являє собою стандартний пасаж 49), який присутній у партії вакцини.

Відповідно до діючого європейського законодавства, для отримання дозволу на продаж необхідно продемонструвати безпечність вакцини. В цьому випадку протокол був розроблений з урахуванням Європейської фармакопеї; директиви 2009/9/ЄС та керівних принципів VICH

GL44 для того, щоб продемонструвати безпечність однієї дози, повторної дози та передозування під час і.н. та в.м. способу введення для поросят одногоденного віку - запропоновані способи та категорія тварин, для яких призначена вакцина.

Безпечність оцінювали відповідно до рекомендацій Європейської Фармакопеї для вакцин ветеринарного застосування, тобто для оцінки ректальної температури, а також місцевих та загальних реакцій, щонайменше, до 14 днів після інокуляції. Розподілення вакцинного штаму оцінювали від вакцинованих (одна доза) до не вакцинованих індикаторних свиней; виділення (носовий слиз, рідини ротової порожнини та фекалії) та розповсюдження в тканинах у вакцинованих тварин (одна доза) також були досліджені.

Дослідження проводилось відповідно до правил Належної лабораторної практики (GLP), відповідно до відповідних керівних принципів OCDE та відповідно до вимог Європейської фармакопеї 7.7 04/2013:50206 (Оцінка безпечності ветеринарних вакцин та імуноферментів).

Досліджуваний продукт являє собою MLV EU PRRS (клон 1 96V198), найменший атенуйований рівень пасажу (MSV+3), під час максимального титру вивільнення 105,2 TCID₅₀/2 мл при дозі 2 л і.н. або в.м., причому нижній пасаж (менш атенуйований) був вибраний як краща міра безпечності. Для досліджуваної системи протокол був розроблений з урахуванням Європейської Фармакопеї; директиви 2009/9/ЄС та керівних принципів VICH GL44 для того, щоб продемонструвати безпечність застосування однієї дози, повторної дози та передозування під час і.н. та в.м. способу введення для поросят 1-денного віку – запропонованої категорії тварин, для яких призначена вакцина.

Достатня кількість свиноматок (n=11) була використана для отримання поросят, необхідних для проведення дослідження (щонайменше, n=80). Застосовуваний дизайн, що дозволяє належним чином описати безпечність, розповсюдження та розподілення вакцини для обох способів введення, в.м. та і.н. Свиноматки прибули на експериментальну ферму з ферми негативної за PRRSV (Додаток I). Свиноматки були розташовані у 11 ізольованих ящиках у приміщеннях. На експериментальній фермі у свиноматок брали перед опоросом та знову аналізували на наявність PRRSV-специфічних антитіл з використанням комерційного ІФА (PRRS X3 Ab Test: Ref. 99-4095, IDEXX Laboratories;) (Додаток I). Як профілактичне лікування свиноматкам робили внутрішньом'язове введення цефтиофура натрію (13 мл / свиноматку).

Опорос свиноматок синхронізували, введенням 1 мл в.м. D-клопростенолу (Galapan, INVESA;) (додаток XVI) приблизно через 111-113 днів після осіменіння (з синхронізацією опоросів). Поросята народилися протягом наступних 40 годин (9 та 10 квітня). Початок вакцинації було зроблене 10-го; на цю дату вік всіх поросят становив приблизно ≤ 24 год. (1-денний вік).

Пережесне виховання проводили протягом першого дня після опоросу (перед вакцинацією) для того, щоб збалансувати потомство та гомогенізувати потомство. В кінці кінців, було використано десять свиноматок із загальною кількістю поросят в кожній групі, яка дорівнює або перевищує мінімальний розмір вибірки, для проведення досліджень безпечності, встановлених у Європейській фармакопеї. Загальна кількість: 80 поросят; 40 поросят для кожного способу введення: і.н. та в.м. (28 вакцинованих експериментальним продуктом - доза, повторна доза та передозування, 8 тварин – як контроль та 4 тварини – як індикатори).

Тридцять зайвих поросят також були розподілені по всім групам від T01 до T12 як резерв, які повинні бути включені у дослідження, лише якщо якась група не досягла мінімальної необхідної кількості поросят через мертвих поросят або виключення (Додаток II та Додаток XIV; Поправка № 2); необроблені дані цих поросят були записані у додаткові записні книжки з необробленими даними, позначені знаком (S) (записні книжки з номерами від 13 до 24). В кінці кінців було використано десять свиноматок, і у кожної з них було по 11 поросят.

Експериментальна гіпотеза

Дане дослідження було розроблене для того, щоб продемонструвати безпечність вакцини MLV EU PRRS у свиней 1-денного віку (клон 1 96V198) у експериментальних умовах шляхом порівняння з контрольною групою, інокульованою розріджувачем вакцини (негативні контролю) для всіх параметрів, описаних нижче, але температуру аналізували з урахуванням основної температури кожного поросяти перед вакцинацією як контрольне значення. Вакцина вважалася безпечною, якщо не було відмічено серйозних місцевих або системних реакцій по причинам, зв'язаним з вакциною, та середнє підвищення температури для всіх свиней у вакцинованій групі не перевищувало 1,5 °C в порівнянні із середньою основною температурою до вакцинації, та жодний з поросят в експериментальній групі не показав підвищення температури більше ніж на 2 °C в порівнянні із основною температурою у кожного поросяти перед вакцинацією. Оцінювали розповсюдження та розподілення вакцинного штаму, досліджуючи наявність вакцинного штаму у індикаторних свиней. Розповсюдження у вакцинованих тварин оцінювали, досліджуючи

кількість вірусу у зразках крові, з носу, з ротової порожнини та ректальних зразках та у тканинах. Ректальні температури - Інтраназальний та внутрішньом'язовий способи введення.

Що стосується температури, може бути зроблений висновок, що вакцина безпечна у всіх оцінених протоколах (спосіб введення, титр та кількість доз), тому що отримані результати відповідають рекомендаціям Європейської фармакопеї для вакцин ветеринарного застосування.

Місцеві реакції

Інтраназальний спосіб введення. Місцеві реакції не спостерігалися.

Внутрішньом'язовий спосіб введення.

Під час розтину лише два поросяти у T12 (максимальний титр під час в.м. способу введення) мали макроскопічні слабкі ураження. Мікроскопічні, ураження спостерігалися лише у чотирьох свиней з групи T10; ураження характеризувалися дуже слабкою осередковою або багатоосередковою присутністю мононуклеарних інфільтратів запальних клітин.

Системні реакції та побічні ефекти

Інтраназальний спосіб введення: Відсутність системних реакцій та клінічних ознак, зв'язаних з вакцинацією, вказують на те, що вакцина безпечна.

Внутрішньом'язовий спосіб введення.

Несприятливі події після введення вакцини спостерігалися лише у 2 з 8 поросят, що належать до групи, яка отримала найвищий титр (максимальний титр вивільнення $\times 10$) під час в.м. способі введення (група T12). Дані події зникли до 4 годин, і поросята повністю одужали. Що стосується щоденної клінічної оцінки, випадки кульгавості не можуть розглядатись як явища, зв'язані з введенням вакцини; кульгавість спостерігалась також у поросят контрольної групи. Причина, яка лежить за межами єдиної смерті, що спостерігається під час дослідження, була викликана роздавлюванням; отже, слід враховувати, що ця смерть не була пов'язана з введенням вакцини. Таким чином, вакцинний штам 96V198 CLONE 1 під час в.м. способу введення слід вважати повністю безпечним, за винятком несприятливих подій, описаних для найвищого титру ($\times 10$).

Маса тіла

Інтраназальний спосіб введення.

Під час порівняння засобів збільшення ваги T07 показував більш низькі значення, ніж відповідний контроль (T02) ($p < 0,05$) з 0 до 14 дня. Однак, ця розбіжність зникла під час порівняння збільшення ваги з 14 до 28 дня і, особливо, коли всі дослідження - з 0 до 28 дня - були прийняті до уваги. Отже, збільшення ваги поросят, вакцинованих інтраназальним способом введення, не залежало від отриманої дози.

Внутрішньом'язовий спосіб введення.

Таким же чином, T11 показав більш низькі значення, ніж відповідний контроль (T04) ($p < 0,05$) з 0 до 14 дня. Ця відмінність зникла, коли аналізувався період з 14 до 28, але вона знову з'явилася, у всіх дослідженнях - з 0 дня до 28 дня. Дані розбіжності можуть пояснити тим, що збільшення маси тіла у трьох поросят з T11 було найменшим, включаючи всіх розкритих поросят на 28-ий день, незалежно від продукту, титру або способу введення (це означає T02, T04, T07 та T11). Всі індивідуальні збільшення у вазі з 0 до 28 дня дорівнювали або перевищували 5,5 кг, за винятком трьох вищезгаданих поросят (збільшення у вазі 4,08, 2,89 та 3,05 кг для поросят №199, 202 та 205, відповідно). Цікаво, що ці поросята страждали кульгавістю протягом найдовшого періоду. На закінчення, неможна відрізнити, якщо розбіжності, що спостерігаються між збільшенням у вазі T04 та T11, були викликані подіями кульгавості або вакцинацією.

Розповсюдження

Інтраназальний та внутрішньом'язовий способи введення. Розповсюдження вірусу було продемонстровано присутністю вакцинного штаму майже у всіх тканинах, оцінених у вакцинованих тварин, незалежно від використовуваного способу введення. Присутність штаму 96V198 клону 1 в титрах, які можуть вважатися високими у легенях, мигдаликах та трахеобронхіальних лімфатичних вузлах, а також в селезінці та брижових лімфатичних вузлах, свідчать про повне органічне розповсюдження вакцинного штаму.

Розподілення

Інтраназальний та внутрішньом'язовий способи введення. Хоча виявлення вакцинного штаму в ротовій рідині та ректальних мазках було непостійним у вакцинованих поросят, воно було постійним та високим у назальних мазках; розподілення частоти виявлення вакцинних штамів з часом зменшувалось. Дані результати разом з виявленням вакцинного штаму у зразках крові від усіх індикаторних свиней, демонструють, що 96V198 клон 1 активно та безперервно виділяється після вакцинації. Крім того, наявність вакцинного штаму у тканинах та

зразках крові від індикаторних поросят вказувало на те, що вірус, що розповсюджується від вакцинованих поросят, був активним; він міг інфікувати індикаторних тварин та міг розмножуватися в них; і навіть одна в.м. індикаторна свиня з T09 мала ураження легень, відповідні PRRS плюс позитивний результат для ІНС. На завершення слід відмітити, що вищезгадані результати показують, що 96V198 клон 1 може послідовно передаватися від вакцинованих до невакцинованих поросят, щонайменше, в ранній період після вакцинації.

Ураження легень

Інтраназальний та внутрішньом'язовий способи введення. Всі дев'ять свиней з макро- та мікроскопічними ураженнями, відповідні PRRS (інтерстиціальна пневмонія), плюс позитивний результат для ІНС PRRSV, були з в.м. груп. Таким чином, може бути зроблений висновок, що і.н. спосіб введення був безпечним, тоді як в.м. спосіб введення міг індукувати ураження легень, відповідні PRRSV, щонайменше, у однієї свині в кожній групі (з T09 до T12).

Приклад 7. - Безпечність повторного введення одноразової дози модифікованої живої вакцини PRRSV EU під час введення вагітним свиноматкам серопозитивним на PRRSV.

Представлене дослідження було розроблене для того, щоб продемонструвати безпечність введення повторної одноразової дози MLV EU PRRS серопозитивним свиноматкам у другій половині вагітності (87 днів вагітності). Жодних системних реакцій після вакцинації не спостерігалось після першого або другого введення. Крім того, жодних клінічних спостережень не було зареєстровано у жодної з свиноматок протягом всього періоду спостереження.

Що стосується ректальних температур, у жодної з свиноматок не було зареєстровано лихоманки в будь-який момент після вакцинації ($RT \geq 40,1^\circ C$). Крім того, середнє значення ректальної температури після вакцинації не перевищувало середнє значення ректальної температури перед вакцинацією плюс $1,5^\circ C$, та у жодної з свиноматок не спостерігалось перевищення власної ректальної температури до вакцинації плюс $2^\circ C$.

Місцеві реакції в місці ін'єкції спостерігалися у 63 % та 50 % свиноматок, вакцинованих досліджуванним елементом під час 1-го та 2-го введення, відповідно. Реакції складалися з відчутного та/або видимого набряку (від 0,4 до 2,8 см в діаметрі), який зникав між 1 та 6 днями. У жодної з свиноматок не спостерігалось почервоніння, збільшення місцевого тепла або болю у місці ін'єкції після будь-якого введення.

Що стосується репродуктивної функції, жодних абортів, або передчасних опоросів зареєстровано не було. Крім того, не спостерігалось явного впливу вакцинації на число мертвороджених, муміфікованих, низько життєздатних поросят та на смертність перед відлученням від матері. Вакцинація не викликала трансплацентарну інфекцію, про що свідчать негативні результати ЗТ-кПЛР, виявлені у зразках сироватки крові, зібраних під час народження та під час відлучення поросят від матері. На завершення, повторне введення вакцини є безпечним для серопозитивних свиноматок у другій половині вагітності.

Скорочення, що використані в даному документі, включають: BHK-21, клон 21 нирки новонародженого хом'яка; BRP, протокол випуску серії; CCID50; 50 % інфекційна доза клітинної культури; CP, контрольний продукт; D, день; DRAC, щоденний огляд з догляду за тваринами; ID, ідентифікація; GLP, належні лабораторні практики; IF, імунофлуоресценція; в.в., внутрішньовенно; MLV, модифікована жива вакцина; MSV, вихідний вакцинний вірус; NA, не застосовували; P, Пасаж; PBS, фосфатний буферний сольовий розчин; PI, після інокуляції; PRRSV, вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней; RT, ректальні температури; ЗТ-кПЛР, кількісна зворотно-транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція; SOP, стандартна операційна процедура; S/P, зразок до позитивного; TBD, належить визначенню; TI, досліджуваний препарат, та VICH, ветеринарна міжнародна рада з гармонізації.

Мета дослідження та обґрунтування

Модифікована жива вакцина (MLV) EU PRRSV призначена для активної імунізації молодих свиней та свиноматок у середовищі, зараженому PRRS, для зниження вірусемії, трансплацентарної інфекції та абортів, викликаних зараженням європейськими штамми вірусу PRRS. Відповідно до діючого законодавства, для отримання дозволу на продаж є необхідним продемонструвати безпечність вакцини. Дане дослідження було розроблене відповідно до Європейської фармакопеї 7.7:04/2013/50206 - Оцінка безпечності ветеринарних вакцин та імуноферментів та VICH GL44 - Цільова безпечність тварин стосовно ветеринарних живих та інактивованих вакцин - посібник. Метою даного дослідження є оцінка безпечності повторного введення (1x+1x) MLV EU PRRS серопозитивним свиноматкам у другій половині вагітності. Досліджуваний матеріал являв собою $6,6 \log_{10}$ CCID₅₀/флакон EU PRRSV, штам 96v198c1, (MSV+3), з дозою $5,2 \log_{10}$ CCID₅₀ в 2 мл/ внутрішньом'язово за ЗТ-кПЛР.

Вірусемія (навантаження PRRSV у сироватці) вимірювалась за допомогою кПЛР з зворотною транскрипцією (ЗТ), яку виконували відповідно до стандартних процедур. Коротко,

очищену вірусну РНК використовували як матрицю, транскрибували зворотно при 50 °C протягом 30 хвилин та денатурували при 95 °C протягом 5 хвилин. Програма ПЛР реакцій складалася з 40 циклів денатурації при 95 °C протягом 20 секунд та ренатурації при 53 °C протягом 40 секунд. ЗТ-кПЛР проводили у системному термоблоці ПЛР в реальному часі 7500.

5 Послідовності праймерів та зонду є наступними (SEQ ID NOS 6-8, послідовно):

Прямий праймер (Лелістад F): 5'-GCACCACCTCACCCAGAC-3' (Кінцева концентрація 0,5 мкМ).

Зворотний праймер (Лелістад R): 5'-CAGTTCCTGCGCCTTGAT-3' (Кінцева концентрація 0,5 мкМ).

10 Зонд (Лелістад S): 5'-6-FAM-CCTCTGCTTGCAATCGATCCAGAC –TAMRA-3" (Кінцева концентрація 0,6 мкМ).

Серологія

Зібрану сироватку свиней перед вакцинацією досліджували на антитіла до PRRSV з використанням ІФА IDEXX PRRS X3, дотримуючись інструкцій виробника. Коротко, зразки сироватки розбавляли 1:40 у 96-лунковому планшеті, покритому рекомбінантним антигеном PRRSV, та інкубували 30 хвилин при 18-26 °C. Після промивання додавали кон'югат анти-свинячий пероксидази хрину та планшети інкубували протягом ще 30 хвилин при 18-26 °C. Незв'язаний кон'югат вимивали, та у лунки додавали субстрат ТМБ. Розвиток кольору вимірювали при 650 нм. Значення S/P реєструвалися для кожного зразка. Якщо співвідношення S/P було $\geq 0,4$, зразок був класифікований як позитивний на антитіла до PRRS. Якщо співвідношення S/P було $< 0,4$, зразок був класифікований як негативний. Інструкції ELISA були включені до файлу дослідження.

Клінічні спостереження

25 Жодних аномальних клінічних спостережень за будь-якою свиноматкою у період після вакцинації зареєстровано не було (з D0 до D28).

Ректальні температури

Для того, щоб дослідити ректальні температури, були дотримані два критерії:

а) Середнє значення ректальної температури після вакцинації для всієї групи не повинно перевищувати середнє значення ректальної температури перед вакцинацією плюс 1,5 °C.

30 1-а вак.: Середнє значення ректальної температури після вакцинації (у або D0+4год, D1, D2, D3 або D4) $\leq$ [Середнє значення ректальної температури перед вакцинацією (Середнє значення D-1/D0)] + 1,5 °C.

2-а вак.: Середнє значення ректальної температури після вакцинації (у або D14+4год, D15, D16, D17, або D18) $\leq$ [Середнє значення ректальної температури перед вакцинацією (Середнє значення D13/D14)] + 1,5 °C.

35 б) Індивідуальна ректальна температура кожної свиноматки після вакцинації не повинна перевищувати ректальну температуру перед вакцинацією (Pre-vac) плюс 2°C.

1-а вак.: Індивідуальна ректальна температура після вакцинації (у або D0+4год, D1, D2, D3 або D4) $\leq$ [Індивідуальна ректальна температура перед вакцинацією (Індивідуальне середнє значення D-1/D0)] + 2,0 °C

2-а вак.: Індивідуальна ректальна температура після вакцинації (у або D14+4год, D15, D16, D17 або D18) $\leq$ [Індивідуальна ректальна температура перед вакцинацією (Індивідуальне середнє значення D13/D14)] + 2,0 °C

45 В обох групах T01 та T02 середнє значення RT після вакцинації не перевищувало середнього значення перед вакцинацією плюс 1,5 °C. Крім того, RT після вакцинації кожної свиноматки не перевищувала таку ж ректальну температуру свиноматки перед вакцинацією плюс 2 °C у будь-якої зі свиноматок з груп T01 або T02. Після першого введення максимальне збільшення RT становило 0,81 °C (день 2) у T01 та 0,76 °C (день 0+4 год.) в групі T02. Після другого введення максимальне збільшення спостерігалось на день 17 як у групі T01 (0,81 °C), так і групі T02 (0,47 °C). У жодної зі свиноматок з групи T01 або T02 не спостерігалось підвищеної ректальної температури ($\geq 40,1$ °C) у будь-який момент часу після вакцинації.

Системні реакції після вакцинації

Жодної системної реакції після вакцинації не спостерігалось у жодної зі свиноматок з групи T01 або T02.

55 Місцеві реакції у місці ін'єкції

Перед вакцинацією всіх свиноматок оглядали на наявність місцевих реакцій в області шиї, викликаних попередніми щепленнями, які могли завадити оцінці місцевих реакцій у місці ін'єкції. Три свиноматки, дві з групи T01 (1802 та 2259) та одна з T02 (1663), показали старі реакції у правому боці шиї через попередні щеплення. Однак всі ці реакції були розташовані нижче та були віддалені від відповідної точки інюкації. Коли лівий бік шиї був оглянутий перед другою

вакцинацією, старі реакції також спостерігалися у чотирьох свиноматок, двох з групи T01 (316 та 1802) та двох з групи T02 (2547 та 2842). Як відмічено для правого боку шиї, дані реакції були розташовані нижче точки інокуляції. У всіх випадках (як для правого, так і для лівого боку шиї) старі реакції не вважалися такими, що потенційно заважають оцінці місцевих реакцій після вакцинації. У жодної зі свиноматок, вакцинованих CP (група T01), не проявилось локальної реакції у місці ін'єкції у будь-який момент часу після вакцинації. Місцеві реакції, що спостерігаються після вакцинації у групі T02, підсумовані у 17.

Після першої вакцинації 63 % свиноматок T02 (5/8) мали видимий та/або відчутний набряк у місці ін'єкції у правому боці шиї. Максимальний набряк, що спостерігається був реакцію діаметром 2,8 см (відповідає 3 балам), яка тривала 6 днів. У жодної зі свиноматок не спостерігалось почервоніння, посилення місцевого жару або болю у місці ін'єкції.

Після другої вакцинації у 50 % свиней T02 спостерігався видимий та/або відчутний набряк (лівий бік шиї) (4/8). Всі реакції, що спостерігалися були оцінені як 1 або 2 (максимум 1 см у діаметрі) та продовжувались максимум 5 днів. Як відмічалось після 1-ої вакцинації, у жодної зі свиноматок не спостерігалось почервоніння, посилення місцевого жару або болю у місці введення.

Таблиця 18

Підсумовування результатів місцевих реакцій у групі T02

Бік шиї	Видиме почервоніння	Видимий набряк	Діапазон оцінки набряку	Часовий діапазон (дні)	Пальпований набряк	Больова реакція	Підвищення температури
Правий	0/8 (0 %)	4/8 (50 %)	1-3	1-6	3/8 (38 %)	0/8 (0 %)	0/8 (0 %)
Лівий	0/8 (0 %)	4/8 (50 %)	1-2	1-5	4/8 (50 %)	0/8 (0 %)	0/8 (0 %)

Посмертне обстеження місць ін'єкцій

Під час макроскопічного дослідження було помічено, що у декількох свиноматок з обох груп були ураження м'язів шиї, які в основному складаються з більшості вузлів казеозного матеріалу, які були розподілені по всій області шиї. Дані ушкодження були приписані старим ін'єкціям, тому що вони не були виявлені у точці ін'єкції.

Під час огляду точок інокуляції свиноматок T02 у 1/8 спостерігалась видима реакція у правому боці шиї та 3/8 на лівому боці шиї. В групі T01 у однієї свиноматки (1/7) також була видима реакція у першій точці інокуляції (правий бік шиї). Всі реакції були описані як наявність блідих м'язових волокон, у більшості випадків, чітко спостерігаючих за траєкторією голки та які не піддаються вимірюванню. Крім того, у двох свиноматок T02 спостерігалися численні вузлики (ліва точка інокуляції).

Репродуктивна здатність

В жодній з груп лікування не було зареєстровано жодних абортів або передчасних опоросів. Тривалість вагітності знаходилась в діапазоні від 114 до 117 днів в групі T01 та від 114 до 119 днів в групі T02. Поросята, народжені здоровими у кожній свиноматки, були ідентифікованими з використанням ушних бирок та утримувались у

В представленому дослідженні, безпечність повторного введення одноразової дози MLV EU PRRS оцінювалась у другій половині вагітності (87 днів вагітності) у серопозитивних свиноматок. Параметри безпечності включали системні реакції на вакцинацію, ректальну температуру після вакцинації, клінічні спостереження, місцеві реакції в місці ін'єкції, репродуктивну здатність та посмертне обстеження місць ін'єкції.

Жодних системних реакцій після вакцинації не спостерігалось після першого або другого введення. Крім того, жодних загальних клінічних спостережень не було зареєстровано у жодної зі свиноматок протягом всього дослідження.

Що стосується ректальних температур, у жодної зі свиноматок не було лихоманки у будь-який момент після вакцинації ($RT \geq 40,1^{\circ}C$). Крім того, середнє значення ректальної температури після вакцинації не перевищувало середнє значення ректальної температури перед вакцинацією плюс $1,5^{\circ}C$, та у жодної зі свиноматок не перевищувалась власна ректальна температура перед вакцинацією плюс $2^{\circ}C$.

Місцеві реакції у місці ін'єкції спостерігалися у 63 % та 50 % свиноматок з групи T02 під час 1-ої та 2-ої вакцинації, відповідно. Після 1-ої вакцинації спостерігався максимальний набряк діаметром 2,8 см, який тривав не більше 6 днів. Після другої вакцинації максимальний набряк складав 1 см в діаметрі, а максимальна тривалість складала 5 днів. У жодної свиноматки не

спостерігалось почервоніння, підвищення локальної температури або болю у місці ін'єкції після будь-якого введення.

Під час посмертного огляду видима реакція у місці інокуляції спостерігалась лише у 3/8 вакцинованих свиноматок. Дві з них (15 та 1663) відповідали тим, у яких найвищий бал набряку (2 та 3, відповідно), даний під час оцінки місцевих реакцій; макроскопічні, ураження були описані як бліді м'язові волокна після траєкторії голки, які були діагностовані як помірний гранулематозний міозит із залученням м'язових волокон. У випадку свиноматки 15 всередині ураження спостерігалися краплі вакцини, підтверджуючи той факт, що це пошкодження було викликане в результаті введення досліджуваного продукту. Для другої свиноматки T02 (2547), яка показала видиму реакцію, ураження також описувалось як бліді м'язові волокна, наступні траєкторії голки, але у цьому випадку також з численними вузлами, які містять казеозний матеріал. Під час гістопатологічного аналізу дані ураження були діагностовані як важкий гранулематозний міозит з наявністю осередкового, але поширеного некрозу. Оскільки наявність численних вузликів у області шиї, але не конкретно у точці інокуляції, спостерігалось також у 8/8 T02 та 5/7 свиноматок T01, можливо, що ураження, яке спостерігається у свиноматок 2547, було викликане попередніми ін'єкціями, а не досліджуваним продуктом. Це підтверджується тим фактом, що під час оцінки локальних реакцій *in vivo* у цієї свиноматки був набряк діаметром менше 0,5 см, який продовжувався 5 днів.

PRRSV-асоційовані репродуктивні розлади характеризуються підвищенням числом опоросів, пізніх абортів, мертвонароджених або мало життєздатних поросят та муміфікованих плодів. У представленому дослідженні, не було зареєстровано жодного аборту або передчасних опоросів. Крім того, не спостерігалось явного впливу вакцинації на кількість мертвонароджених, муміфікованих або мало життєздатних поросят. Інфекція PRRSV може також збільшити смертність перед відлученням від матері. У представленому дослідженні, середнє значення % смертності поросят перед відлученням від матері становило 6,0 та 5,3 у групах T01 та T02, відповідно, що вказує на відсутність впливу вакцинації на виживання поросят.

Нарешті, всі зразки сироватки, отриманні під час народження або під час відлучення від матері, у поросят, народжених від свиноматок, як групи T01, так і T02, були негативними до PRRSV за 3Т-кПЛР, що вказує на відсутність трансплацентарної інфекції після вакцинації.

Таким чином, введення повторної одноразової дози MLV EU PRRSV PRRSV-серопозитивним свиноматкам на 87 день вагітності: не викликало патологічних системних реакцій (анафілактичний шок, блювання); не викликало будь-яких клінічних спостережень протягом 14 днів після вакцинації не викликало аномальних ректальних температур після вакцинації; викликало локальні реакції у місці ін'єкції у 63 % та 50 % свиноматок після 1-ої та 2-ої вакцинації, відповідно, причому такі реакції склалися з пальпованого та/або видимого набряку (від 0,4 до 2,8 см у діаметрі), який зник протягом від 1 до 6 днів; не впливало на репродуктивні параметри; і не викликало трансплацентарну інфекцію.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

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

<120> ЕФЕКТИВНА ВАКЦІНАЦІЯ ПРОТИ ЄВРОПЕЙСЬКИХ ШТАМІВ ВІРУСУ РЕПРОДУКТИВНОГО
РЕСПІРАТОРНОГО
СИНДРОМУ (PRRS) ДО ВІДЛУЧЕННЯ ВІД МАТЕРІ

<130> ZP000148A PCT

<150> 62/434,144
<151> 2016-12-14

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 15092
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ізолят 96V198 вірусу PRRS - пасаж 0

<400> 1
atgatgtgta ggggtattccc cctacataca cgacacrtct agtgtttgtg tgccttggag 60
gcgtgggtac agccccgccc caccctcttg ccctgttctt agcccaacag gtatccttct 120
ctctcggggc gagcgcgccg cctgtctctc ccttgcagca ggaaggacct cccgagtatt 180
tcgggagagc acctgcttta cgggacrtcc acctttaac catgtctggg acgttctccc 240
gggtcatgtg cccccgggt gcccggtat ttggaaagc cggccaagtc ttttgcacac 300
gggtctctag tgcgcggtct ctctctctc cggagcttca ggacactgac ctgcttgcaa 360
ttggcttgtt ttacaagcct aaagacaagc ttacttgaa agtccctatc ggcattcttc 420
agggtggagt tactccgtcc ggggtgtgtt ggctctcagc catcttccc ttggcgcgca 480
tgacctccgg caatcacaac ttcttcaac gactgtgaa ggttgcrgat gttttgtacc 540
gtgacggctg cttggcacct cgacaccttc gcgaactcca agtttacgag cgcggctgca 600
actgggtacc gatacgggg ccggtgccc ggatgggttt gtacgcgaac tccatgcacg 660
tgtccgacca accgtttcct ggtgccactc atgtgttaac gaactcacct ctgcctcagc 720
aggcttgtcg acagcgttt ttgtccattt aggaggttca ttccgacgta tacagggtga 780
agaaattcgt gatttttgtg gatttctctt ctgacggccg atctcgcatg atgtggacac 840
caggatccga cgactcggct gccttagaag tattgccacc tgaactagaa tgtcgagtcg 900
aaatctcgt tcggagtatt cctgcccacc acctgtctga catcaccac tgggagctca 960
ctgagtcctc tgagcacggg ttctcttca gcacgtctca ttcttgttgt taacttgccc 1020
aaaacctga cgtgtttgat ggtaagtgtt ggctttcttg ctttttgggc ctgccgaccg 1080
aagtgtggcg tcatgaggag tatctagcta acgccttcgg ttaccacacc aagtggggcg 1140

Сторінка 1

tgcattggttaa	gtacctccag	cgcaggcttc	aggteccg	catgcgtgct	gtagttgac	1200
ctgatggtec	catccacgtt	gaagcgctgt	cttgcctcca	gtcttgatc	aggcacctga	1260
ctctaaatga	tgacgtcacc	ccaggatttg	ttcgctaac	atcccttcgc	attgagccga	1320
acacagagcc	tactactttc	cggatctttc	ggtttgagc	gcataagtgg	tatggcgctg	1380
ccggcaaacg	ggctcggtgt	aagcggtccg	ctaaagggtga	gaagaattca	gctcccaacc	1440
ccaaggctgc	cttgcgggtc	cccacctgtg	gaattaccac	ctactctcca	ccgacagacg	1500
ggctctgtgg	ttggcatgtc	cttgcgcgca	taatgaaccg	gatgataaat	ggtagattca	1560
cgtccctctc	gactccgtac	aacagaccag	aggatgattg	ggctctgat	tatgatcttg	1620
ctcaggcaat	ccaatgtcta	caactgcctg	ctaccgtggg	ccggagtcgc	gctctgctta	1680
acgccaagta	ctcctataaa	ctcaacggag	tccactggga	ggtagagggtg	aggtcaggaa	1740
tggctcctcg	ctctctttct	cgtgaatgtg	tgggtggcgt	tgcctctgaa	ggttgtgttg	1800
cactgctcta	tcacgcagac	gggtctaccg	aacgagcact	cgaggccttg	gcgtctgctt	1860
acagggtacc	ctctgattgt	gtagctctg	gcattgctga	cittcttgct	aaccaccttc	1920
ctcaggcaat	ctggaccctc	gacaaaatgt	tgacctcccc	gtcaccagag	cggtcgggct	1980
tctctagttt	gtataaatta	ctattagagg	ttgttccgca	aaaatgcggg	gccacgggaag	2040
gggtcttcgt	ctatgctgtt	gagagaatgt	tgaaggattg	tccgagctcc	aaacaggcca	2100
tggccctctc	ggcaaaaatt	aaagttrcat	cctcaaaggc	cccgtctgtg	tcccttgacg	2160
agtgtttccc	tacggatgtt	tcagccgact	tcgagccagc	atctcaggaa	aggccccaaa	2220
gttccgggtg	tgctgttgtc	ctgtgttcac	cgggaagtaa	agagtctgaa	gaagcagccc	2280
cagaagaagt	tcaagagagt	ggccacaagg	tcgcccgtc	tgcatattgt	gccgagggct	2340
ctaacaatga	acagggtacc	atggctgccc	gcgagcaact	gaagcccggt	ggtcgcgttt	2400
tggcggtcgg	gaatgctcat	gaagggtgtc	tggccctaac	tagtccgact	aactctgatg	2460
gctgggaactt	cccccttca	gactccatga	aagagagcat	gctcaatagc	tgggaagacg	2520
aaccactgga	tttgtcccaa	ccggcaccag	ctgttacaat	gacctttgtg	agagagcaaa	2580
cacccgacaa	cctgggtccct	gatgcccgtg	cttcccccgt	caaccgttga	aaatttgctc	2640
cgacagggcc	tacactccgt	cargtrgagc	actgcggcac	ggagtraggc	gacagcagtt	2700
cgcctctgga	tctgtcttat	ggcgaaccc	tggaccagcc	tttaaatcta	tccttggtcg	2760
cttggccagt	gagggccacc	gcgtctgacc	ctggctgggt	ccacggtagg	tcgagacctta	2820
tctttgtaaa	gcctcgagat	gctttctctg	acggcgattc	agcccttcag	ttcggggagc	2880
tgtctgaatc	cggctctgtc	atcgagtttg	accggacaag	aaatgctccg	gcggctcgacg	2940
cctctgttga	cttgacgggt	tcgaacgagg	ccctctctgt	ggttgatcct	ttcgaatttg	3000
ccgaactcaa	gcgcccgcgt	ttttccgcac	aagccttaat	tgaccgaggc	ggtccacttg	3060
ccgacgtcca	tgcaaaaata	aagaaccggg	tatatgaaca	gtgctccag	gcttgtagac	3120
ctggcagtcg	cgcaacccca	gccaccaagg	agtggctcga	taaaatgtgg	gatagggtgg	3180
acatgaagac	tgggcgtgtg	accctgcagt	tccaagctgg	tcgcattctt	gcgtccctta	3240

Сторінка 2

aattccctccc	tgacatgatt	caggacacac	cacctcctgt	tcctaggaag	aatcgggcta	3300
gtgataatgc	cggcctgaag	cgactgggtgg	cgcagtgga	cagaaaattg	agtgcacccc	3360
ccccctcaaa	accggttggg	ccaacacttg	accaaattgt	cccttcgccc	acgggtaccc	3420
agcaagaaga	tgtcacttcc	tccgatgggc	catercatgc	gccggatcct	cctagtcgaa	3480
tgagcacgag	tgggagttgg	aagggcccttg	tgtctctctg	taccggtctc	gcggggtcca	3540
ttagtcagca	tttcatgaca	tgggtttttg	aggtttttct	ccatctccca	gcttttgcac	3600
tcacacittt	ctcggcgagg	ggctctatgg	ctccaggtga	tgggatgttt	gcaggtgttg	3660
ttttacttgc	tctcctgctc	tgtcgttctt	acccagtact	cgggtgccc	cccttattgg	3720
gtgtcccttc	tggctctgtg	cggcgcgctc	gtctgggggt	ttttggttct	tggatggctt	3780
tcgctgtatt	tttattctcg	actccatcca	acccagtcgg	ttcttcttgt	gaccacgatt	3840
cgcgggagtg	tcatgtctgag	cttttggttc	tggagcagcg	ccaactttgg	gaacctgtgc	3900
gcggccctgt	ggtcggcccc	tggggccctc	tatgtgtcat	tcttggcaag	ctactcggtg	3960
ggtcacgtta	tcctcggcat	gttttcttac	gtttatgcac	gcttgcagat	ttggcccttt	4020
ctcttgttta	tgtggtgtcc	caggggctgt	gtcacaagt	ttggggaaag	tgtataagaa	4080
cagctccggc	ggaggtggct	ctcaatgtgt	tccctttctc	gcgcgctacc	cgtagctctc	4140
ttgtgtccct	gtgcgatcgg	ttccaagcgc	caaaaggggt	tgatcctgtg	tacttggcaa	4200
cgggttgggc	cgggtgttgg	tgtggtgaga	gtcccatcca	tcaaccgcac	caaaaaccca	4260
tagcttatgc	taatttggat	gaaaagaaaa	tatctgcccc	aacgggtggt	gctgtcccac	4320
acgatccag	tcaggccatc	aagtgcctga	aagttttgca	ggcgggagga	gccatcgtgg	4380
accagcccac	acctgaggtc	gtccgtgtat	ccgaaatccc	cttctcagcc	ccatttttcc	4440
caaaagtccc	agtcaacca	gattgtaagg	tgtggtgga	ttcggacact	tttgtggctg	4500
cggttcgtg	cggctactcg	acagcacaac	tggctctagg	ccagggcaac	tttgccaagt	4560
taaatcagat	tcccctcagg	agctccatct	ccaaccaagc	gattggcggg	gcctcttaca	4620
cccttgctgt	ggctcaagtt	tctgtgtgga	ctcttggtca	cttcactctc	ggcttttgg	4680
tcacgtcacc	ccaagtgtgt	ggccgaggaa	cctctgacct	atggtgttca	aatecttttt	4740
cataccctac	ctatggcccc	ggggttgtgt	gtctctctcg	actttgtgtg	tctgccgacg	4800
gggtcactct	accattgttc	tcagccgtgg	ctcaactctc	cggtagagag	gtggggattt	4860
ttattttgg	gtcgtctctc	ttgatggctt	tggcccacgg	catggccctt	aaggcagaca	4920
tgttgatgg	ctttctggct	ttttgtgctt	acgcctggcc	catgagctcc	tggttgattt	4980
gcttctttcc	tacactcttg	aagtgggtta	ccccccaccc	tcttactatg	ctttgggtgc	5040
actcattctt	ggtgttttgt	ctgccagcag	ccggcatcct	ctcactaggg	ataactggcc	5100
ttctttgggc	ggttggccgc	tttactcagg	ttgccggaat	tattacacct	tatgacatcc	5160
accagtacac	ctctgggcca	cgtggcgag	cagccgtggc	cacagcccca	gaaggcactt	5220
atatggccgc	cgtcaggaga	gctgctttaa	ctgggcgaac	tttaatcttc	accccgctctg	5280

cagttggatc ccttctcgaa ggagctttca ggactcataa accttgtrtt aacaccgtaa 5340
 atgttgragg ctcttccctt ggtrccggcg gggtrttcac tattgacggc agaaaaatrg 5400
 ttgtcactgc tgcccatgtg ttgaacggcg acacagctag agtcaccggc gactcctaca 5460
 accgcatgca tactttcaag accaatgggt attatgcctg gtcccatgct gatgactggc 5520
 ggggcgttgc ccttgcggtc aagggtgcca aggggtaccg cggtcgtgcc tactggcaaa 5580
 catcaactgg cgtcgaaccc ggtgttattg ggaagggtt cgccttctgt ttcaccacct 5640
 gtggcgattc ggggtcaccc gtcatctcag aatccgggtg tctcatggga atccataccg 5700
 gttrcaataa accttggttct ggtcttgtga caaccctga aggggagaca tgtaccatca 5760
 aagaaaccaa gctctctgac ctctccagac atttcgcagg cccaagcgtt cctcttgggg 5820
 atattaaatt gagtccagcc atcatccctg atgtaacatc cattccgagt gacttggcat 5880
 cgctcctatc ctccgtccct gtagtggaa gggccctctc gaccgttcaa cttttgtgtg 5940
 tctttttctt accttggcgc atgatgggct atgcctggac tccattgtt gccgtgggtt 6000
 tctttttact gaatgaaatt ctccagcag ttttgggtcc agccgtgttt tcttttgcac 6060
 tttttgtgct tgcatgggct accccctggt ctgcacaggt gttgatgatt agactcctca 6120
 cggcatctct caaccgcaac aagctttctc tggcgttcta cgcactcggg ggggtcgtcg 6180
 gtttggcgcg tgaatcggg acctttgtcg gcaaattgcc tgaattgtct caaaccttt 6240
 cgacatactg ctcttacctt agggctcttg ctatgaccag ttgtgttccc accatcarca 6300
 ttgggtggact ccatgcccct ggtgtaattc tgtgggtgtt caaataccgg tgccctccaca 6360
 acatgctcgt tgggtgatgg agtttttcaa ggccttctt cctacggtat ttgcagagg 6420
 gtaatctcag aaaagggtgt tcgcagtcct gtggcatgaa taacgagtc ctgacggctg 6480
 cttagcttg caagttgtca caggctgacc ttgatttttt gtccagctta acgaacttca 6540
 agtgctttgt atctgtctcg aatatgaaaa atgctgcccg ccagtaacatt gaagcggcgt 6600
 atgcgaaggc cctgcgcaa gagttggcat ctctagttca gattgacaaa atgaaaggag 6660
 tttgttccaa actcgaggcc ttgtctgaaa cagctactcc gtcccttgac ataggtgacg 6720
 tgattgttct gcttgggcaa catccacacg gatctatcct tgataatnaat gtggggactg 6780
 agaggaaaac tgtgtccgtg caagagaccc ggagcctagg cggttccaaa ttcatgtgtt 6840
 gtactgtcgt gtctaacaca tccgtggacg ccttaaccgg catccactc kagacaccaa 6900
 cccctctttt tgagaatggt ccgcgtcatc gcagcgaaga agacgatctt aaagtcgaga 6960
 ggatgaagaa acactgtgtg tccctcggtt tccacaacat caatggcaaa gtttactgca 7020
 agatttggga caagtcacc ggtgacacct ttacacgga tgattcccgg tataccacag 7080
 accatgcttt tcaggacagg tcagccgact acagagacag ggactatgag ggtgtgcaaa 7140
 ccgcccccca acagggattt gatccaaagt ctgaaacccc tgcggcact gttgtgatcg 7200
 gcggtattac gtataacagg tatctgacta agggtaagga ggttciggtt cccaagcccc 7260
 acaattgcct tgaagctgcc aagctgtctc ttgagcaagc tctcgtggg atgggcaaaa 7320
 ctgtgcacct tacagctgcc gaggtggaaa agttaagcg catcatcagt caactccaag 7380

CROPINKA 4

gtttgaccac tgaacagget ttaaaactgct agccgctagc ggcttgaccc gctgtggccg 7440
 cggcggettta gttgttactg aaacggcggg aaaaattgta agataccaca gcagaacttt 7500
 caccitgggc cctitggacc taaaagtcgc ttctgaggtg gaggtgaaga gatcaactga 7560
 gcagggccac gctgtgtggt caaacctatg ttctggtgtt gtattgatga gacctcacc 7620
 accgtccctt gttgacgttc ttctgaaacc cggacttgac acaacacccg gcattcaacc 7680
 ggggcatggg gccgggaata tgggcgtgga cgggtccatt tgggattttg aaaccgcacc 7740
 cacaaggca gaactcgagt tgtccaagca aataatccaa gcatgtgaag tcaggcgccg 7800
 ggatgccccg aacctccaac tcccttaca gctctgtcca gttagggggg atcctgagcg 7860
 gcataaagge cgccctatca ataccaggtt tggagatttg ccttacaaga ctcttcaaga 7920
 caccaagtcc gcaatccacg cggcttgttg cctgcacccc aacggggctc ccgtgtctga 7980
 tggtaaatcc acattaggca ccactcttca acacgggttc gagctttatg tccctactgt 8040
 gccctatagt gtcattggagt accttgattc acgcccctgac acccccttta tgtgtacca 8100
 acatgggtact cccgaggctg ctgcagagga ccttcgaaaa tatgacttat ccacccaagg 8160
 gtttgtcctg cctgggggtc tacgtctagt acgcagattc atctttggcc atattggtaa 8220
 ggcaccgcca ctgttcctcc catcaactta tccgcaccaag aactctatgg cagggatcaa 8280
 tggccagagg ttcccaacaa aagacgttca gagcatacct gaaattgatg aaatgtgtgc 8340
 ccgcgtgtgc aaagagaatt ggcaaaactgt gacgccttgc accctcaaaa aacagtattg 8400
 ttccaagcct aaaaccagga ccatccttgg taccaacaac ttcatgtcct tggctcacag 8460
 gtcggcactc agcgggtgtc ctcaggcggt catgaaaaaa gcctggaagt ccccgatcgc 8520
 cttggggaaa aacaaattta aggagtgtca ctgcactgtc gccggtaggt gcctcgaggg 8580
 cgacttggcc tcttgtgac gcagcacccc ggccatcgtg aggttggttg ttgccaacct 8640
 cctgtacgaa cttgcgggtt gtgaagagta ctgccaagc tatgtgtcca attgttgcca 8700
 tgacctggtg gcaacgcaaa atggcgccct cacaacacgt ggtggcctgt catctggaga 8760
 cccgttacc agtgtgtcca acacagtgtt ttacttggtg atttatgtc agcacatggt 8820
 gctgtcggct ttgaagatgg gtcatgaaat cggcctcaag ttcctcgagg aacagcttaa 8880
 gttcgaggac cttctcga aa tccagcctat gttggtatat tctgatgacc ttgtattgta 8940
 tgctgaaaga cccaccttcc ccaattacca ttggtgggtt gagcaccttg acctgatgct 9000
 ggggttttaag acagacccaa aaaagactgt cataactgac aaaccagct ttcttggctg 9060
 tagaatcgaa gcggggcgac aactggttcc caatcgcgac cgcattctgg ctgctcttgc 9120
 atatcatatg aaggcgcgag acgcctcaga gtattatgcy tctgtgtccg cgattctgat 9180
 ggactcgtgt gcttgcattg accacgatec tgagtgggtat gaggacctca tctgcggcat 9240
 tgctcgatgc gcccgccagg atggctacag ttcccaggc ccgcccgttct tcatgtccat 9300
 gtgggagaag ctgaaaagtc acaatgaagg caagaaattc cgccactgtg gcatttgtga 9360
 cgccaaggcc gatcatgcgt ccgcccgttg gcttgattta tgtctgttcc actcgcactt 9420

CROPINKA 5

```

tcacaaacac tgccttgta ctctgagctg cggccatcat gccggttcaa aagaatgcc 9480
acagtgtcag tcacctgttg gagctggtaa atccccctt gatgcagtgc tgaaacaaat 9540
cccgtaacaa cccctctgct ctgtcatcat gaaggtggac aataaaacaa cgaccttga 9600
cccggaagg tatcagtcct gtcgaggtct tgttgctgtc aagaggggta ttgcaggcaa 9660
tgaggttgat ctgctgatg gagactatca ggtagtgcct cttttgccaa cctgcaaaga 9720
cataaacatg gtgaaggtrg ctgtcaatgt gctactcagc aagttcatag tggggccgcc 9780
aggttcgggc aagacgacct ggctactgag tcaagttcag gatgatgat tcactatatac 9840
acctacccat cagaccatgt tcgacatagt caatgccctc aaagtcigta ggtattccat 9900
cccgatggct tcagggcttc ctttccacc gcccgccaga tctggaccgt ggggttaggct 9960
cgttgctagc gggcacatcc ctggccgaat atcatacctt gacgaggccg gatattgcaa 10020
tcactctggt attctcagac tgetttctaa gacacctctt gtgtgtttgg gtgaccttca 10080
gcaacttcc cctgtcggct ttgactctta ctgttatgtt ttgatcaaa tgctcataa 10140
gcagctgacc actatttata gatttggccc caatatcigt tctgccattc aaccttggtt 10200
cagggaaaaa ctcgaatcta aggccaggaa cactagggtg gtttttactg cccggccrgt 10260
ggcttttggg caggtgttga cggcatatca taaagaccgc accggctcag ctataaccat 10320
agattcater cagggagcca cctttgatgt tgtgacgtg catttgccgt cggcagattc 10380
ctgaacaaa tcccggtctc ttgtagctat tactcgggca aggcattgggt tgrtcatcta 10440
tgacctcat aaccaactcc ggaagtttt caacttaaca cctgagcgca ctgattgcaa 10500
ctctgtgttc aaccgcgggg acgagttggt agttttgaat gcagataatg cagtcacgac 10560
tgtggctaag gttttggagg cgggccgctc tcggtttcca gtatcagatc caaggtgcaa 10620
gtctctttta gccgcttgct cggccagctc ggaaggaggc tgcattgccac tgcgcgaagt 10680
ggcacataat ctggggtttt acttctctcc agatagtcca gcatttgcac ctctgccaaa 10740
agagctggca ccacattggc cgggtggttac tagtcagaac aaccaggcat gggccgaccg 10800
actgtcgct agtatcggc cagttgatgc ccgtacagc aagcctatgg tcggtgcagg 10860
gtatgtggtt gggccatcca ctttccttgg cactcctggt gtatgtcat actatctcac 10920
gctgtacatc aggggtgagc cccaggtctt gccggagaca ctctctcaa cgggacgtat 10980
agctactgat tgtcgagagt atctcgacgc agctgaggaa gaagcagcta aagaactccc 11040
tcacgcattc attggcgatg tcaaagggtac tacagtgggg ggggtgtcac acattacgtc 11100
aaaataacct cccaggtctt tgcccaagga ctccgttgcg gtggtcgag tgagttcgcc 11160
cggcaaggct gccaaagccg tgtgtactct caccgatgtg tatcttcccg agctccggcc 11220
atatttgcaa cggaaacag catcgaaatg ctggaaactt aaactagact tcagggatgt 11280
cagactgatg gtctggaag gageccaccg atatttccaa ctggaggggc tcacatggtc 11340
agcgtgtccc gactatgcca ggttcattca gtaaccaaaa gatgccgttg tgtacattga 11400
tcctgtcata ggaacggcaa cagccaaccg taaggtttgt agaactacag attggcagc 11460
tgacctggca gtgacaccgt acgactacgg tgctcagagc attttgacta cagcctgggt 11520

```

Стрінка 6

cgaggacctt gggccgcagt ggaagatctt aggggttgca ccttcaagc gggcatttgg 11580
 ctttgaaaac actgaggatt gggcgatctt tgcacgctgc atgaacgacg gcaaggacta 11640
 cactgactat aactggaatt gtgttcgaca acgcccacat gccatctacg gacgtgcccg 11700
 tgaccatacg tatcactttg cccctggcac tgaactgcaa gtagagctag gtaaaccctg 11760
 gctaccgctt gagcaagtac cgtgaatcta gagtgtatga atggggtcac tgtggagtaa 11820
 aatcagtcac ctgttcgtgg atgccttcac tgagtctctc gttagtgtgg ttgatattgt 11880
 catcttctct gccatactgt ttgggttcac cgttgcaggg tggttactgg tctttttttt 11940
 cagagtgggt tgcctccgcg ttctccgttc gcgctctgac attcactctt ccgaactatc 12000
 gaagggtcta tgagggtttg ctacctaatt gcagaaccga tgttccacaa ttccgagtc 12060
 agcaccattt gggatatact tggcacatgc gagtcttcca cttaatgac gaaatgggtt 12120
 ctgcgcgcat taaccagacc atggaacatt cagggtcaagc ggccctggaag cagggtgtta 12180
 gtgaagctac tctcacaaga ctgtcaaagc tgcacatagt tctccacttc caacacctgg 12240
 ccgcaataga ggcggattct tgcgccttcc tcagctcacg acttgtgatg ctgaaaaatc 12300
 ttgccgttgg caatatgagc ctacagtaca acaccacgtt ggaccgcgtt gagctcatct 12360
 tcccaacacc aggtacgagg cccaaattga ccgattttag acaatggctc gtcagtgtgc 12420
 acgtctctat ttttctctct gtggcctcat cagttacctt gttcatagtg ctttggcttc 12480
 gaattccagc tctacgctat gtttttgggt tccattggcc caccgcaaca catcattcga 12540
 gctaaccatc aattacacta tatgtaagcc ctgtctcacc agtcaagcgg ctgcacaaag 12600
 gctcgaaacc ggtcgcaaca tgtggtgcaa aataggacac accacgtgtg aggagcgtga 12660
 ccatgatgag ttgtcaatga ccattccgtc cgggtacgat aacctcaaac ttgagggtta 12720
 ttacgcttgg ctggcttttt tgtctttttc ttacycagcc caatttcac cagagtgtgt 12780
 cggaaatagg aatgtgtcac gcgtcttctg ggataaacgg caccagttca tctgtgccga 12840
 gcacgacgga caaaattcaa ccgtatccac cgaacataat atttccgcat tgtatgcggc 12900
 gtactaccac caccaggtag acgggggcaa ttggttccac ctggaatggc tgcggccttt 12960
 ctttctctcc tggctagtac tcaatatttc atggtttctg aggcgttcgc ctgcaagccc 13020
 tgtttctcga cgcatttacc agatattgag accaacacga ccgcggctgc cggtttcatg 13080
 gtccttcagg acatcaactg ttccacagc ggctcagagg cacaacgac tgggtccatc 13140
 agaaagtcgt ccaatgccc tgaagccgtc ggcactccc agtacatcaa gataacggcc 13200
 aatgtgaccg acgaatcata cttgtacaac gcggacttgc tgatgctttc tgcgtgcctt 13260
 ttctacgctt cagagatgag cgagaaaggc tttaaagtca tttttgggaa tgtctctggc 13320
 gttgtctccg cttgtgtcaa ttttacagat tatgtggccc atgtgacctc acataccrag 13380
 cagcatcatt tggtaatcaa tcacattcgg ttgtacatt tctgacacc atcagcaatg 13440
 aggtgggcta caaccattgc ttgtttgttc gccattctct tggcgatatg agatgttctc 13500
 acaaatcggg gtgtttcttg actccgcact cttgtctctg gtggcttttt ttgctgtgta 13560

```

ccggcttgtc ctggtccttt gccgatggca acggcaacag ctcgacatac caatatatat 13620
ataacttgac gatatgcgag ctgaatggga ccgaatggct gtccgaccat tttaattggg 13680
cagtcgagac ttttgtgtc tacccagtgg cgactcatat cctctcactg ggtttectca 13740
cgacaagtea tttccttgat gcgttcggtc ttggagcigt gtcagttaca gggttttgtg 13800
gcggggcgga cgtgcicagc agcgtgtacg gcgcttgtgc actagcagcg ctctgtatgtt 13860
ttgttatccg tgetgccaaa aattgtatgg cttgccgcta tgetcgtacc cggtttacca 13920
acttcattgt ggatgaccgg gggagaatcc atcgggtggag gtctccaata gtggtggaag 13980
aattaggtaa agctgacgtc ggcggcgacc ttgtcaccat caaacatgtc atctctgaag 14040
gagtcgaagc tcaacccctg acgaggactt cggccgagca atgggaggcc tagataattt 14100
ctgcaacgat cccaccgccc cacaaaagct tgtgttagcc tttagcatca catatacacc 14160
catcatgata tacgccctta aggtgtcagc cggccgactc ttgggggtgt tgcacatctt 14220
gatatttctg aactgttctt tcacgttcgg atacatgaca tatatgcatt ttgaatccac 14280
caaccgtgtc gcgttiacca tggggggcgt tgtcgccctt ctgtggggcg ttatagattt 14340
catagagtcg tgggaagtta tcacttcagc atgcagattg tgttgccctag gccggcgata 14400
cattctggcc cctgcccacc acgtagaaag tgetgcagge ctccatccga tcccagcgtc 14460
tggttaacca gcatacgtg tgagaaagcc cggactaaca tcagtgaacg gcactctggc 14520
accaggactt cgaggcctcg tgetggggcg caaacgagct gttaaacgag gagtgggtta 14580
cctcgtcaag tatggccggt aaaaaccaga gccagaagaa aaagaaaaat ccagctccaa 14640
tggggaatgg ccagtcagtc aatcaactgt gccagctgct gggcacaatg ataaagtccc 14700
agcgcacagc acccagggga ggacaggcta aaaagaaaaa gcctgagaag ccacatttcc 14760
ccctggctgc tgaagatgac gtccggcacc atctcaccca gaccgagcgc tccctttgct 14820
tgcaatcgat ccagacggct tttaatcaag gcgcaggaaac tgcgtcgctt tcattccagc 14880
ggaagatcgg ttttcaggtt gagtttatgc taccggttgc tcatacagtg cgcctgattc 14940
gcgtgacrtc tacatccgcc ggtcaggatg caaattaatt tgatagtcag gtgaatggcc 15000
gcgattggcg tgtggcctct gagtcaccta ttcaattagg gcgatcacat ggggggtcaga 15060
cttaattagg caggaaaccat gtgaccgaaa tt 15092

```

```

<210> 2
<211> 15092
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Ізолят 96v198 вірусу PRRS - пасаж 1

```

```

<400> 2
atgatgtgta gggatttccc cctacatata cgacacitct agtgtttgtg tgccttggag 60
gcgtgggtac agccccgcc cactctttgg cccctgttct agcccaacag gtatccttct 120
ctctcggggc gagcgcgcc cctgtgtctc ccttgcagca ggaaggacct cccgagtatt 180
tccggagagc acctgttita cgggatctcc accctttaac cagtcttggg acgttctccc 240

```

Стрпінка 8

gggtgcattgtg caccctcggt gcccggttat ttgtgaacgc cggccaagtc ttttgcacac	300
gggtgtctcag tgcgcggtct ctctctcttc cagagcttca ggacactgac ctgcctgcaa	360
tcggcttgtt ttacaagcct aaagacaagc ttacttggaa agtccctatc ggcattccctc	420
agggtggagtg tactccgtcc ggggtgctgt ggctctcagc catcttctgc ttggcggcga	480
tgacctccgg caatcacaaac ttcccccaac gacttgtgaa gggtgctgat gttttgtacc	540
gtgacggctg ctgggcacct cgacaccttc gcgaactcca agtttacgag cgcggctgca	600
actggtacct gattcacggg cccgtgcccg ggatgggttt atacgcgaac tctatgcattg	660
tgtccgacca accgtttcct ggtgccacct atgtgttgac gaactcacct ctgcctcagc	720
aggcttgtcg acagccgttt tgtccatttg aggaggttca ttccgacgta tacagggtgga	780
agaaattcgt gatttttgtg gatttctctt ctgacggccg atctcgcattg atgtggacac	840
caggatccga cgactcggtt gccttagaag tattgccacc tgaactagaa tgtcagatcg	900
aaatcttctg tcggagtttt cctgcccaac acctgttcca catcaccaac tgggagctca	960
ctgagtcctc tgagcacggt ttttcttcca gcacgcttca ttcttgttgt tactttgccc	1020
aaaaccttga cgtgtttgat ggttaagtgt ggcttcttgc ctttttgggc ctgccgacctg	1080
aagtgtggcg tcatgaggag tatctagcta acgccttcgg ttaccaaacc aagtggggcg	1140
tgcatggtaa gtacctccag cgcaggcttc aggtccgcgg catgcgtgct gtagttgatc	1200
ctgatggctc catccacgtt gaagtcgtgt ctggccccca gtcttggatc aggcacctga	1260
ctctaaatga tgacgtcacc ccaggatttg ttgcctaac atcccttcgc attgagccga	1320
acacagagcc tactactttc cggatctttc ggtttggagc gcataagtgg tatggcgctg	1380
ccggcaaacg ggctcgtgct aagcgtgccg ctaaagggtga gaagaattca gctcccaccc	1440
ccaaggctgc cctgccggtc cccacctgtg gaattaccac ctactctcca ccgacagacg	1500
ggctcttgtg ttggcatgtc ctggccgcca taatgaaccg gatgataaat ggtgacctca	1560
cgtccctctt gactccgtac aacagaccag aggatgattg ggcttctgat tatgatcttg	1620
ctcaggcaat ccaatgtcta caactgcctg ctaccgttgt ccggagtcgc gccctgtcta	1680
acgccaaagta cctcataaaa ctcaacggag tccactggga ggtagaggtg aggtcaggaa	1740
tggctctctg ctctctttct cgtgaatgtg tggttggcgt ttgctctgaa ggttgtgttg	1800
caccgcctta tccagcagac gggctaccag aacgagcact cgaggccttg gcgtctgttt	1860
acagggttacc ctctgattgt gttagctctg gcattgctga ctttcttgct aacccacctc	1920
ctcaggaatt ctggaccttc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccagag cgggtccggct	1980
tctctagttt gtataaatta ctattagagg ttgttccgca aaaaatgcggg gccacggaag	2040
gggctttcgt ctatgctgtt gagagaatgt tgaaggattg tccgagctcc aaacaggcca	2100
tggcccttct ggcaaaaatt aaagtccat cctcaaaggc cccgtctgtg tcccttgacg	2160
agtgtttccc tacggatgtt tcagccgact tcgagccagc atctcaggaa agggcccaaa	2220
gttccgggtg tctgtttgtc ctgtgttca cgggaagtaa agagtccgaa gaagcagccc	2280

CROPINKA 9

cagaagaagt tcaagagagt ggccacaagg tgcgccgctc tgcatttgtt gccgagggtc 2340
 ctaacaatga acaggtaccg atggctgccg gcgagcaact gaagcccggg ggtcgcgttt 2400
 tggcggctcg gaatgctcat gaaggtgttc tggccicaac tagttcgact aacctgatag 2460
 gcgggaactt ccccccctca gactccatga aagagagcat gctcaatagc tgggaagacg 2520
 aaccactgga ttgtcccaa ccggcaccag ctgttacaat gacccttgtg agagagcaaa 2580
 cacccgacaa cctgggtcct gatgccggtg ccttccccgt caccgttcga aaatttgtcc 2640
 cgacagggcc tacactccgt catgttgagc actgctggac ggagtcaggc gacagcagtt 2700
 cgcccttgga tctgtcttat gcgcaaaccc tggaccagcc tttaaatacta tecttggccg 2760
 ctggccaggt gagggccacc gcgtctgacc ctggctgggt ccacggtagg cgtgagccta 2820
 tctttgtaaa gccctcgagt gctttctctg acggcgattc agcccttcag ctcggggagc 2880
 tgtctgaatc cggctccgtc atcgagtttg accggacaag aaatgcctcg gcggtcgacg 2940
 cccctgttga cttgacggct tcgaaccagg ccttctctgt ggttgatcct ttcgaatttg 3000
 ccgaactcaa gcgccgcgt ttctccgac aagccttaat tgaccgaggc ggtccacttg 3060
 ccgacgtcca tgcaaaaata aagaaccggg tatatgaaca gtgccctcag gcttgtgagc 3120
 ctggcagtcg cgcaccccca gccaccaagg agtggctcga taaaatgtgg gatagggtgg 3180
 acatgaagac ttggcgtgtt acctcgaggt tccaagctgg tcgcattctt gcgtccctta 3240
 aattccctcc tgacatgatt caggacacac cacttctgt tcttaggaag aatcgggcta 3300
 gtgataatgc cggcctgaag cgactggtgg cgcagtggga cagaaaattg agtgcaaccc 3360
 ccccttcaaa accggttgga ccaacacttg accaaattgt ccttcgccc acgggtaccc 3420
 agcaagaaga tgtcacttc tccgatggc catctcatgc gccggatcct cctagtcgaa 3480
 tgagcacgag tgggagttgg aagggccttg tgctctctgg taccctctc gcggggctca 3540
 ttagtcagca ttcatgaca tgggtttttg aggtttctc ccatctcca gcttttgac 3600
 tcacactttt ctgccgagg ggctctatgg ctccagggtg ttggatgttt gcagggtgtg 3660
 ttttacttgc tctctgctc tgcgttctt acccagtact cgggtgcctt cctttatttg 3720
 gtgtccttcc tggctctgtg cggcgcttc gtctgggggt ttttggttct tggatggctt 3780
 tcgtgttatt ttattctcg actccatcca acccagtcgg ttcttcttgt gaccacgatt 3840
 cgccggagtg tcatgctgag cttttggctc ttgagcagc ccaactttgg gaacctgtgc 3900
 gcggccctgt ggtcggcccc tcgggctct tatgtgtcat tcttggcaag ctactcggtg 3960
 ggtcacgtta tctctggcat gttttcttac gtttatgcat gcttcagat ttggcccttt 4020
 ctcttgttta tgtggtgtcc caggggcgtt gtcacaagtg ttggggaaag tgtataagaa 4080
 cagctccggc ggagggtggc ctcaatgtgt tcccttctc gcgcgctacc cgtagctctc 4140
 ttgtgtcctt gtgcgactcg ttccaagcgc caaaaggggt tgatcctgtg tacttgcaaa 4200
 cgggttggcg cgggtgttgg tgtggtgaga gtccattca tcaaccgcac caaaaaccca 4260
 tagcttatgc taatttggat gaaaagaaaa tatctgccc aacgggtgggt gctgtccac 4320
 acgatccag tcaggccatc aagtgcctga aagttttga ggcgggagga gccatcgtgg 4380

Стрінка 10

```

accagcccac accagaggtc gtccgtgtat ccgaaatccc cttctcagcc ccatttttcc 4440
caaaagttcc agtcaaccca gattgtaagg ttgtggtgga ttcggacact ttgtggtctg 4500
cggttcgctg cggtctactg acagcacaae tggctcctagg ccagggaac ttgtccaagt 4560
taaatacagat tccccacagg agctccatct ccaccaaagc gattggcggg gcctcttaca 4620
cccttgctgt ggtcaagtt tctgtgtgga cttctgttca cttcactctc ggtcttttgt 4680
tcaagtcacc ccaagtgtgt gggcgaggaa cctctgaccc atggtgttca aatccttttt 4740
cataccctac ctatggcccc ggggttgtgt gctcctctcg acitttgtgt tctgccgacg 4800
gggtcactct accattgttc tcagccgtgg ctcaactctc cggtagagag gtggggattt 4860
ttatttttgt gctcgtctcc ttgatggctt tggcccaccg catggccctt aaggcagaca 4920
tgttgatggt ctttctggtt ttttgtgtt acgcttgccc catgagctcc tggttgattt 4980
gcttctttcc tacactcttg aagtgggtta ccttcacccc tcttactatg ctttgggtgc 5040
actcattctt ggtgttttgt ctgccagcag ccggcactct ctcaataggg ataactggcc 5100
ttctttgggc ggttggccgc tttaactcagg ttgccggaat tattacacct tatgacatcc 5160
accagtacac ctctgggcca cgtggcgtct cagctgtggc cacagcccca gaaggcactt 5220
atatggccgc cgtccggaga gctgctttaa ctgggcgaac tttaatcttc acccctctg 5280
cagttggatc ccttctcgaa ggagcttca ggactcataa accttgtctt aacaccgtaa 5340
atgttgtagg ctcttccctt ggttcggcg gggttttcac tatgacggc agaaaaattg 5400
ttgtcactgc tgcccattgt ttgaacggcg acacagctag agtcaccggc gactcttaca 5460
accgcatgca tactttcaag accaatgggt attatgcctg gtcccatgct gatgactggc 5520
ggggcggttc ccttgcggtc aagggttcga aggggtaccg cggctgtgcc tactggcaaa 5580
catcaactgg cgtcgaaccc ggtgttattg ggaaggggtt cgccttctgt ttcaccacct 5640
gtggcgatcc ggggtcaccg gtcactctag aatccgggtg tctcattgga atccataccg 5700
gttcaataaa acttgggtctt ggtcttgtga caacccctga aggagagaca tgtgccatca 5760
aagaaaccaa gctctctgac ctttcagac atttcgcagg cccaagcgtt cctcttgggg 5820
atattaaatt gagtcagcc atcatccctg atgtaacatc cattccgagt gacttggcat 5880
cgctctatc ctcgtccct gtagtggaag gcggcctctc gaccgttcaa ctttttgtgt 5940
tcttttctc actttggcgc atgatgggcc atgcctggac tcccattgtt gccgtgggtt 6000
tctttttact gaatgaaatt cttccagcag ttgtggtecg agccgtgttt tcttttgcac 6060
tttttgtgct tgcattggcc acccctggt ctgcacaggt gttgatgatt agactctca 6120
cggcatctct caaccgcaac aagcttctc tggcgttcta cgcactcggg ggggtcgtcg 6180
gtttggccgc tgaatcggg acttttgtct gcaaattgce tgaattgtct caaaccttt 6240
cgacatactg cttcttacct agggctcttg ctatgaccag ttgtgttccc accatcatca 6300
ttggtggact ccatgcccct ggtgtaattc tgtggttgtt caaataaccg tgccctcaca 6360
acatgctcgt tgggtatggg agtttttcaa gcgccttctt cctacggtat ttgcagagg 6420

```

gtaatctcag	aaaaggtgtt	tcgcagtcct	gtggcatgaa	taacgagtc	ctgacggctg	6480
ctttagcttg	caagttgtca	caggctgacc	ttgatttttt	gtccagctta	acgaacttca	6540
agtgccttgt	atctgcttcg	aatatgaaaa	atgctgccgg	ccagtacatt	gaagcggcgt	6600
atgccaaggc	cctgcgccaa	gagttggcat	ctctagttca	gattgacaaa	atgaaaggag	6660
ttttgtccaa	actcgaggcc	tttgcctgaa	cagctactcc	gtcccttgac	ataggtgacg	6720
tgattgttct	gcttgggcaa	catccacacg	gatctatcct	tgataattaat	gtggggactg	6780
agaggaaaa	tgtgtccgtg	caagagaccc	ggagcctagg	cggttccaaa	ttcagtgttt	6840
gtactgtcgt	gtctaacaca	cccgtggacg	ccttaaccgg	catccacac	cagacaccaa	6900
cccccttttt	tgagaatggt	ccgcgtcatc	gcagcgaaga	agacgatctt	aaagtcgaga	6960
ggatgaagaa	acactgtgtg	tccctcggtt	tccacaacat	caatggcaaa	gtttactgca	7020
agatttggga	caagtcacac	ggcgacacct	tttacacgga	tgatttccgg	tatccccacg	7080
accatgcttt	tcaggacagg	tcagccgact	acagagacag	ggactatgag	gggtgtgcaa	7140
ccgcctccca	acagggattt	gatccaaagt	ctgaaacccc	tgctggcact	gttgtgatcg	7200
gcggtattac	gtataacagg	tatctgacta	agggtaagga	ggttctggtt	cccaagcccc	7260
acaattgcct	tgaagctgcc	aagctgtctc	ttgagcaagc	tctcgtctgg	atgggccaaa	7320
cttgcgacct	tacagctgcc	gaggtggaaa	agttaaagcg	catcatcagt	caactccaag	7380
gtttgaccac	tgaacaggct	ttaaaactgt	agccgctagc	ggcttgaccc	gctgtggccg	7440
cggcggtcta	gttgttactg	aaacggcggg	aaaaattgta	agataccaca	gcagaacttt	7500
caccttgggc	cttttggacc	taaaagtcgc	ttctgaggtg	gaggtgaaga	gatcaactga	7560
gcaggggcac	gctgtgtgtg	caaacctatg	ttctgggtgt	gtattgatga	gacctcacc	7620
accgtccctt	gttgacgttc	ttctgaaacc	cggacttgac	acaacacccg	gcattcaacc	7680
ggggcatggg	gccgggaata	tgggcgtgga	cggttccatt	tgggattttg	aaaccgcacc	7740
cacaaggcca	gaactcgagt	tgtccaagca	aataatccaa	gcattgtgaag	tcaggcgccg	7800
ggatgccccc	aacctccaac	tcccttaca	gctctgtcca	gttagggggg	atcttgagcg	7860
gcataaaggc	cgccttatca	ataccagggt	tggagatttg	ccttacaaga	ctcctcaaga	7920
caccaagtcc	gcaatccacg	cggcttgttg	cctgcacccc	aacggggctc	ccgtgtctga	7980
tggtaaatcc	acattaggca	ccactcttca	acacgggttc	gagcittatg	tccctactgt	8040
gccctatagt	gtcatggagt	accttgattc	acgccctgac	acccccctta	tgtgtacca	8100
acatggtact	cccagggctg	ctgcagagga	ccttcgaaaa	tatgacttat	ccacccaagg	8160
gtttgtcctg	cctggggctc	tacgtctagt	acgcagattc	atctttggcc	atattggtaa	8220
ggcaccgcc	ctgttctctc	catcaactta	tcccggccaag	aactctatgg	cagggatcaa	8280
tggccagagg	ttcccaacaa	aagacgttca	gagcatacct	gaaattgatg	aaatgtgtgc	8340
ccgcgctgtc	aaagagaatt	ggcaaaactgt	gacgccttgc	acctcaaaa	aacagtattg	8400
ttccaagcct	aaaaccagga	ccatccttgg	taccaacaac	ttcattgcct	tggtcacacg	8460
gtcggcactc	agcgggtgtc	ctcaggcggt	catgaaaaaa	gcctggaagt	ccccgatcgc	8520

Сторінка 12

```

cttggggaaa aacaaattta aggagttgca ctgcactgtc gccggtaggt gcctcgaggc 8580
cgacttggcc tcttgtgatc gcagcaccac gcccatcgtg aggtgggttg ttgccaacct 8640
cctgtacgaa cttgcgggtt gtgaagagta cttgccaaagc tatgtgtcca attgttgcca 8700
tgacctgggtg gcaacgcaaa atggcgccctt cacaaaacgt ggtggccctgt catctggaga 8760
ccccgttacc agtgtgtcca acacagtgtt ttcactgggtg atttatgtct agcacatggt 8820
gctgtcgggt ttgaagatgg gtcattgaaat cggccctcaag ttccctcgagg aacagcttaa 8880
gttcgaggac cttctcgaaa tccagccctat gttggtatat tctgatgacc ttgtattgta 8940
tgetgaaaga cccaccttcc ccaattacca ttggtgggtt gagcaccttg acctgatgct 9000
gggttttaag acagacccaa aaaagactgt cataactgac aaaccagct ttcttggctg 9060
tagaatcgaa gcggggcgac aactgggttc caatcgcgac cgcattctgg ctgctcttgc 9120
atatcacatg aaggcgcgag acgcccagag gtattatgct tctgctgccg cgattctgat 9180
ggactcgtgt gcttgcattg accacgatcc tgagtgggtat gaggacctca tctgcggcat 9240
tgctcgatgc gcccgccagg atggctacag ttcccaggc ccgcccgtct tcatgtccat 9300
gtgggagaa gtgaaaagtc acaatgaagg caagaaattc cggcactgtg gcatttgtga 9360
cgccaaggcc gatcatgcgt ccgctgtgtg gcttgattta tgtctgttcc actgcacctt 9420
tcatcaacac tgccctgtta ctctgagctg cggccatcat gccgggtcaa aagaatgccc 9480
acagtgtcag tcacctgttg gagctggtaa atccccctt gatgcagtgc tgaaacaaat 9540
cccgtaaaaa cccctcgtc ctgtcatcat gaaggtggac aataaaacaa cgaccttga 9600
cccggaagg tatcagtcct gtcgaggtct tgttctgtc aagaggggta ttgcaggcaa 9660
tgaggttgat ctgctgatg gagactatca ggtagtgcc ctttgccaa cctgcaaaga 9720
cataaacatg gtgaagggtg ctgtcaatgt gctactcagc aagtccatag tggggccgcc 9780
aggttccggc aagacgacct ggctactgag tcaagttcag gatgatgatg tcatctatac 9840
acctaccat cagaccatgt tcgacatagt caatgccctc aaagtctgta ggtattccat 9900
ccragsgtct tcagggctcc ctttccacc gcccgccaga tctggaccgt gggttaggct 9960
cgttgcctagc gggcacatcc ctggccgaat atcatacctt gacgaggccg gatattgcaa 10020
tcatctggat attctcagac tgctttctaa gacacctctt gtgtgttttg gtgaccttca 10080
gcaacttcac cctgtcgggt ttgactctta ctgttatgtt ttgatcaaa tgcctcataa 10140
gcagctgacc actatttata gatttggccc caatatctgt tctgccattc aaccttgtta 10200
cagggaaaaa ctgaaatcta aggccaggaa cactagggtg gtttttacty cccggcccty 10260
ggcttttggc caggtgttga cgccatatca taaagaccgc accggctcag ctataaccat 10320
agattcatcc cagggagcca cctttgatgt tgtgacgctg catttgccgt cgccagattc 10380
cctgaacaaa tcccgggtc ttgtagctat tactcgggca aggcattgggt tgttcattca 10440
tgacctcat aaccaactcc ggaagttttt caacttaaca cctgagcgca ctgattgcaa 10500
cctcgtgttc aaccgcgggg acgagttggt agttttgaat gcagataatg cagtcacgac 10560

```

CROPINKA 13

tgtggctaag	gttttgagg	cgggcccgtc	tcggtttcga	gtatcagatc	caagggtgcaa	10620
gtctcttitta	gccgcttgc	cgccagctct	ggaaggagge	tgcatgccac	tgccgcaagt	10680
ggcacataat	ctgggggttt	acttcctec	agatagtcga	gcatttgcac	ctctgccaaa	10740
agagctggca	ccacattggc	cggtggttac	tagtcagaac	aaccaggcat	ggcccagaccg	10800
acttgctgct	agtatgcggc	cagttgatgc	ccgtacagc	aagcctatgg	tcggtgcagg	10860
gtatgtggtt	gggccatcca	cttcccttg	cactcctgg	gtagtgtcat	actatctcac	10920
gctgtacatc	aggggtgagc	cccaggcct	gccggagaca	ctcgtctcaa	cgggacgtat	10980
agctactgar	tgtcgagagt	atctcgacgc	agctgaggaa	gaagcagcta	aagaactccc	11040
tcaegcattc	attggcgatg	tcaaaggtag	tacagtgggg	gggtgtcacc	acattacgtc	11100
aaaatacett	cccaggctct	tgcccaagga	ctccgttgc	gtggtcggag	tgagttcgcc	11160
cggcaaggct	gccaaagccg	tgtgtactct	caccgatgtg	tatcttccc	agctccggcc	11220
atatttgcaa	ccggaaacag	catcgaaatg	ctggaaactt	aaactagact	tcagggatgt	11280
cagactgatg	gtctggaaag	gagccaccgc	atatttccaa	ctggaggggc	tcacatggtc	11340
agcgtgcgcc	gactatgcca	ggttcattca	gctacacaaa	gatgccgttg	tgtacattga	11400
tccgtgcata	ggaccggcaa	cagccaaccg	taaggttgtg	agaactacag	attggcgagc	11460
tgacctggca	gtgacaccgt	acgactacgg	tgctcagagc	attttagcta	cagcctggtt	11520
cgaggacctt	gggcccagct	ggaagatttt	aggggtgcaa	cccttcaagc	gggcatttgg	11580
ctttgaaaac	actgaggatt	gggcgactct	tgacgctgc	atgaacgacg	gcaaggacta	11640
cactgactat	aactggaatt	gtgttcgaca	acgccacat	gccatctacg	gacgtgccc	11700
tgaccatacg	tatcactttg	cccctggcac	tgaactgcaa	gtagagctag	gtaaacccc	11760
gctaccgcct	gagcaagtac	cgtgaatcta	gagtgatgca	atgggggtcac	tgtggagtaa	11820
aatcagtcga	ctgttcgtgg	atgccttcc	tgagttccct	gttagtgtgg	ttgatattgt	11880
catcttctt	gcatactgt	ttgggttcac	cgttcaggg	tggttactgg	tcttttttt	11940
cagagtgggt	tgttcggcgc	ttctccgttc	gcgtctgccc	attcactctt	ccgaactatc	12000
gaaggtccta	tgagggtctg	ctaccttaatt	gcagaccgga	tgttccacaa	ttcgcagtcga	12060
agcaccctat	gggtatactt	tggccatgc	gagtttccca	cttaattgac	gaaatggctt	12120
ctgcgcgcct	ttaccagacc	atggaacatt	caggtcaagc	ggcctggaag	caggtgggta	12180
gtgaagctac	tctcacaaga	ctgtcaaagc	tcgacatagt	tctccacttc	caacacctgg	12240
ccgcaataga	ggcggattct	tgcgcctcc	tcagctcagc	acttggtgatg	ctgaaaaatc	12300
ttgccgttgg	caatatgagc	ctacagtaca	acaccacgtt	ggaccgcgtt	gagctcatct	12360
tcccaacacc	aggtacgagg	cccaaattga	ccgatttttag	acaatggctc	gtcagtggtc	12420
acgcttctat	tttttctct	gtggcctcat	cagttacctt	gttcatagtg	ctttggcttc	12480
gaattccagc	tctacgctat	gtttttgggt	tcatttggcc	cacggcaaca	catcattcga	12540
gctaaccatc	aattacacta	tatgtaagcc	ctgtctcacc	agtcaagcgg	ctcgacaaag	12600
gctcgaaccc	ggctcgcaaca	tgtggtgcaa	aataggacac	accacgtgtg	aggagcgtga	12660

CROPINKA 14

ccatgatgag ttgtcaatga ccattccgtc cgggtacgat aacctcaaac ttgagggtta	12720
ttacgcrctgg ctggcttttt tgtecccttc ttacgcagcc caatttcate cagagtgtgt	12780
cggaaataggg aatgtgtcac gcgtcttcgt ggataaacgg caccagttca tctgtgccga	12840
gcacgacgga caaaattcaa ccgtatccac cgaacataat atttccgcct tgtatgcggc	12900
gtactaccac caccaggtag acggggggcaa ttgggtccac ctggaatggc tgcggccttt	12960
cttttcctcc tggctagtac tcaatatctc atgggtttctg aggcgttcgc ctgcaagccc	13020
tggtttctga cgcatttate agatattgag accaacacga ccgcggctgc cggtttcatg	13080
gtccctcagg acatcaactg tttccacagt ggctcagagg cacaacacga tgggtccatc	13140
agaaagtctt ccaatgccc tgaagccgtc ggcactcccc agtacatcaa gataacggcc	13200
aatgtgaccg acgaatcata ctgttacaac gcggacttgc tgatgcttcc tgcgtgcctt	13260
ttctacgcct cagagatgag cgagaaaggc tttaaagtca tttttgggaa tgtctctggc	13320
gttgtctccg ctgtgtgcaa ttttacagat tatgtggccc atgtgaacca acatacccag	13380
cagcatcatt tggtaataca tcacattcgg ttgtctacatt tccctgacacc atcagcaatg	13440
aggtgggcta caaccattgc ttgtttgttc gccattctct tggcgatatg agatgttctc	13500
acaaatcggg gtgtttcttg actccgcact ctgtcttctg gtggcttttt ttgtgtgta	13560
ccggcctgtc ctggctcttt gccgatggca acggcaacag ctgcacatac caatatatat	13620
ataacttgac gatatgcgag ctgaatggga ccgaatggct gtccgaccat ttttaattggg	13680
cagtcgagac ttttgtgtc tacccagtg cgactcatat cctctcactg ggtttctca	13740
cgacaagtca tttccttgat gcgttcggtc ttggagctgt gtcagttaca gggttttgtg	13800
gcgggycgta cgtgctcagc agcgtgtacg gcgcttctgc actagcagcg ctctgtatgt	13860
ttgttatccg tgcgtccaaa aattgtatgg ctgtccgcta tgcctgtacc cggttttacca	13920
acttcattgt ggatgaccgg gggagaatcc atcgggtggag gtctccaata gtggtggaaa	13980
aattaggtaa agctgacgtc ggcggcgacc ttgtcaccat caaacatgtc atcctcgaag	14040
gagtcbaagc tcaacccctg acgaggactt cggccgagca atggggaggcc tagataattt	14100
ctgcaacgat cccaccgccc cacaagaact tgtgttagcc tttagcatca catatacacc	14160
catcatgata tacgccccta aggtgtcacg cggccgactc ttgggggtgt tgcacatctt	14220
gatatttctg aactgttctt tcacgttcgg atacatgaca tatatgcatt ttgaatccac	14280
caaccgtgtc gcgcttacca tggggggcgt tgtcgcctt ctgtggggcg tttatagtgt	14340
catagagtca tggaaagttt tcacttccag atgcagattg tgttgectag gccggcgata	14400
cattctggcc cctgcccacc acgtagaaag tgcctcaggg ccccatccga tcccagcgtc	14460
tggttaaccaa gcatacgtg tgagaaagcc cggactaaca tcagtgaacg gcactctggt	14520
accaggactt cgaggccctg tgcctggcgg caaacgagct gttaaacgag gagtgggtta	14580
cctcgtcaag tatggccggt aaaaaccaga gccagaagaa aaagaaaaat ccagctccaa	14640
tgggggaatgg ccagtcagtc aatcaactgt gccagctgct gggcacaatg ataaagtccc	14700

Сторінка 15

```

agcgccagcg acccagggga ggacaggcta aaaagaaaaa gctgagaag ccacatttcc 14760
ccctggctgc tgaagatgac gtccggcacc atctcaccca gaccgagcgc tcccttggct 14820
tgcaatcgat ccagacggct tttaatcaag gcgcaggaaac tgcgtcgctt tcatccagcg 14880
ggaagatcgg ttttcagggt gagtttatgc taccggttgc tcatacagtg cgcctgatcc 14940
gcgtgacttc tacatccgcc ggtcaggatg caaatttaatt tgatagtcag gtgaatggcc 15000
gcgattggcg tgtggcctct gagtcaccta ttcaattagg gcgacacat gggggtcaga 15060
cttaattagg caggaacctat gtgaccgaaa tt 15092

```

```

<210> 3
<211> 15092
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Ізолат 96V198 вірусу PRRS - пасаж 9

```

```

<400> 3
atgatgtgta ggggtatccc cctacataca cgacaattct agtgtttgtg tgccttggag 60
gcgtgggtat agcccgccc caccctcttg cccctgttct agcccaacag gtatccttct 120
ctctcggggc gagcgcgccg cctgtgctc ccttgcagca ggaaggacct cccgagtatt 180
tccggagagc acctgcttta cgggacatcc accctttaac catgtctggg acgttctccc 240
ggtgcatgtg caccctggct gcccgggat tttggagcgc cggccaagtc tattgcacac 300
gggtctctag tgcacggctt cttctctctc cggagcttca ggacacigac ctgctgcaa 360
ttggcttggt ttacaagcct aaagacaagc ttacatggaa agtccctatc ggcattccctc 420
aggtggagtg tactccgtcc ggtgtctggt ggctctcagc catcttccctc ttggcggcca 480
tgacctccgg caatcacaaac tttctccaac gacttgtgaa ggttgcgtgat gttttgtacc 540
gtgacggctg cttggcacct cgacaccttc gcgaactcca agtttacgag cgcggctgca 600
actggtaacc gatcacgggg cccgtgcccc ggaatgggtt gtacgcgaac tccatgcacg 660
tgtccgacca accgtttcct ggtgcgctc atgtgttaac gaactcacct ctgcctcagc 720
aggtctgttg acagccgttt tgtccatttg aggaggttca ttccgacgta tacagggtgga 780
agaaattcgt gatttttgtg gattctctt ctgacggccg atctcgcatg atgtggacac 840
caggatccga cgactcggct gccttagaag tattgccacc tgaactagaa tgcgagtcg 900
aaatctcgt tcggagtttt cctgcccaac accctgtcga catcaccaac tgggagctca 960
ctgagtcctc tgagcacggg ttttcttcca gcacgttcca ttcttgggt taccttgcctc 1020
aagacctga cgtgtttgat ggtaagtgtt ggctttcttg ctttttgggc ctgcrgaccg 1080
aagtgtggcg tcatgaggag tatctagcta acgccttcgg ttaccaaacc aagtggggcg 1140
tgcatggtaa gtacctcag cgcaggcttc aggtccgctg catgcgtgct gtagttgac 1200
ctgatggctc catcacgtt gaagcgctgt cttgccccca gtcttggatc aggcacctga 1260
ctctaaatga tgacgtcacc ccaggatttg ttgcctaac atcccttcgc attgagccga 1320
acacagagcc tactactttc cggatctttc ggtttggagc gcataagtgg tatggcgctg 1380

```

Сторінка 16

```

ccggcaaacg ggcctcgtgct aagcgtgccg cttaaagggtga gaagaattca gctccccccc 1440
ccaaggtegc cctgccgggc cccacctatg gaattaccac ctactctcca ccgacagacg 1500
ggctcttggtg ttggcatgtc ctfgccgcca taatgaaccg gatgataaat ggtgacttca 1560
cgctccctct gactccgtac aacagaccag aggatgattg ggctctctgat taigatcttg 1620
ctcaggcaat ccaatgtcta caactgcccg ctaccgtggg ccggagtcgc gcctgtccta 1680
acgccaaagta cctcataaaa ctcaacggag tccactggga ggtagagggt aggtcaggaa 1740
tggtcctctg ctctcttctc cgtgaatgtg tggttggcgt ttgctctgaa ggttggtgtg 1800
caccgcctta tccagcagac gggctaccag aacgagcact cgaggccttg gcgtctgctt 1860
acaggttacc ctctgattgt gttagctctg gcattgttga cttctctgct aaccacctc 1920
ctcaggaatt ctggaccctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccagag cggctccggt 1980
tccttagttt gtataaatta ctattagagg ttgttcgca aaaatgcggt gccacggaag 2040
gggctttcgt ctatgctgtt gagagaatgt tgaaggattg tccgagctcc aaacaggcca 2100
tggcccttct ggcaaaaatt aaagttccat cctcaaaggc cccgtctgtg tcccttgarg 2160
agtgtttccc tacggatgtt tcagccgact tcgagccagc atctcaggaa agggcccaaa 2220
gttccgggtg tgctgtgtc ctgtgttcac cggaaagtaa agagttcgaa gaagcagccc 2280
cagaagaagt tcaagagagt ggccacaagg tcgcccgtc tcgatttgtt gccgagggtc 2340
ctaacaatga acaggtaccg atggctgccg gcgagcaact gaagcccggt ggtcgcgttt 2400
tggcggtcgg gaatgctcat gaaggtgttc tggectcaac tagttcgact aacctgatag 2460
gggggaactt ccccccctca gactccatga aagagagcat gctcaatagc tgggaagacg 2520
aaccactgga tttgtcccaa ccggcaccag ctgttacaat gaccttgtg agagagcaaa 2580
cacccgacaa cctgggtcct gatgccgggt ccttccccgt caccgttcga aaatttgtcc 2640
cgacaggggc tacactccgt catgttgagc actgcggcac ggagtcaggc gacagcagtt 2700
cgcccttgga tctgtcttat gcgcaaaccc tggaccagcc tttaaatcta tccttgggcg 2760
cttggccagt gagggccacc gcgtctgacc ctggctgggt ccacggtagg cgtgagccta 2820
tctttgtaaa gcctcgagat gctttctctg acggcgattc agcccttcag ctcggggagc 2880
tgtctgaatc cggctccgtc atcgagttg accggacaag aaatgctccg gcggctgacg 2940
ccctgttga cttagcggct tcgaacaagg cctctctgt ggttgatcct ttcgaattg 3000
ccgaactraa ggcgccgcyt tttctgcac aagccttaat tgaccgaggc ggtccactg 3060
ccgacgtcca tgcaaaaata aagaaccggg tatatgaaca gtgcctccag gcttgtagc 3120
ctggcagtcg cgcaaccca gccaccaaga agtggctcga taaaatgtgg gatagggtgg 3180
acatgaagac ttggcgtgt acctcgagc tccaagctgg tcgcattctt gcgtccctta 3240
aattccctcc tgacatgatt caggacacac cacttctgt tcctaggaag aatcgggcta 3300
gtgataatgc cggcctgaag cgactgggtg cgcagtggga cagaaaattg agtgcaaccc 3360
ccccctcaaa accgggttga ccaacacttg accaaaattg ccttccgccc acgggtaccc 3420

```

Стрінка 17

```

agcaagaaga tgtcacttcc tccgatgggc catctcatgc gccggatcct cctagtcgaa 3480
tsagracagag tgggagttgg aagggccttg tgcctctctg taccctcttc gcgggggtcca 3540
ttagtcagca ttcatgaca tgggttttgg aggttttctc ccatctccca gcttttgac 3600
tcacactttt ctgcgcgagg ggccttatgg cttcagggtg ttggatgttt gcagggtgtg 3660
ttttacttgc tctcctgcct tgccttctt acccagttat cgggtgcctt cctttatgg 3720
gtgtcctttc tggctctgtg cggcgcgttc gtctgggggt ttttggttct tggatggctt 3780
tcgctgtatt ttattctctg actccatcca acccagtcgg ttcttcttgt gaccacgatt 3840
cgccggagtg tcatgctgag cttttggctc ttgagcagcg ccaactttgg gaacctgtgc 3900
gcggccttgt ggtcggcccc tggggcctct tatgtgtcat tcttggcaag ctactcggtg 3960
ggtcacgtta tctctggcat gttttcttac gtttatgcat gcttcagat ttggcccttt 4020
ctcttgttta tgtggtgtcc caggggcgtt gtcacaagtg ttggggaaag tgtataagaa 4080
cagctccggc ggaggttggc ctcaatgtgt tcccttctc gcgcgtacc cgtagctctc 4140
ttgtgtctti gtgcgacgg ttccaagcgc caaaaggggt tgcctctgtg tacttggcaa 4200
cgggttggcg cgggtgttgg tgtggtgaga gtcccttcca tcaaccgcat caaaaacca 4260
tagcttatgc taatctggat gaaaagaaaa tatctgccca aacgggtggt gctgtccac 4320
acgatccag tcaggccatc aagtgcctga aagttttgca ggccggaggga gccatcgtgg 4380
accagccac acctgaggtc gtccgtgtat ccgaaatccc cttctcagcc ccatttttcc 4440
caaaagtccc agtcaacca gattgtaagg ttgtggtgga ttcggacact tttgtggtg 4500
cggttcgtg cggctactcg acagcacaac tggctttagg ccagggaac tttgccaagt 4560
taaatcagat tccctcagg agctccatct ccaccaaagc gattggcggg gcctcttaca 4620
cccttgctgt ggtcaagtt tctgtgtgga ctcttgttca ctccatctc ggtctttggt 4680
tcacgtcacc ccaagtgtgt ggcgaggaa cctctgaacc atgggtgtca aatcctttt 4740
cataccctac ctatggcccc ggggttgtgt gctcctctcg actttgtgtg tctgccgacg 4800
gggtcactct accattgttc tcagccgtgg ctcaactctc cggtagagag gtggggatit 4860
ttattttggg gctcgtctcc ttgatggctt tggccaccg catggccctt aaggcagaca 4920
tgttgatggt cttcttggct ttttgtgctt acgcttggc catgagctcc tgggtgattt 4980
gcttctttcc tacactcttg aagtgggtta cctccaccc tcttactatg ctttgggtgc 5040
actcattctt ggtgttttgt ctgccagcag ccggcatcct ctactaggg ataactggcc 5100
ttctttgggc ggttggccgc tttactcagg ttgccggaat tattacacct tatgacatcc 5160
accagtacac ctctgggcca cgtggcgtcg cagctgtggc cacagcccca gaaggcactt 5220
atatggccgc cgtccggaga gctgctttaa ctgggcgaac tttaatcttc acccgtctg 5280
cagttggatc ccttctcgaa ggagtttca ggactcataa accttgtctt aacaccgtaa 5340
atgtttagg ctcttccctt ggttcggcg ggttttccac tattgacggc agaaaaattg 5400
ttgtcactgc tgeccatgtg ttgaacggcg acacagctag agtcaccggc gactctaca 5460
accgcattga tactttcaag accaatgggt attatgctt gtcctatgct gatgactggc 5520

```

CROPINKA 18

```

ggggcggtgc ccctgcggtc aagggtgcga aggggtaccg cggtcgtgcc tactggcaaa 5580
catcaactgg cgtcgaaccc ggtgttattg ggggaagggtt cgccttctgt ttcaaccact 5640
gtggcgattc ggggtcaccg gtcattctag aatccggtga tctcattgga atccataccg 5700
gttcaaataa acctgggtct ggtcttgtga caacccttga aggggagaca tgtaccatca 5760
aagaaacca gctctctgac ctctccagac atttcgagg cccaagcgtt cctcttgggg 5820
atattaaatt gagtcacagc atcatccctg atataacatc cattccgagt gacttggcat 5880
cgctectate ctccgtccct gtagtggag gcgccctctc gaccgttcaa cttttgtgtg 5940
tctttttctt accttggcgc atgatgggcc atgcctggac tcccattgtt gccgtgggtt 6000
tctttttact gaataaaatt ctctcagcag ttttgggtcc agtcgtgttt tttttgcac 6060
tttttgtgct tgcattgggc accccctggt ctgcacaggt gttgatgatt agactcctca 6120
cggcatctct caaccgcaat aagctttctc tggcgttcta cgcactcggg ggggtcgtcg 6180
gtttggccgc tgaatcggg acctttgtg gcaaatggcc tgaattgtct caaaccttt 6240
cgacatactg cttcttacct aggggtcttg ctatgaccag ttgtgttccc accatcatca 6300
ttggtggact ccatgccctc ggtgtaattc tgtggttgtt caaataccgg tgccctcaca 6360
acatgctcgt tgggtgatgg agtttttcaa gcgccttctt cctacgggat ttgtcagagg 6420
gtaatctcag aaaagggtgt tcgcagtcct gtggcatgaa taacgagtc ctgacggctg 6480
ctttggcttg caagtgtga cgggctgacc ttgatttttt gtccagctta acgaacttca 6540
agtgccttgt atctgcttcg aatatgaaaa atgctgcccg ccagtcatt gaagcggcgt 6600
atgccaaggc cctgcgcaa gagtggcgt ctctagtcca gattgacaaa atgaaaggag 6660
ttttgtccaa actcgaggcc tttgtgaaa cagctactcc gtcccttgac ataggtgacg 6720
tgattgttct gcttgggcaa catccacacg gatctatcct tgatattaat gtggggactg 6780
agaggaaaac tgtgtccgtg caagagaccg ggagcctagg cggttccaaa ttcagtgttt 6840
gtactgtcgt gtctaacaca cccgtggacg ctttaaccgg catccactc cagacaccaa 6900
ccccctttt tgagaatggt ccgcgtcacc gcagcgaaga agacgatctt aaagtcgaga 6960
ggatgaagaa acactgtgtg tccctcggtt tccacaacat caatggcaaa gtttactgca 7020
agatttggga caagtcacc ggtgacacct tttaacagga tgattcccg tataccacg 7080
accatgctct tcaggacagg tcagccgact acagagacag ggactatgag ggtgtgcasa 7140
ccgcccccca acagggattt gatccaaagt ctgaaacccc tgtcggcact gttgtgatcg 7200
gcggtattac gtataacagg tatctgacta agggtaagga ggttctggtt cccaagccg 7260
acaattgect tgaagctgcc aagctgtctc ttgagcaagc tctcgtggg atgggcaaaa 7320
cttgcgacct tacagctgcc gaggtggaaa agttaagcg catcatcagt caactccaag 7380
gtttgaccac tgaacaggct ttaaaactgt agccgctagc ggcttgacct gctgtggccg 7440
cggcggttta gttgttactg aaacggcggg aaaaattgta agataccaca gcagaacttt 7500
caccttgggc ccttggacc taaaagtcgc ttctgagggt gaggtgaaga gatcaactga 7560

```

Српінка 19

gcagggccac gctgtgtggt caaacctatg ttctggtgtt gtattgatga gacctcaccc 7620
 accgtccctt gttgacgttc ttctgaaacc cggacttgac acaacacccg gcattcaacc 7680
 ggggcatggg gccgggaata tgggcgtgga cggttccatt tgggattttg aaaccgcacc 7740
 cacaaaggca gaactcgagt tgtccaagca aataatccaa gcattggaag tcaggcgccg 7800
 ggatgccccg aacctccaac tcccttaca gctctgtcca gttagggggg atcctgagcg 7860
 gcataaaggc cgccttatca ataccaggtt tggagatttg ccttacaaga ctctcaaga 7920
 caccaagtc gcaatccacg cggcttgtt cctgcacccc aacggggctc ccgtgtctga 7980
 tggtaaater acattaggca ccactcttca acacgggttc gagctttatg tccctactgt 8040
 gccctatagt gtrctggagt accttgattc acgcccgtac acccccttta tgtgtacca 8100
 acatggact cctgaggctg ctgcagagga ccttcgaaaa tatgacttat ccaccaagg 8160
 gtttgtcttg cctggggctc tacgtctagt acgcagattc atctttggcc atattggtaa 8220
 ggcaccgcca ctgttcttc catcaactta tcccgccaag aactctatgg cagggatcaa 8280
 tggccagagg ttcccaacaa aagacgttca gagcatacct gaaattgatg aaatgtgtgc 8340
 ccgcgtgtc aaagagaatt ggcaaacgtt gacgcttgc accctcaaaa aacagtattg 8400
 ttccaagcct aaaaccagga ccactcttgg taaccaaac ttcatgtcct tggctcacag 8460
 gtccgctc agcgggtgtc ctccagggtt catgaaaaaa gccctggaagt ccccgatgc 8520
 cttggggaaa aacaattta aggagttgca ctgcactgtc gccggtaggt gcctcgaggc 8580
 cgacttgccc tcttgtgac gcagacccc gcccatctg aggtgggttg ttgccaacct 8640
 cctgtacgaa cttgcgggtt gtgaagagta cttgccaaag tatgtgctca attgttgcca 8700
 tgacctgtg gcaacgcaaa atggcgctt cacaacacgt ggtggcctgt catctggaga 8760
 ccccgttacc agtgtgtcca acacagtgt ttacttggtg atttatgtc agcacatgg 8820
 gctgtcggct ttgaagatgg gtcatgaaat cggcctcaag ttcttcgagg aacagcttaa 8880
 gttcgaggac ctctcgaaa tccagcctat gttgggtat tctgatgacc ttgtattgta 8940
 tgetgaaaga cccaccttc ccaattacca ttgggtgggt gagraccttg acctgatgt 9000
 ggggttttaag acagacccaa aaaagactgt cataactgac aaaccagct ttcttggctg 9060
 tagaatcgaa gccggggcgac aactgggttc cagtccgac cgcatcttg ctgctcttgc 9120
 atatcacatg aaggcgagca acgctcaga gtattatgcg tctgctgccg cgattctgat 9180
 ggactcgtgt gcttgcatg accacgaccc tgagtgggtat gaggacctca tctgcggcat 9240
 tgcttgatgc gcccgccagg atggctacag ttcccaggc ccgctgttct tcatgtccat 9300
 gtgggagaag ctgaaaagtc acaatgaagg caagaaattc cgcactgtg gcatttgtga 9360
 cgccaaggcc gatcatgct cgcctgtgg gcttgattta tgtctgttcc actcgcactt 9420
 tcatcaacac tgcctgtta ctctgagctg cggccatcat gccggttcaa aagaatgcc 9480
 acagtgtcag tcacctgttg gagctggtaa atccccctt gatgcagtg tgaaacaaat 9540
 cccgtacaaa cccctcgtc ctgtcatcat gaagggtggc aataaaacaa cgaccttga 9600
 cccgggaagg tatcagtcct gtcgaggtct tgttctgtc aagaggggta ttgcaggcaa 9660

Стрiнка 20

tgagggtgat	ctcgctgatg	gagactatca	gggtggtgccc	cttttgccaa	cctgcaaaga	9720
cataaacatg	gtgaaggtgg	ctgtcaatgt	gctactcagc	aagttcatag	tggggccgcc	9780
agggtccggc	aagacgacct	ggctacigag	tcaagttcag	gatgatgatg	tcatctatac	9840
acctacccat	cagaccatgt	tcgacatagt	caatgcccct	aaagtctgta	ggtattccat	9900
cccagtggtc	tcagggctcc	ctttcccacc	gcccgccaga	tctggaccgt	gggttaggct	9960
cgttgctage	gggcacatcc	ctggccgaat	atcatacctt	gacgaggccg	gatattgcaa	10020
tcatctggat	attctcagac	tgctttctaa	gacacctctt	gtgtgtttgg	gtgaccttca	10080
gcaacttcac	cctgtcggtc	ttgactctta	ctgttatgtt	tttgatcaaa	tgcctcataa	10140
gcagctgacc	actatttata	gatttggccc	caatatctgt	tctgccattc	aaccttggtt	10200
cagggaaaaa	ctcgaatcta	agggcaggaa	cactaggggtg	gtttttactg	cccggcccg	10260
ggcttttgg	caggtgttga	cgccatatac	taaagaccgc	accggctcag	ctataaccat	10320
agattcatcc	cagggagcca	cttttgatgt	tgtgacgctg	catttgccgt	cgccagattc	10380
cctgaacaaa	tccrgggtc	ttgtagctat	cactcgggca	aggcatgggt	tgttcatcta	10440
tgacctcat	aaccaactcc	ggaagttttt	caacttaaca	cctgagcgca	ctgattgcaa	10500
cctcgtgttc	aaccgcgggg	acgagttggt	agttttgaat	gcagataatg	cagtcacgac	10560
tgtggttaag	gttttgagg	cgggcccgtc	tcggtttcga	gtatcagatc	caaggtgcaa	10620
gtctctttta	gccgcttgc	cggccagtct	ggaaggaggc	tgcatgccac	tgcgcgaagt	10680
ggcacataat	ctggggtttt	acttctctcc	agatagtcca	gcatttgcac	ctctgccaaa	10740
agagctggca	ccacattggc	cgtttgttac	tagtcagaac	aaccaggcat	ggcccggaccg	10800
acttgtcgct	agtatgcggc	cagttgatgc	ccgctacagc	aagcctatgg	tcggtgcagg	10860
gtatgtgggt	gggccatcca	ctttccttgg	cactcctgg	gtagtgtcat	actatctcac	10920
gctgtacatc	aggggtgagc	cccaggcctt	gccggagaca	ctcgtctcaa	cgggacgtat	10980
agctactgat	tgtcgagagt	atctcgacgc	agctgaggaa	gaagcagcta	aagaactccc	11040
tcacgcattc	attggcgatg	tcaaaggtag	tacagtgggg	gggtgtcacc	acattacgtc	11100
aaaataacctt	ccaggtcctt	tgcccgaagg	ctccgttgcc	gtggtcggag	tgagttcgcc	11160
cggcaagget	gccaaagccg	tgtgtactct	caccgatgtg	tatcttcccg	agctccgccc	11220
atatttgcaa	ccggaaacag	categaaatg	ctggaaactt	aaactagact	tcagggatgt	11280
cagactgatg	gtctggaaag	gagccaccgc	atatttccaa	ctggaggggc	tcacatggtc	11340
agcgtgccc	gactatgcc	ggttcattca	gctacccaaa	gatgccgttg	tgtacattga	11400
tccgtgcata	ggaccggcaa	cagccaaccg	taaggttgtg	agaactacag	attggcgagc	11460
tgacctggca	gtgacaccgt	acgactarcc	tgtctcagagc	attttgacta	cagcctgggt	11520
cgaggacctt	ggcccgagc	ggaagatttt	agggttgcaa	cccttcaagc	gggcatttgg	11580
ctttgaaaac	actgaggatt	gggcgatcct	tgcacgtcgc	atgaacgacg	gcaaggacta	11640
cactgactat	aactggaatt	gtgttcgaca	acgcccacat	gccatctaag	gacgtgcccc	11700

tgaccatacg	tatcaccttg	ccctggcac	tgaactgcaa	gtagagctag	gtaaaccctcg	11760
gctaccgect	gagcaagtac	cgtgaatcta	gagtgatgca	atggggtcac	tgtggagtaa	11820
aatcagtcac	ctgttcgtgg	atgccttcac	tgagttccct	gtagtggtgg	ttgatattgt	11880
catcttccct	gccatactgt	ttgggttcac	cgttgcaggg	tggttactgg	tctttttttt	11940
cagagtgggt	tgctccgcgc	ttctccgttc	gcgctctgcc	attcactctt	ccgaactate	12000
gaaggctcta	tgagggtctg	ctacctaat	gcagaccgga	tggtccacaa	ttcgcatcca	12060
agcaccctatt	gggtatgttt	tggcacatgc	gagtttccca	cttaattgac	gaaatgggtct	12120
ctcgccgcat	ttaccagacc	atggaacatt	caggtcaagc	ggcctggaag	caggtgggta	12180
gtgaagctac	tctcacaaaga	ctgtcaaagc	tcgacatagt	tctccacttc	caacacctgg	12240
ccgcaataga	ggcggattct	tgccgcttcc	tcagctcacg	acttggtgatg	ctgaaaaatc	12300
ttgtctgttg	caatatgagc	ctacagtaca	acaccacgtt	ggaccgctgt	gagctcatct	12360
tcccaacacc	aggtagcagg	cccaaatgga	ccgatttttag	acaatggctc	gtcagtggtc	12420
acgcttctat	tttttctct	gtggccctcat	cagttacctt	gttcatagtg	ctttggcttc	12480
gaattccagc	tctacgctat	gtttttgggt	tccattggcc	caaggcaaca	catcattcga	12540
gctaaccatc	aattactcta	tatgtaagcc	ctgtctcacc	agtcgaagcg	ctcgacaaag	12600
gtctgaaccc	ggctcgcaaca	tgtggtgcaa	aataggacac	accacgtgtg	aggagcgtga	12660
ccatgatgag	ttgtcaatga	ccattccgtc	cgggtacgat	aacctcaaac	ttgaggggta	12720
ttacgcttgg	ctggcttttt	tgtctttttc	ttacgcagcc	caatttcac	cagagttggt	12780
cgggaatagg	aatgtgtcac	gcgtcttcgt	ggataaacgg	caccagtcca	tctgtgccga	12840
gcacgacgga	caaaattcaa	ccgtatccac	cgaacataat	atttccgcat	tgtatgcggc	12900
gtactaccac	caccaggtag	acgggggcaa	ttggttccac	ctggaatggc	tgcggccttt	12960
cttttctctc	tggctagtac	tcaatatttc	atggtttctg	aggcgttcgc	ctgcaagccc	13020
tgittctcga	cgcatttacc	agatattgag	accaacacga	ccgcggctgc	cgggttcacg	13080
gtccttcagg	acatcaactg	ttccacagct	ggctcagagg	cacaaacgac	tggtcccatc	13140
agaaagtctg	cccaatgccg	tgaagccgtc	ggcactcccc	agtacatcaa	gataacggcc	13200
aatgtgaccg	acgaatcata	cttgtacaac	gcggacttgc	tgatgctttc	tgcgtgcctt	13260
ttctatgcct	cagagatgag	cgagaaaggc	tttaaagtca	tttttgggaa	tgtctctggc	13320
gttgtctccg	cttgtgtcaa	ttttacagat	tatgtggccc	atctgaccca	acataccag	13380
cagcatcatt	tggtaaccaa	tcacattcgg	tgtctacatt	tcctgacaec	atcagcaatg	13440
agggtgggcta	caaccattgc	ttgtttgttc	gccattctct	tggcgatatg	agatgttctc	13500
acaaatcggg	gtgtttcttg	actccgcact	cttgcttttg	gtgggttttt	ttgctgtgta	13560
ccggcttgtc	ctggctcttt	gccgatggca	acggcaacag	ctcgacatac	caatataat	13620
ataacttgac	gataatgcgag	ctgaatggga	ccgaatggct	gtccgaccat	tttaattggg	13680
cagtcgagac	ttttgtgctc	taccacagtg	cgactcatat	cctctcactg	ggtttccctca	13740
cgacaagica	tttcttgat	gcgttcggtc	ttggagctgt	gtcaattaca	gggtttttgtg	13800

Стрінка 22

```

gccccgcggtta cgtgctcagc agcgtgtacg gcgcttgtgc actagcagcg ctctgtatgtt 13860
ttgttatccg tgctgcaaaa aattgtatgg ctgcccgtta tgctcgtacc cggttttacca 13920
acttcatgtt ggatgaccgg gggagaatcc atcgggtggag gtcctcaata gtgggtggaaa 13980
aattaggtaa agctgacgtc ggcggcgacc ttgtcaccat caaacatgtc atcctcgaag 14040
gagtc aaagc tcaacccttg acgaggactt cggccgagca atgggaggcc tagataattt 14100
ctgcaacgat cccaccgccg caaaaaagct tgtgctagcc tttagcatca cgtatacacc 14160
catcatgata tacgccccta aggtgtcacg cggccgactc ttgggggtgt tgcacatctt 14220
gatatttctg aactgttctt tcacgttcgg atacatgaca tatatgcatt ttgaatccac 14280
caaccgtgtc gcgcttacca tggggggcgt tgtcgccctt ctgtggggcg ttatatgttt 14340
catagagtca tggaaattta tcacttccag atgcagattg tgttgccctag gccggcgata 14400
cattctggcc cctgcccacc acgtagaaag tctgcaggc ctccatccga tcccagcgtc 14460
tggttaacaa gcatacgtg tgagaaagcc cggactaaca tcagtgaacg gcactctggg 14520
accaggactt cgaggcctcg tctggggcg caaacgagct gttaaacgag gagtggttaa 14580
cctcgtcaag tatggccggt aaaaaccaga gccagaagaa aaagaaaaat ccagctccaa 14640
tggggaatgg ccagtcagtc aatcaactgt gccagctgct gggcacaaatg ataaagtcct 14700
agcggcagcg acccagggga ggacaggcta aaaagaaaaa gcctgagaag ccacatttcc 14760
ccctggctgc tgaagatgac gtcgggcacc atctcaccca gaccgagcgc tccctttgct 14820
tgcaatcgat ccagacggct tttaatcaag gcgcaggaaac tgcgtcgtt tcateccagc 14880
ggaagatcgg ttttcaggtt gagtttatgc taccggttgc tcatacagt cgcctgattc 14940
gcgtgacttc tacatccgcc ggtcaggatg caaattaatt tgatagtcag gtgaatggcc 15000
gcgattggcg tctggcctct ggtcaccta ttcaattagg gcgacacat gggggctaga 15060
cttaattagg caggaaacct gtgaccgaaa tt 15092

```

```

<210> 4
<211> 15092
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Ізолят 96V198 вірусу PRRS - пасаж 14

```

```

<400> 4
atgatgtgta ggggtattccc cctacatata cgacacttct agtgtttgtg tgccttggag 60
gcgtgggtat agccccgccc cactctcttg cccctgttct agcccaacag gtatcttct 120
ctctcggggc gagcgcgccg cctgtctct ccttgcagca ggaaggacct cccgagtatt 180
tccggagagc acctgcttta cgggactctc accctttaac catgtctggg acgttctccc 240
gggtgatgtg caccgccggt gcccggtat ttggagcgc cggccaagtc tattgcacac 300
gggtgtctcag tgcacggtct ctctctctc cggagcttca ggacactgac ctcgctgcaa 360
ttggcttgtt ttacaagcct aaagacaagc ttcactggaa agtccctatc ggcacccctc 420

```

```

agggtggagtg tactccgtcc ggggtgctgtt ggctctcagc catcttcccc ttggcgcgca      480
tgacctccgg caateacaac ttctccaac gacttgtgaa gggtgctgat gttttgtacc      540
gtgacggctg ctgggcacct cgacaccttc gcgaactcca agtttacgag cgcggctgca      600
actggtaccc gatcacgggg cccgtgcccg ggatgggttt gtacgcgaac tccatgcacg      660
tgtccgacca accgttccct ggtgccgctt atgtgttaac gaactcacct ctgcctcagc      720
aggcttgctg acagcrgttt tgtccatttg aggaggttca ttccgacgta tacagggtgga      780
agaaattcgt gatttttgtg gattccctct ctgacggcgg atctcgcctg atgtggacac      840
caggatccga cgactcggct gccttagaag tattgccacc tgaactagaa tgtcagatcg      900
aaatcctcgt tcggagtttt cctgcccacc accttgctga catcaccaac tgggagctca      960
ctgagtcccc tgagcacggg ttttcttcca gcacgtctca ttcttggtgt taccttgccc     1020
aagaccctga cgtgtttgat ggttaagtgt ggctttcttg ctttttgggc ctgccgaccg     1080
aagtgtggcg tcatgaggag catctagcta acgccttcgg ttaccaaac aagtggggcg     1140
tgcattggtaa gtacctccag cgcaggcttc aggtcccgcg catgcgtgct gtagttgatc     1200
ctgatggctc catccacgtt gaagcgtgtt ctggcccca gtcttggtatc aggcacctga     1260
ctctaaatga tgacgtcacc ccaggatttg ttgcctaac atccctcgc attgagccga     1320
acacagagcc tactacttcc cggatcttcc ggtttggagc gcataagtgg tatggcgctg     1380
ccggcaaacg ggctcgtgct aagcgtgccg ctaaagggtga gaagaattca gctcccaccc     1440
ccaaggctgc cctgccggtc cccacctatg gaattaccac ctacttcca ccgacagacg     1500
ggtcttggtg ttggcatgtc ctggccgcca taatgaaccg gatgataaat ggtgacttca     1560
cgtccccctt gactccgtac aacagaccag aggatgatg ggcttcigat tatgatcttg     1620
ctcaggcaat ccaatgtcta caactgcctg ctaccgtggt ccggagtcgc gccgtgtcca     1680
acgccaaagta cctcataaaa ctcaacggag tccactggga ggtagagggt aggtcaggaa     1740
tggctccctg ctctctttct cgtgaatgtg tgggtggcgt ttgctctgaa ggttggtgtg     1800
caccgcctta tccagcagac gggctaccag aacgagcact cgaggccttg gcgtctgctt     1860
acaggttacc ctctgattgt gttagctctg gcattgctga ctctcttgc aaaccactc     1920
ctcaggaatt ctggaccctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccagag cggctccggt     1980
tctctagttt gtataaatta ctattagagg ttgttccgca aaaatgcggg gccacggaag     2040
gggctttcgt ctatgctgtt gagagaatgt tgaaggattg tccgagctcc aaacaggcca     2100
tggcccttct ggcaaaaatt aaagttccat cctcaaaagg cccgtctgtg tcccttgacg     2160
agtgtttccc tacggatgtt tcagccgact tcgagccagc atctcaggaa agggcccaaa     2220
gttccgggtg tgctgttgtc ctgtgttcac cgggaagtaa agagtctgaa gaagcagccc     2280
cagaagaagt tcaagagagt ggccacaagg tcgcccgtc tgcatttgtt gccgaggytc     2340
ctaacaatga acaggtaccg atggctgccc gcgagcaact gaagcccggt ggtcgcgttt     2400
tggcgggtcgg gaatgctcat gaagggtgtc tggcctcaac tagttcgacc aacctgatag     2460
gcgggaactt ccccccttca gactccatga aagagagcat gctcaatagc tgggaagacg     2520

```

Сторінка 24

aaccactgga	tttgtcccaa	ccggcaccag	ctgttacaat	gacccitgtg	agagagcaaa	2580
cacccgacaa	ccrgggtcct	gatgccggtg	ccttccccgt	caccgttcga	aaattttgtcc	2640
cgacagggcc	tacactccgt	catgttgagc	actgcggcac	ggagtcaggc	gacagcagtt	2700
cgeccctgga	tctgtcttat	gcgcaaaccc	tggaccagcc	tttaaateta	tccttggccc	2760
cttggccagt	gagggccacc	gcgtctgacc	ctggctgggt	ccacggtagg	cgtgagccta	2820
tctttgtgaa	gectcgagat	gctttctctg	acggcgattc	agcccttcag	ctcggggagc	2880
tgtctgaatc	cggctccgic	atcgagtttg	acgggacaag	aaatgctccg	gcggctgacg	2940
ccccctgtga	cttgacggct	tcgaacaagg	ccctctctgt	ggttgatcct	ttcgaatttg	3000
ccgaactcaa	gcgcccgcgt	ttttccgac	aagccttaat	tgaccgaggc	ggtccacttg	3060
ccgacgtcca	tgcaaaaata	aagaaccggg	tatatgaaca	gtgcctccag	gcttgtgagc	3120
ctggcagtcg	cgcaacccca	gccaccaaga	agtggctcga	taaaatgtgg	gataggggtg	3180
acatgaagac	ttggcgctgt	acctcgagat	tccaagctgg	tcgcatctct	gcgtccctta	3240
aattccctcc	tgacatgatt	caggacacac	cacctctctg	ccctttcaaa	accggttggg	3300
ccaacacttg	accaaattgt	cccttcgccc	acgggtaccc	agcaagaaga	tgtcacttcc	3360
tccgatgggc	catctcatgc	gccggatcct	cctagtcgaa	tgagcacgag	tgggagttgg	3420
aagggccctg	tgtctctctg	taccggtctc	gcgggggtcca	ttagtcagca	tttcatgaca	3480
tgggtttttg	aggttttttc	ccatctccca	gcttttgac	tcacactttt	ctcggccagg	3540
ggctctatgg	cttcaggtga	ttggatgttt	gcaggtgttg	ttttacttgc	tctcctgtct	3600
tgtcgttctt	accagatatt	cgggtgcctt	cccttatttg	gtgtcctttc	tggctctgtg	3660
cggcgcggtc	gtctgggggt	ttttgggtct	tggatggctt	tcgtgttatt	tttattctcg	3720
actccatcca	accagtcggg	ttcttcttgt	gaccacgatt	cggcggagtg	tcagtctgag	3780
cttttggtct	ttgagcagcg	ccaactttgg	gaacctgtgc	gcggccttgt	ggtcggcccc	3840
tcgggctctt	tatgtgtcat	tcttggcaag	ctactcggtg	ggtcacgtta	tcctctggcat	3900
gttttcttac	gtttatgcat	gcttgagat	ttggcccttt	ctcttgttta	tgtgggtgtcc	3960
caggggcgtt	gtcacaagtg	ttggggaaag	tgtataagaa	cagctccggc	ggaggtggct	4020
ctcaatgtgt	tccctttctc	gcgcgctacc	cgtagctctc	ttgtgtcctt	gtgcgatacg	4080
ttccaagcgc	caaaaggggt	tgatcctgtg	tacttggcaa	cgggttggcg	cgggtgttgg	4140
tgtgggtgaga	gtcccaattca	tcaaccgcac	caaaaaccca	tagcttatgc	taatctggat	4200
gaaaagaaaa	tatctgccca	aacgggtggt	gctgtcccac	acgatcccag	tcaggccatc	4260
aagtgcctga	aagtttttga	ggcgggagga	gccatcggtg	accagcccac	acctgaggtc	4320
gtccgtgtat	ccgaaatccc	cttctcagcc	ccatttttcc	caaaagttec	agtcaaccca	4380
gattgtaagg	ttgtgggtga	ttcggacact	tttgtggctg	cggttcgctg	cggctactcg	4440
acagcacaa	tggtcttagg	ccagggcaac	tttgccaagt	taaatcagat	tccctcagg	4500
agctctatct	ccaccaaaag	gattggcggg	gcctcttaca	cccttgcctg	ggctcaagtt	4560

tcctgtgtgga	ctcttgttca	cttcacccctc	ggcttttggg	tcaagtcacc	ccaagtgtgt	4620
ggccgaggaa	ccctctgactc	atggtgtttca	aatccctttt	cataccctac	ctatggcccc	4680
ggggttgtgt	gtccctctcg	actttgtgtg	tctgccgacg	gggtcactct	accattgttc	4740
tcagccgttg	ctcaactctc	cggtagagag	gtggggattt	ttattttggg	actcgtctcc	4800
ttgatggctt	tggccaccg	catggccctt	aaggcagaca	tgttgatggt	ctttctggct	4860
ttttgtgctt	acgcctggcc	catgagctcc	tggttgattt	gcttctttcc	tacactcttg	4920
aagtgggtta	ccctccacc	tcttactatg	ctttgggtgc	actcattctt	ggtgttttgt	4980
ctgccagcag	cgggcaccc	ctcactaggg	ataactggcc	ttctttgggc	ggttggccgc	5040
tttactcagg	ttgccggaat	tattacacct	tatgacatcc	accagtacac	ctctgggcca	5100
cgtggcgctg	cagctgtggc	cacagcccca	gaaggcactt	atatggccgc	cgtccggaga	5160
gctgctttaa	ctgggcgaac	tttaattctt	accccgctcg	cagttggatc	cttctctgaa	5220
ggagctttca	ggactcataa	accttgictt	aacaccgtaa	atggtgtagg	ctcttccctt	5280
ggttccggcg	gggttttcac	tattgacggc	agaaaaattg	ttgtcactgc	tgcccatgtg	5340
ttgaacggcg	acacagctag	agtcaccggc	gactcctaca	accgcatgca	tactttcaag	5400
accaatggtg	attatgectg	gtcccatgct	gatgactggc	ggggcgtrgc	ccctgcggtc	5460
aaggttgcga	aggggtaccg	cggctgtgcc	tactggcaaa	catcaactgg	cgtcgaaacc	5520
ggtgttattg	gggaagggtt	cgccttctgt	ttcaccacct	gtggcgattc	ggggtcacc	5580
gtcatctcag	aatccgggtg	tctcattgga	atccataccg	gttcaaataa	acttgggtct	5640
ggtcttgtga	caacccttga	aggggagaca	tgtaccatca	aagaaaccaa	gtctcttgac	5700
ctctccagac	atttcgagg	cccaagcgtt	ctcttgggg	atattaaatt	gagtcagcc	5760
atcatccctg	atataacatc	cattccgagt	gacttggcat	cgtctctatc	ctccgtccct	5820
gtagtggaa	gcggcctctc	gaccgttcaa	cttttgtgtg	tcttttccct	actttggcgc	5880
atgatgggcc	atgcctggac	tccattgttt	gccgtgggtt	tcttttact	gaatgaaatt	5940
cttccagcag	ttttgggtcc	agccgtgttt	tcttttgac	tttttgtgct	tgcattgggc	6000
accccttgg	ctgcacaggt	gttgatgatt	agactcctca	cggcatctct	caaccgcaat	6060
aagctttctc	tggcgttcta	cgcactcggg	ggggctcgtc	gtttggccgc	tgaatcggg	6120
acttttgtct	gcaaattgcc	tgaattgtct	caaaccctt	cgacatactg	cttcttacct	6180
agggtccttg	ctatgaccag	tttgttccc	accatcatca	ttggtggact	ccatgccttc	6240
ggtgttaattc	tgtggttgtt	caaataccgg	tgcctccaca	acatgctcgt	tggatggg	6300
agtttttcaa	gcgccttctt	cctacggtat	tttgcagagg	gtaatctcag	aaaagggtgt	6360
tcgcagtcct	gtggcatgaa	taatgagtc	ctgacggctg	ctttggcttg	caagttgtca	6420
cgggctgacc	ttgattttt	gtccagctta	acgaacttca	agtgccttgt	atctgcttcg	6480
aatatgaaaa	atgctgccgg	ccagtacatt	gaagcggcgt	atgccagggc	cctgcgcaa	6540
gagttggcgt	ctctagtcca	gattgacaaa	atgaaaggag	ttttgtccaa	actcgaggcc	6600
tttgcgaaa	cagctactcc	gtccttgac	ataggtgacg	tgaattgtct	gcttgggcaa	6660

CropsHKA 26

catccacacg gatctatcct tgatattaat gtggggactg agaggaaaac tgtgtccgtg	6720
caagagaccc ggagccctagg cggttccaaa ttcagtgttt gtactgtcgt gtctaacaca	6780
cccggtggacg ccttaaccgg catcccactc cagacaccaa cccctctttt tgagaatggt	6840
ccgcgtcatc gcagcgaaga agacgatctt aaagtcgaga ggatgaagaa acactgtgtg	6900
ccccctgggt tccacaacat caatggcaaa gtttactgca agatttggga caagtcacc	6960
ggtgacacct ttacacgga tgattcccgg tataccacg accatgctct tcaggacagg	7020
tcagccgact acagagacag ggactatgag ggtgtgcaaa ccgccccca acagggattt	7080
gatccaaagt ctgaaacccc tgcggcact gtgtgtatcg gcggtattac gtataacagg	7140
tatctgacta agggtaagga ggtctgggt cccaagccc acaattgctt tgaagctgcc	7200
aagctgtctc ttgagcaagc tctcgctggg atggggcaaa cttgcgacct tacagctgcc	7260
gaggtggaaa agttaagcg catcatcagt caactccaag gtgtgaccac tgaacaggct	7320
ttaaaactgct agccgctagc ggcttgacce gctgtggccg cggcggctta gttgttactg	7380
aaacggcggg aaaaattgta agataccaca gcagaacttt caccrtgggc cctttggacc	7440
taaaagtcgc ttctgagggt gaggtgaaga gatcaactga gcagggccac gctgttgtgg	7500
caaaccctatg ttctgggtgt gtattgatga gacctcacc accgtccctt gttgacgttc	7560
ttctgaaacc cggacttgac acaacacccg gcattcaacc ggggcatggg gccgggaata	7620
tgggcgtgga cgggtccatt tgggattttg aaaccgcacc cacaaggca gagctcgagt	7680
tgtccaggca aataatccaa gcatgtgaag tcaggcgcgg ggatgccccg aacctccaac	7740
tcccttaciaa gctctgtcca gttagggggg atcctgagcg gcataaaggc cgccttatca	7800
ataccagggt tggagatttg ccttacaaga ctctcaaga caccaagtc gcaatccacg	7860
cggcttggtg cctgcacccc aacggggctc cgtgtgtgta tggtaaatcc acattaggca	7920
ccactcttca acacgggttc gagctttatg tccctactgt gccctatagt gtcattgggt	7980
accttgattc acgcccctgac acccccttta tgtgtacca aacatggtacc cccgaggctg	8040
ctgcagagga ccttcgaaaa tatgacttat ccacccaagg gtttgtcctg cctggggctc	8100
tacgtctagt acgcagattc atctttggcc atatttgtaa ggcaccgcca ctgttctctc	8160
catcaactta tcccgccaag aactctatgg cagggatcaa tggccagagg tccccacaa	8220
aagacgttca gagcatacct gaaattgatg aaatgtgtgc ccgcgctgtc aaagagaatt	8280
ggcaaaactgt gacgccttgc accctcaaaa aacagtattg ttccaagcct aaaaccagga	8340
ccatccttgg taccaacaac ttcattpcct tggttcacag gtcggcactc agcgggttca	8400
ctcaggcggt catgaaaaaa gcctggaagt ccccgatgc cttggggaaa aacaaattta	8460
aggagtgtca ctgcactgtc gccggtaggt gccctgaggc cgacttggcc tcttgtgatc	8520
gcagaccccc ggccatcgtg aggtgggttt ttgccacct cctgtacgaa cttgcgggtt	8580
gtgaagagta cttgccaaac tatgtgttca attgttgcca tgacctggtg gcaacgcaaa	8640
atggcgccct caaaaaacgt ggtggcctgt catctggaga ccccgttacc agtgtgtcca	8700

Сторінка 27

```

acacagtgtt ttcactggtg atttatgtct agcacatggt gctgtcggct ttgaagatgg 8760
gtcatgaaat cggccctcaag ttctctgagg aacagcttaa gtctgaggac cttctcgaag 8820
tccagcctat gttggtatat tctgatgacc ttgtattgta tgctgaaaga cccaccttcc 8880
ccaattacca ttggtgggtt gagcaccttg acctgatgct gggttttaag acagacccaa 8940
aaaagactgt cataactgac aaacccagct ttcttggtct tagaatcgaa gctggggcgac 9000
aactgggtcc cagtcggcag cgcattcttg ctgctcttgc atatcacatg aaggcgagag 9060
acgcctcaga gtattatgct tctgctgcgg cgattctgat ggactcgtgt gcttgcatg 9120
accacgatcc tgagtgggtat gaggacctca tctgcggcat tgctcgatgc gcccgcagg 9180
atggctacag tttcccaggc ccgcggttct tcatgtccat gtgggagaag ctgaaaagtc 9240
acaatgaagg caagaaattc cgccactgtg gcatttgta cgccaaggcc gatcatgcgt 9300
ccgcccgtgg gcttgattta tgtctgttcc actcgcactt tcatcaacac tgccctgta 9360
ctctgagctg cggccatcat gccggttcaa aagaatgccc acagtgtcag tcacctgtg 9420
gagctggtaa atccccctt gatgcagtg tgaaacaaat cccgtacaaa cccccctg 9480
ctgtcatcat gaagggtggc aataaaacaa cgaccttga cccgggaagg tctcagtc 9540
gtcaggtctt tgttctgtc aagaggggtt ttgcaggcaa tgaggttgat ctctctgatg 9600
gagactatca ggtggtgccc cttttgcaa cctgcgaaga cataaacatg gtgaagggtg 9660
ctgtcaatgt gctactcagc aagttcatag tggggccgcc aggttccggc aagacgacct 9720
ggctactgag tcaagttcag gatgatgatg tcatctatac acctacccat cagaccatgt 9780
tcgacatagt caatgccctc aaagtctgta ggtattccat cccagtggct tcagggtccc 9840
ctttccacc gcccgccaga tctggaccgt gggttaggct cgttctagc gggcacatcc 9900
ctggccgaat atcatacctt gacgaggccg gatattgcaa tcatctggat attctcagac 9960
tgctttctaa gacacctctt gtgtgtttgg gtgacctca gcaacttcac cctgtcggct 10020
ttgacctta cgttatgtt ttgtatcaca tgccctataa gcagctgacc actatttata 10080
gatttggccc caatatctgt tctgccattc aacctgtta cagggaaaaa ctccaatcta 10140
aggccaggaa cactagggtg gtttttactg cccggccggt ggcttttggc caggtgttga 10200
cgccatatca taaagaccgc accggctcag ctataaccat agattcatcc cagggagcca 10260
ccittgatgt tgtgacgctg catttgccgt cgcragattc cctgaacaaa tcccgggtc 10320
ttgtagctat cactcgggca aggcattgggt tgttcatcta tgacctcat aaccaactcc 10380
ggaagtttt caacttaaca cctgagcgca ctgattgcaa cctcgtgttc aaccgcgggg 10440
acgagttggt agttttgaat gcagataatg cagtcacgac tgtggctaag gttctggagg 10500
cgggcccgtc tcggtttcga gtatcagatc caaggtgcaa gtctctttta gccgcttgc 10560
cggccagtet ggaaggaggc tgcattgccac tgccgcaagt ggcacataat ctggggtttt 10620
acttctctcc agatagtcca gcatttgcac ctctgcaaaa agagctggca ccacattggc 10680
cggttgttac tagtcagaac aaccaggcat ggcgcgaccg acttgctgct agtatcgggc 10740
cagttgatgc ccgctacagc aagcctatgg tcggtgcagg gtatgtggtt gggccatcca 10800

```

Сторінка 28

ctttcccttgg	cactcctggg	gtgggtgcat	actatctcac	gctgtacatc	aggggtgagc	10860
cccagggcctt	gccggagaca	ctcgtctcaa	cgggacgtat	agctactgat	tgtcgagagt	10920
atctcgacgc	agctgaggaa	gaagcagcta	aagaactccc	tcacgcattc	attggcgatg	10980
tcaaagggtac	tacagtgggg	gggtgtcacc	acattacgtc	aaaatacctt	cccaggtcct	11040
tgcccaaggga	ctccgttgcc	gtggtcggag	tgagttcgcc	cggcaaggct	gccaaagccg	11100
tgtgtactct	caccgatgtg	tatcttcccg	agctccggcc	atatttgcaa	ccggaacag	11160
catcgaaatg	ctggaaactt	aaactagact	tcagggtatg	cagactgatg	gtctggaaag	11220
gagccaccgc	atatttccaa	ctggaggggc	tcacatggtc	agcgcctgcc	gactatgcc	11280
ggttcattca	gctacaaaa	gatgccgtg	tgtacattga	tccgtgcata	ggaccggcaa	11340
cagccaaccg	taagggttgtg	agaactacag	attggcgagc	tgacctggca	gtgacaccgt	11400
acgactacgg	tgtcagagc	attttgacta	cagccctggt	cgaggacctt	gggcccragt	11460
ggaagatttt	agggttgcaa	cccttcaagc	gggcatttgg	ctttgaaaac	actgaggatt	11520
gggcgactct	tgcacgtcgc	atgaacgacg	gcaaggacta	cactgactat	aactggaatt	11580
gtgttcgaca	acgcccacat	gccatctacg	gacgtgcccc	tgaccatacg	tatcactttg	11640
ccccctggc	tgaactgcaa	gtagagctag	gtaaacctcg	gctaccgect	gagcaagtac	11700
cgtgaatcta	gagtgatgca	atggggtrac	tgtggagtaa	aatcagtc	ctgttcgtgg	11760
atgccctcac	tgagttccct	gttagtggtg	tgtatattgt	catcttctct	gcatactgt	11820
ttgggttcac	cgttgcaggg	tggttactgg	tctttttttt	cagagtgggt	tgtcccgcc	11880
ttctccgttc	gcgctctgcc	attcactctt	ccgaactatc	gaaggctcta	tgagggtttg	11940
ctacctaat	gcagaccgga	tgttccacaa	ttcgcatcca	agcaccctat	gggtatgttt	12000
tggcacatgc	gagtttccca	cttaattgac	gaaatgggtc	ctcgccgc	ttatcagacc	12060
atggaacatt	caggtcaagc	ggcctggaag	caggtgggta	gtgaagctac	tctcacaaga	12120
ctgtcaaagc	tcgacatagt	tctccacttc	caacacctgg	ccgcaataga	ggcggattct	12180
tgccgcttc	tcagctcacg	acttgtgatg	ctgaaaaatc	ttgctgttgg	caatatgagc	12240
ctacagtaca	acaccacgtt	ggaccgcgtt	gagctcatct	tcccaacacc	aggtacgagg	12300
cccaaattga	ccgattttag	acaatggctc	gtcagtggtc	acgcttctat	tttttctct	12360
gtggcctcat	cagttaccct	gttcatagt	ctttggcttc	gaatttcagc	tctacgctat	12420
gttttttggt	tccattggcc	cacggcaaca	catcattcga	gctaaccatc	aattactcta	12480
tatgtaagcc	ctgtctcacc	agtcaagcgg	ctcgacaaag	gctcgaaccc	ggtcgcaaca	12540
tgtggtgcaa	aatagggcac	accacgtgtg	aggagcgtga	ccatgatgag	ttgtcaatga	12600
ccattccgtc	cgggtacgat	aacctcaaac	ttgagggtta	ttacgcttgg	ctggcttttt	12660
tgtctctttc	ttacgcagcc	caatttcac	cagagttggt	cgggaatagg	aatgtgtcac	12720
gcgtcttcgt	ggataaacgg	caccagttca	tctgtgccga	gcacgacgga	caaaattcaa	12780
ccgtatccac	cgaacataat	atttccgc	tgatgcggc	gtactaccac	caccaggtag	12840

Сторінка 29

acggggggcaa ttgggtccac ctggaatggc tgcggccctt ctittctcc tggctagtag 12900
 tcaatatctc atgggttctg aggcgttcgc ctgcaagccc tgtttctcga cgcatttacc 12960
 agatatrgag accaacaaga ccgcggtcgc cggtttcatg gtccctcagg acatcaactg 13020
 tttccacagt ggctcagagg cacaacgac tggteccatc agaaagtcgt cccaatgccg 13080
 tgaagccgic ggcaactccc agtacatcaa gataacggcc aatctgaccg acgaatcata 13140
 cttgtacaac gcggacttgc tgatgctttc tgcgtgcctt ttctacgcct cagagatgag 13200
 cgagaaaggc tttaaagtca tttttgggaa tgcctctggc gtgtctccg cttgtgtcaa 13260
 ttttacagat tatgtggccc atctgaccca acatacccag cagcatcatt tggtaaccaa 13320
 tcacattcgg ttgtacatt tctgacacc atcagcgatg aggtgggcta caaccattgc 13380
 ttgtttgttc gccattctct tggcgatatg agatgttctc acaaatcggg gtgtttcttg 13440
 actccgcact cttgcttttg gtggtttttt ttgctgtgta ccggcttgc ctggctcttt 13500
 gccgatggca acggcgacag ctgcacatcc caatatatat ataactgac gatagcgag 13560
 ctgaatggga ccgaatggct gtctgacatc ttaattggg cagtcgagac tttgtgtctc 13620
 taccagtggt cgactcatat cctcactg ggtttctca cgacaagtca tttcttgat 13680
 gcgttcggc ttggagctgt gtcaattaca gggttttgtg gcgggcggta cgtgctcagc 13740
 agcgtgtacg gcgttgtgc actagcagcg ctctgtatgt ttgttatecg tctgcccata 13800
 aattgtatgg cttgcgcta tgcctgtacc cggtttacca acttcattgt ggatgaccgg 13860
 gggagaatcc atcgggtggg gtctccaata gtggtggaaa aattaggtaa agctgacgic 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 gataattctg aactgttctt 14160
 tcacgttcgg atacatgaca tatatgcatt ttgaatccac caaccgtgic gcgcttacca 14220
 tggggggcgt tgtcgccctt ctgtggggcg ttatagttt catagagtca tgggaagtta 14280
 tcacttccag atgcagattg tgtgcctag gccggcgata cattctggcc cctgcccacc 14340
 acgtagaaag tctgcagggc ctccatccga tcccagcgtc tggtaaccaa gcatacgtc 14400
 tgagaaagcc cggactaaca tcagtgaacg gcactctggt accaggactt cgaggcctcg 14460
 tgctgggcgg caaacgagct gttaaacgag gagtgggtta cctcgtcaag tatggccggt 14520
 aaaaaccaga gccagaagaa aaagaaaaat ccagctccaa tgggggaatgg ccagtcagtc 14580
 aatcaactgt gccagctgct gggcacaatg ataaagtccc agcgccagcg acccagggga 14640
 ggacaggcta aaaagaaaaa gcctgagaag ccacatttcc ccctggctgc tgaagatgac 14700
 gtccggcacc atctaccca gaccgagcgc tccctttgct tgcaatcgat ccagacggct 14760
 tttaatcaag gcgcaggaac tgcgtcgctt tcatccagcg ggaagatcgg ttttcagggt 14820
 gagtttatgc taccggttgc tcatcacgtg cgcctgatic gcgtgacttc tacatccgcc 14880
 ggtcaggatg caaattaatt tgatagtcag gtgaatggcc gcgattggcg tgtggcctct 14940

Crepinika 30

```

gagtcaccta ttcaattagg gcgacacat gggggtcaga ctttaattagg caggaaccat 15000
gtgaccgaaa ttccctagga agaatcgggc tagtgataat gccggccctga agcgactggg 15060
ggcgagtggt gacagaaaaat tgagtgcac cc 15092

```

```

<210> 5
<211> 15092
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Ізолят 96V198 вірусу PRRS - пасаж 49

```

```

<400> 5
atgatgtgta ggggtattccc cctacataca cgacacttct agtggttgtg tgccttggag 60
gcgtgggtat agccccggcc caccctcttg cccctgttct agcccaacag gtatccttct 120
ctctcggggc gagcgcggcc cctgtgtctc ccttgagca ggaaggacct cccgagtatt 180
tccggagagc acctgcttta cgggactctc accctttaac catgtctggg acgttctccc 240
gggtgcatgtg caccctgggt gcccggtat ttggagcgc cggccaagtc tattgcacac 300
gggtgtctcag tgcacggctt ctctctctc cggagcttca ggacactgac ctgcgtgcaa 360
ttggcttgtt ttacaagcct aaagacaagc ttacttggaa agtccctatc ggcattccct 420
agggtgagtg tactccgtcc ggggtgtgtt ggctctcagc catcttcccc ttggcgcgca 480
tgacctccgg caatcacaac ttctccaac gactgttgaa ggttgctgat gttttgtacc 540
gtgacggctg cttggcacct cgacaccttc gcgaactcca agtttacgag cgcggctgca 600
actgggtacc gatcacgggg cccgtgcccg ggtatgggtt gtacgcgaac tccatgcag 660
tgtccgacca accgttcccc ggtgccgctt atgtgttaac gaactcacct ctgccctcagc 720
aggcttgcgc acagccgtt ttgtccattg aggaggttca ttccgacgta tacagggtga 780
agaaattcgt gatttttgtg gattctctt ctgacggcgc atctcgcag atgtggatc 840
caggatccga cgactcgggt gccttagaag tattgccacc tgaactagaa tgtcagatcg 900
aaatcctcgt tgggagtttt cctgcccacc accctgtcga catcaccaac tgggagctca 960
ctgagtcctc tgagcacggt ttctcttca gcacgtctca ttcttgtggt taecttgccc 1020
aagaccttga cgtgtttgat ggttaagtgt ggctttcttg ctttttgggc ctgccgaccg 1080
aagtgtggcg tcatgaggag catctagcta acgccttcgg ttaccaaac aagtggggcg 1140
tgcatggtaa gtacctccag cgcaggcttc aggtccgagg catgcgtgct gtagttgac 1200
ctgatggtec catccacgtt gaagcgtgtt cttgccccca gtcttggatc aggcacctga 1260
ctctaaatga tgacgtcacc ccaggatttg ttgcctaac atcccttcgc attgagccga 1320
acacagagcc tactacttct cggatcttct ggtttggagc gcataagtgg tatggcgtg 1380
ccggcaaacc ggctcgtgct aagcgtgccc cttaaaggta gaagaattca gctccacccc 1440
ccaaggtcgc cctgccggtc ccacctatg gaattaccac ctactctcca ccgacagacg 1500
ggctctgtgg ttggcatgtc cttgccgcca taatgaaccg gatgataaat ggtgacttca 1560

```

Стрiнка 31

cgtccccctt gactccgtac aacagaccag aggatgattg ggcttctgat tatgatcctg 1620
 ctcaggcaat ccaatgtcta caactgcctg ctaccgtggg cggaggtcgc gcctgtccca 1680
 acgccaagta ctcataaaa ctcaacggag tccactggga ggtagagggt aggtcaggaa 1740
 tggctcctcg ctctctttct cgtgaatgtg tgggtggcgt ttgctctgaa ggttgtgttg 1800
 caccgcctta tccagcagac gggctaccag aacgagcact cgaggccttg gcgtctgctt 1860
 acaggttaac ctctgattgt gttagctctg gcattgctga cttctcttgc aaccacctc 1920
 ctcaggaatt ctggaccctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccagag cgggtccggct 1980
 tctctagttt gtataaatta ctattagagg ttgttccgca aaaatgcggg gccacggaa 2040
 gggctttcgt ctatgctgtt gagagaatgt tgaaggattg tccgagctcc aaacaggcca 2100
 tggcccttct ggcaaaaatt aaagtcccat cctcaaaggc cccgtctgtg tcccttgacg 2160
 agtggttccc tacggatgtt tcagccgact tcgagccagc atctcaggaa aggcctccaa 2220
 gttccgggtc tgcgtttgtc ctgtgttcac cggaaagtaa agagttcgaa gaagcagccc 2280
 cagaagaagt tcaagagagt ggccataagg tcgcccgcct tgcatttgtt gccgagggct 2340
 ctaacaatga acaggtagct atggctgccg gcgagcaact gaagcccggg ggtcgcgttt 2400
 tggcggctcg gaatgctcat gaagggtgtt tggcctcaac tagttcgacc aacctgatag 2460
 gcggggaact ccccccttca gactccatga aagagagcat gctcaatagc tgggaagacg 2520
 aaccactgga ttgttccaa ccggcaccag ctgttacaat gacctttgtg agagagcaaa 2580
 caccgcagaa cctgggtcct gatgccgggt ccttccccgt caccgttcga aaatttgtcc 2640
 cgacagggcc tacaertcgt catgttgagc actgcggcac ggagtcaggc gacagcagtt 2700
 cgcccttgga tctgtcttat gcgcaaaccc tggaccagcc tttaaatcta tccctggccg 2760
 cttggccagt gaggggccacc gcgtctgacc ctggctgggt ccacggtagg cgtgagccta 2820
 tctttgtgaa gccctgagat gctttctctg acggcgattc agcccttcag ctgggggagc 2880
 tgtctgaatc cggctccgtc atcgagttg accggacaag aaatgctccg gcggtcgacg 2940
 cccctgttga ctgacggct tcgaacaagg cctctctgtt ggttgatcct ttcaatttg 3000
 ccgaactcaa gcgcccgcgt ttttccgcac aagccttaat tgaccgaggc ggtccacttg 3060
 ccgacgtcca tgcaaaaata aagaaccggg tatatgaaca gtgcctccag gcttgtgagc 3120
 ctggcagtcg cgcaccccca gccaccaaga agtggctcga taaaatgtgg gatagggtgg 3180
 acatgaagac ttggcgtctg acctcgagc tccaagctgg tcgcattctt gcgtccctta 3240
 aattcctccc tgacatgatt caggacacac cactcctgtt tcttaggaag aatcgggcta 3300
 gtgataatgc cggcctgaag cgactgggtg cgagtgaggc cagaaaattg agtgcaaccc 3360
 ccccttcaaa accggttgga ccaacacttg accaaattgt ccttcgccc acgggtaccc 3420
 agcaagaaga tgtcacttcc tccgatgggc catctcatgc gccggatcct cctagtcgaa 3480
 tgagcaagag tgggagttgg aagggccttg tgcctctctg taccgtctc ggggggtcca 3540
 ttagtcagca ttcatgaca tgggtttttg aggtttctc ccatctccca gcttttgac 3600
 tcacactttt ctgcgcgagg ggctctatgg cttcaggtga ttggatgttt gcagggtgtg 3660

Cpovinka 32

```

ttttacttgc tctcctgctc tgcgttctt acccagtatt cgggtgcctt cctttattgg 3720
gtgtcctttc tggctctgtg cggcgcttc gtctgggggt ttttggttct tggatggctt 3780
tcgctgtatt tttattctcg actccatcca acccagtcgg ttcttcttgt gaccacgatt 3840
cgccggagtg tcatgctgag cttttggctc ttgagcagcg ccaactttgg gaacctgtgc 3900
gcggccttgt ggtcggcccc tcgggcctct tatgtgtcat tcttggcaag ctactcggty 3960
ggteacgtta tctctggcat gtittcttac gtttatgcat gcttgagat ttggcccttt 4020
ctcttgitta tgtggtgtcc caggggctt gtcacaagt ttggggaaag tgtataagaa 4080
cagctecggc ggaggtggct ctcaatgtgt tccctttctc gcgcgctacc cgtagctctc 4140
ttgtgtctt gtgcgacgg tccaagcgc caaaaggggt tgatctgtg tacttggcaa 4200
cgggttggcg cgggtgttgg tgtggtgaga gtccattca tcaaccgac caaaaacca 4260
tagcttatgc taatctggat gaaaagaaaa tatctgcccc aacgggtggt gctgtcccac 4320
acgatcccag tcaggccatc aagtgcctga aagttttgca ggcgggagga gccatcgtgg 4380
accagcccac acctgaggtc gtccgtgtat ccgaaatccc cttctcagcc ccattttcc 4440
caaaagtccc agtcaacca gattgtaagg ttgtggtgga ttcggacact tttgtggctg 4500
cggttcgctg cggctaectg acagcacaac tgggtctagg ccagggaac ttgccaagt 4560
taaatcagat tccccacagg agctctatct ccaccaaac gattggcggg gcctcttaca 4620
cccttgcgtg ggtcaagtt tctgtgtgga ctcttgttca cttcatctc ggtctttgg 4680
tcacgtcacc ccaagtgtgt ggccgaggaa cctctgactc atggtgttca aatcctttt 4740
cataccctac ctatggcccc ggggttgtgt gctcctctc actttgtgtg tctgccgacg 4800
gggtcactct accattgttc tcagccgtgg ctcaactctc cggtagagag gtggggattt 4860
ttattttggg actcgtctcc ttgatggctt tggcccaccg catggccctt aaggcagaca 4920
tgttgatggt cttctgtggt ttttgtgctt acgcctggcc catgagctcc tggttgattt 4980
gtttctttcc tacactcttg aagtgggtta cctccaccc tcttactatg ctttgggtgc 5040
actcattctt ggtgttttgt ctgccagcag ccggcatctc ctactaggg ataactggcc 5100
ttcttggggc ggttggccgc ttactcagg ttgcgggaat tattacacct tatgacatcc 5160
accagtacac ctctgggcca cgtggcgtg cagctgttgc cacagcccca gaaggcaett 5220
atatggccgc cgtccggaga gctgctttaa ctgggcgaac tttaatctc acccgtctg 5280
cagttggatc ccttctcgaa ggagctttca ggactcataa accttgtctt aacaccgtaa 5340
atgttgtagg ctcttccctt ggttccggcg gggttttcac tattgacggc agaaaaattg 5400
ttgtcactgc tgcccatgtg ttgaacggcg acacagctag agtcaccggc gactcctaca 5460
accgcatgca tactttcaag accaatggtg attatgcctg gtcccatgct gatgactggc 5520
ggggcgttgc cctgcgggtc aaggttgcga aggggtaccg cggctgtgcc tactggcaaa 5580
catcaactgg cgtcgaacce ggtgttattg gggaagggtt cgccttctgt ttaccacct 5640
gtggcgattc ggggtcaccc gtcatctcag aatcgggtga tctcatggga atccataccg 5700

```

```

gttcaaataa accttggttct ggtcttgtga caaccctga aggggagaca tgtaccatca 5760
aagaaaccaa gctctctgac ctctccagac atttcgcagg cccaagcggt cctcttgggg 5820
atattaaatt gagtccagcc atcatccctg atataacatc cattccgagt gacttggcat 5880
cgctectatc ctccgtcctt gtagtgggaag gcggcctctc gaccgttcaa cttttgtgtg 5940
tctttttcct accttggcgc atgatgggcc atgcctggac tccattgtt gccgtgggtt 6000
tctttttact gaatgaaatt cttccagcag ttttgggtcg agccgtgttt tcttttgac 6060
tttttgtgct tgcattgggcc accccctggt ctgcacaggt gttgatgatt agactcctca 6120
cggcatctct caaccgcaat aagctttctc tggcgttcta cgcactcggg ggggtcgtcg 6180
gtttggccgc tgaatcggg acctttgctg gcaaatgtcc tgaattgtct caaacctttt 6240
cgacatactg cttettacct agggctcttg ctatgaccag ttgtgttccc accatcatca 6300
ttgttggaact ccatgccctc ggtgtaatc tgtggttgtt caaataccgg tgcctccaca 6360
acatgctcgt tgggtgatgg agtttttcaa ggccttctt cctacgggtt ttgcagagg 6420
gtaatctcag aaaagggtgt tcgcagtcct gtggcatgaa taacgagtc ctgacggctg 6480
ctttggcttg caagtgtca cgggctgacc ttgattttt gtccagctta acgaacttca 6540
agtgccttgt atctgcttcg aatatgaaaa atgctgcccg ccagtacatt gaagcggcgt 6600
atgccaaggc cctgcgccaa gaggttggct ctctagtcca gattgacaaa atgaaaggag 6660
ttttgtccaa actcgaggcc ttgctgaaa cagctactcc gtcccttgac atagggtgacg 6720
tgattgttct gcttgggcaa catccacacg gatctatcct tgatattaat gtggggactg 6780
agaggaaaac tgtgtccgtg caagagaccc ggagccragg cgggtccaaa ttcagtgttt 6840
gtactgtcgt gtctaacaca cccgtggacg ccttaaccgg catccactc cagacaccaa 6900
ccccctttt tgagaatggt ccgcgtcatc gcagcgaaga agacpatctt aaagtcgaga 6960
ggatgaagaa acactgtgtg cccctcggct tccacaacat caatggcaaa gtttactgca 7020
agatttggga caagtcacc ggtgacacct ttacacgga tgattcccgg tataccacg 7080
accatgctct tcaggacagg tcagccgact acagagacag ggactatgag ggtgtgcaaa 7140
ccgcccccca acagggattt gatccaaagt ctgaaacccc tgtcggcact gttgtgatcg 7200
gcgggtattc gtataacagg tatctgacta agggtaagga ggttctggtt cccaagcccg 7260
acaattgcct tgaagctgcc aagctgtctc ttgagcaagc tctcgtggg atgggccaaa 7320
cttgcgacct tacagctgcc gaggtggaaa agttaaacg catcatcagt caactccaag 7380
gtttgaccac tgaacaggct ttaaaactgt agccgctagc ggcttgacc gctgtggccg 7440
cggcggctta gttgttactg aaacggcggg aaaaattgta agataccaca gcagaacttt 7500
caccitgggc cctttggacc taaaagtcgc ttctgaggtg gaggtgaaga gatcaactga 7560
gcagggccac gctgtgtgtg caaacctatg ttctgtgtt gtattgatga gacctaccc 7620
accgtccctt gttgacgttc ttctgaaacc cggacttgac acaacacccg gcattcaacc 7680
ggggcatggg gccgggaata tgggcgtgga cggttccatt tgggaatttg aaaccgcacc 7740
cacaaggcca gagctcgagt tgtccaggca aataatccaa gcatgtgaag tcaggcgcgg 7800

```

CROPINKA 34

ggatgccccg aacctccaac tcccttaca gctctgtcca gttagggggg atcctgagcg 7860
 gcataaaggg cgccttatca ataccaggtt tggagatttg cettacaaga ctccccaaga 7920
 caccaagtec gcaatccacg cggtttgttg cctgcacccc aacggggctc ccgtgtctga 7980
 tggtaaatcc acattaggca ccactcttca acacgggttc gagctttatg tccctactgt 8040
 gccctatagt gtcattggagt accttgattc acgcccgtac acccccctta tgtgtacca 8100
 acatgggtacc cccgaggctg ctgcagagga ccttcgaaaa tatgacttat ccacccaagg 8160
 gtttgtcctg cctgggggtc tacgtctagt acgcagattc atctttggcc atattggtaa 8220
 ggcaccgcca ctgttccctc catcaactta tcccgcgaag aactctatgg cagggaatca 8280
 tggccagagg ttcctcaaca aagacgttca gagcatacct gaaattgatg aaatgtgtgc 8340
 ccgcgtgtc aaagagaatt ggcaaaactgt gacgccttgc accctcaaaa aacagtattg 8400
 ttccaagcct aaaaccagga ccactcttgg taccacaac ttcatgtcct tggctacag 8460
 gtcggcactc agcgggtgtc ctcaggcggt catgaaaaaa gccctggaagt ccccgatcgc 8520
 cttggggaaa aacaaattta aggagttgca ctgactgtc gccggtagggt gcctcgaggg 8580
 cgacttggcc tcttgtgatc gcagcacccc ggccatcgtg aggtgggttg ttgccaacct 8640
 cctgtacgaa ctgtcgggtt gtgaagagta ctgccaagc tatgtgtca atgtttgcca 8700
 tgacctgggt gcaacgcaaa atggcgctt cacaacacgt ggtggcctgt catctggaga 8760
 ccccggtacc agtgtgtcca acacagtgt ttcactggtg atttatgtc agcacatggt 8820
 gctgtcggct ttgaagatgg gtcattgaaat cggcctcaag ttcttcgagg aacagctaa 8880
 gttcaggagc ctcttcgaaa tccagcctat gttggtatat tctgatgacc ttgtattgta 8940
 tgcctgaaaga cccaccttcc ccaattacca ttggtgggtt gagcaccttg acctgatgct 9000
 ggggttttaag acagacccaa aaaagactgt cataactgac aaaccagct ttcttggctg 9060
 tagaatcgaa gcggggcgac aactgggttc cagtcgcgac cgcattctgg ctgctcttgc 9120
 atatcacatg aaggcgagc acgcctcaga gtattatgct tctgctgccc cgattctgat 9180
 ggactcgtgt gcttgcattg accacgatcc tgagtgggtt gaggacctca tctgcggcat 9240
 tgctcgatgc gcccgccagg atggctacag ttcccaggg ccgcccgtct tcatgtccat 9300
 gtgggagaa ctgaaaagtc acaatgaagg caagaaattc cggcactgtg gcatttgtga 9360
 cgccaaggcc gatcatgcgt ccgctgttgg gcttgattta tgtctgttcc actcgcactt 9420
 tcatcaacac tgccttctta ctctgagctg cggccatcat gccggttcaa aagaatgccc 9480
 acagtgtcag tcacctgttg gagctggtaa atccccctt gatgcagtgc tgaacaaat 9540
 cccgtacaaa cccctcgtc ctgtcatcat gaagggtggc aataaaacaa cgaccttga 9600
 cccgggaagg tatcagtcct gtcgaggtct tgttgcgtc aagaggggta ttgcaggcaa 9660
 tgaggttgat ctgctgatg gagactatca ggtggtgccc ctttgccaa cctgcaaga 9720
 cataaacatg gtgaagggtg ctgtcaatgt gctactcagc aagttcatag tggggccgcc 9780
 aggttccggc aagacgacct ggctactgag tcaagttcag gatgatgatg tcatctatac 9840

Стрінка 35

```

acctaccat cagaccatgt tegacatagt caatgccctc aaagtctgta ggtattccat 9900
cccagtggtc tcagggctcc ctttcccacc gcccgccaga tctggaccgt gggttaggct 9960
cggttctagc gggcacatcc ctggccgaat atcatacctt gacgaggccg gatattgcaa 10020
tcattctggat attctcagac tgetttctaa gacacctctt gtgtgtttgg gtgaccttca 10080
gcaacttcac cctgtcggct ttgactcita ctgttatgtt ttgatcaca tgcctcataa 10140
gcagctgacc actatttata gatitggccc caatatctgt tctgccattc aaccttgtra 10200
cagggaaaaa ctgcaatcta agggcaggaa cactaggggt gttrttactg cccggcccggt 10260
ggcttttggc caggtgttga cgcctatca taaagaccgc accggctcag ctataaccat 10320
agattcatcc cagggagcca cttttgatgt tgtgacgctg catttgccgt cggcagattc 10380
cctgaacaaa tcccgggctc ttgtagctat cactcgggca aggcattgggt tgttcactca 10440
tgacctcat aaccaactcc ggaagttttt caacttaaca cctgagcgca ctgattgcaa 10500
cctcgtgttc aaccgcgggg acgagttggc agttttgaat gcagataatg cagtcacgac 10560
tgtggctaag gttctggagg cgggcccgct tcggtttcga gtatcagatc caaggtgcaa 10620
gtctctttta gccgcttgct cggccagctc ggaaggaggc tgcattgccac tgcgcgaagt 10680
ggcacataat ctgggggttt acttctctcc agatagttca gcatttgac ctcgtccaaa 10740
agagctggca ccacattggc cggttgttac tagtcagaac aaccaggcat ggcgccgaccg 10800
acttgctgct agtatgcggc cagttgatgc ccgctacagc aagcctatgg tcggtgcagg 10860
gtatgtgggt gggccatcca ctctctttgg cactcctggc gtgtgttcac actatctcac 10920
gctgtacatc aggggtgagc ccaggectt gccggagaca ctgtctcaa cgggacgtat 10980
agctactgat tgtcgagagt atctcgacgc agctgaggaa gaagcagcta aagaactccc 11040
tcacgcattc attggcgatg tcaaaggtag tacagtgggg ggggtgcacc acattacgtc 11100
aaaatacctt cccaggtcct tgcctcaaggc ctccgttgcc gtggtcggag tgagttcgcc 11160
cggcaaggct gccaaagccg tgtgtactct caccgatgtg tatcttcccg agctccggcc 11220
atatttgcaa ccggaaacag catcgaaatg ctggaaactt aaactagact tcagggatgt 11280
cagactgatg gtcctgaaag gagccaccgc atatttccaa ctggaggggc tcacatggc 11340
agcgtgccc gactatgcca ggttcattca gctacaaaa gatgccgttg tgtacattga 11400
tccgtgcata ggaccggcaa cagccaaccg taagggtgtg agaactacag attggcgagc 11460
tgacctggca gtgacaccgt acgactacgg tgctcagagc attttgacta cagcctggtt 11520
cgaggacctt gggccgcagt ggaagatttt aggggtgcaa ccttcaagc gggcatttgg 11580
ctttgaaaac actgaggatt gggcgatcct tgcagctgc atgaacgacg gcaaggacta 11640
cactgactat aactggaatt gtgttcgaca acgcccacat gccatctacg gacgtgcccg 11700
tgaccatacg tatcactttg cccctggcac tgaactgcaa gtagagctag gtaaacctcg 11760
gctaccgcct gagcaagtac cgtgaatcta gagtgatgca arggggtcac tgtggagtaa 11820
aatcagtcac ctgttcgtgg atgccctcac tgagttcctt gttagtgtgg ttgatattgt 11880
catcttctt gccatactgt ttgggttcac cgttgccagg tggttactgg tctttttctt 11940

```

Стрiнка 36

cagagtggtt	tgctccgcgc	ttctccgttc	gcgctctgcc	attcactctt	ccgaactatc	12000
gaaggctcta	tgagggtctg	ctacctaat	gcagaccgga	tggtccacaa	ttcgcattca	12060
agcaccatt	gggtatgttt	tggcacatgc	gagtttccca	cttaattgac	gaaatggctt	12120
ctcgccgcat	ttatcagacc	atggaacatt	caggtcaagc	ggcttgggaag	caggtgggta	12180
gtgaagctac	tctcacaa	ctgtcaaagc	tcgacatagt	tctccacttc	caacacctgg	12240
ccgcaataga	ggcggattct	tgccgtcttc	tcagctcacg	acttgtgatg	ctgaaaaatc	12300
ttgctgttgg	caatatgagc	ctacagtaca	acaccacgtt	ggaccgcgtt	gagctcatct	12360
tcccaacacc	aggtacgagg	cccaaattga	ccgattttag	acaatggctc	gtcagtgtgc	12420
acgcttctat	ttttctctct	gtggcctcat	cagttacctt	gttcatagtg	ctttggcttc	12480
gaattccagc	tctacgctat	gtttttgggt	tccatttggc	cacggcaaca	catcattcga	12540
gctaaccatc	aattactcta	tatgtaagcc	ctgtctcacc	agtcgaagcg	ctcgacaaag	12600
gtcgaaccc	ggctgcaaca	tgtggtgcaa	aatagggcac	accacgtgtg	aggagcgtga	12660
ccatgatgag	ttgtcaatga	ccattccgtc	cgggtacgat	aacctcaaac	ttgaggggta	12720
ttacgcttgg	ctggcttttt	tgctcttttc	ttacgcagcc	caatttcata	cagagttggt	12780
cggaaatagg	aatgtgtcac	gcgtcttcgt	ggataaacgg	caccagtcca	tctgtgccga	12840
gcacgacgga	caaaattcaa	ccgtatccac	cgaacataat	atttccgcat	tgtatgcggc	12900
gtactaccac	caccaggtag	acgggggcaa	ttgggtccac	ctggaatggc	tcgggccttt	12960
cttttctctc	tggctagtac	tcaatatttc	atgggtttctg	aggcgttcgc	ctgcaagccc	13020
tgtttctcga	cgcattttat	agataatgag	accaacacga	ccgcggctgc	cggtttcattg	13080
gtccttcagg	acatcaactg	tttccacagt	ggctcagagg	cacaaacgac	tggtcccatc	13140
agaaagtctg	cccaatgcgc	tgaagccgtc	ggcactcccc	agtaacatcaa	gataacggcc	13200
aatctgaccg	acgaatcata	cttgtacaac	gcggacttgc	tgatgccttc	tcgctgcctt	13260
ttctacgect	cagagatgag	cgagaaaggc	tttaaagtca	tttttgggaa	tgctctctggc	13320
gttgtctccg	cttgtgtcaa	ttttacagat	tatgtggccc	atctgaccca	acatacccag	13380
cagcatcatt	tggttaacca	tcacattcgg	ttgtatcatt	tcccgacacc	atcagcgatg	13440
aggtgggcta	caaccattgc	ttgtttgttc	gccattctct	tggcgatatg	agatgtttct	13500
acaaatcggg	gtgtttcttg	actccgcact	cttgcctttg	gtgggttttt	ttgctgtgta	13560
ccggcttgtc	ctggctcttt	gccgatggca	acggcgacag	ctcgacatac	caatatatat	13620
ataaettgac	gatatgcgag	ctgaatggga	ccgaatggct	gtctgaccat	tttaattggg	13680
cagtcgagac	ttttgtgtct	taccagtggt	cgactcatat	cctctcactg	ggtttcttca	13740
cgacaagtca	tttccttgat	gcgttcggtc	ttggagctgt	gtcaattaca	gggttttgtg	13800
gcgggctgta	cggtctcagc	agcgtgtacg	gcgctgtgtc	actagcagcg	ctcgtatgtt	13860
ttgttatccg	tgctgcaaaa	aattgtatgg	cttgcgcgta	tgctcgatcc	cggtttacc	13920
acttcattgt	ggatgaccgg	gggagaatcc	atcgggtggag	gtctccaata	gtgggtgaaa	13980

Сторінка 37

```

aattaggtaa agctgacgtc ggcggcgacc ttgtcaccat caaacatgtc atcctcgaag 14040
gagtc aaagc tcaacccttg acgaggactt cggccgagca atgggaggcc tagataattt 14100
ctgcaacgat cccaccgccc cacaaaagct tgtgctagcc tttagcatca cgtatacacc 14160
catcatgata tacgcccetta aggtgtcacg cggccgactc ttggggttgt tgcacatcct 14220
gatatttctg aactgttctt tcacgttcgg atacatgaca tatatgcatt ttgaatccac 14280
caacegtgtc gcgcttacca tggggggcgt tgtcggccctt ctgtggggcg tttatagttt 14340
catagagtea tggaaagttta tcacttcacg atgcagattg tgrtgccctag gccggcgata 14400
tattcggccc cctgcccacc acgtagaaag tgctgcaggg ctcacatcca tcccagcgtc 14460
tggtaaccaa gcatacgtg tgagaaagcc cggactaaca tcagtgaacg gcactctggt 14520
accaggactt cgaggccctc tgctggggcg caaacgagct gttaaacgag gagtgggtaa 14580
cctcgtaaac tatggccggt aaaaaccaga gccagaagaa aaagaaaaat ccagctccaa 14640
tgggggaatgg ccagtcagtc aatcaactgt gccagctgct gggcacaatg ataaagtecc 14700
agcgccagcg acccagggga ggcaggcta aaaagaaaaa gcctgagaag ccacatttcc 14760
ccctggctgc tgaagatgac gtccggcacc atctcaccca gaccgagcgc tccctttgct 14820
tgcaatcgat ccagacggct tttaatcaag gcgcaggaaac tgcgtcgctt tcatccagcg 14880
ggaagatcgg ttttcagggt gagtttatgc taccgggtgc tcatacagtg cgcttgattc 14940
gcgtgacttc tacatccgcc ggtcaggatg caaattaatt tgatagtcag gtgaatggcc 15000
gcgatggcg tgtggcctct ggtcaccta ttcaattagg gcgatcacat ggggggcaga 15060
cttaattagg caggaaccat gtagccgaaa tt 15092

```

```

<210> 6
<211> 18
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

```

```

<220>
<223> олігонуклеотидний праймер

```

```

<400> 6
gcaccacctc acccagac 18

```

```

<210> 7
<211> 18
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

```

```

<220>
<223> олігонуклеотидний праймер

```

```

<400> 7
cagttcctgc gccttgat 18

```

```

<210> 8
<211> 24
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

```

```

<220>

```

Сторінка 38

```

<223> олігонуклеотидний праймер

```

```

<400> 8
cctctgcttg caatcgatcc agac 24

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Вакцина для захисту тварини свині від зараження вірусом PRRS, де вакцина включає:
(a) європейський вірус PRRS, що кодується полінуклеотидною молекулою SEQ ID NO: 5 або
5 полінуклеотидною молекулою, яка є щонайменше на 90 % ідентичною до SEQ ID NO: 5, при
цьому зазначений вірус був адаптований для росту в свинячих клітинах або несвинячих
клітинах ссавців, які експресують свинячий рецептор CD163, до введення зазначеної вакцини
тварині свині; (b) зазначену кодуєчу полінуклеотидну молекулу; (c) зазначену полінуклеотидну
10 молекулу у формі плазмід; або (d) вірусний вектор, який містить зазначену полінуклеотидну
молекулу;
в кількості, ефективній для вироблення імунітету проти інфекції, та
носії, який придатний для ветеринарного застосування, і причому зазначена вакцина
забезпечує легку та безпечну вакцинацію вже з моменту, коли поросля одногоденного віку або
менше, і причому зазначена вакцина забезпечує тривалість імунітету протягом аж до 6 місяців.
15 2. Вакцина за п. 1, причому зазначена вакцина забезпечує захист від інфекції під час введення
поросяті, вік якого складає приблизно 8-12 годин.
3. Вакцина за п. 1, причому виникнення імунітету настає, починаючи з двох тижнів після
вакцинації.
4. Вакцина за п. 1, причому виникнення імунітету настає, починаючи з 24-28 дня після
20 вакцинації.
5. Спосіб вакцинації тварини свині проти інфікування європейським вірусом PRRS, який
включає введення зазначеної вакцини в період від приблизно 12 годин після народження до 3-
тижневого віку, перед відлученням від матері зазначеної тварини, причому зазначена вакцина
включає:
25 (a) виділену полінуклеотидну молекулу, яка містить послідовність ДНК, яка кодує інфекційну
молекулу РНК, яка кодує європейський вірус PRRS, кодований полінуклеотидною молекулою
SEQ ID NO: 5 або полінуклеотидною молекулою, яка є щонайменше на 90 % ідентичною до
SEQ ID NO: 5,
(b) молекулу інфекційної РНК, яка кодує європейський вірус PRRS;
30 (c) зазначену полінуклеотидну молекулу (a) у формі плазмід,
(d) вірусний вектор, який містить молекулу інфекційної РНК (b), або
(e) європейський вірус PRRS, кодований полінуклеотидною молекулою SEQ ID NO: 5 або
полінуклеотидною молекулою, яка є щонайменше на 90 % ідентичною до SEQ ID NO: 5, і
причому зазначений вакцинний вірус був адаптований для росту в свинячих клітинах або
несвинячих клітинах ссавців, які експресують свинячий CD163 рецептор, перед введенням
35 зазначеного вакцинного вірусу тварині свині.
6. Спосіб за п. 5, за яким захисний імунітет виникає не пізніше ніж приблизно через 28 днів після
вакцинації.
7. Спосіб за п. 5, за яким тривалість захисного імунітету, що забезпечується, складає аж до 6
40 місяців.

повна геномна послідовність для SEQ ID NO:5

>96V198clp49 повний геномний пасаж 49 (SEQ ID NO:5)
 ATGATGTGTAGGGTATTCCCCCTACATACACGACACTTCTAGTGTTTGTG
 TGCCTTGGAGGCGTGGGTATAGCCCCGCCCCACCTCTTGGCCCCCTGTTCT
 AGCCCAACAGGTATCCTTCTCTCTCGGGGCGAGCGCGCCGCCTGCTGCTC
 CCTTGCAGCAGGAAGGACCTCCCGAGTATTTCCGGAGAGCACCTGCTTTA
 CGGGATCTCCACCCTTTAACCATGTCTGGGACGTTCTCCCGGTGCATGTG
 CACCCCGGCTGCCCCGGGTATTTTGGAGCGCCGGCCAAGTCTATTGCACAC
 GGTGTCTCAGTGCACGGTCTCTTCTCTCTCCGGAGCTTCAGGACACTGAC
 CTCGCTGCAATTGGCTTGTTTTACAAGCCTAAAGACAAGCTTCACTGGAA
 AGTCCCTATCGGCATCCCTCAGGTGGAGTGTACTCCGTCCGGGTGCTGTT
 GGCTCTCAGCCATCTTCCCCTTGGCGCGCATGACCTCCGGCAATCACAAAC
 TTTCTCCAACGACTTGTGAAGGTTGCTGATGTTTTGTACCGTGACGGCTG
 CTTGGCACCTCGACACCTTCGCGAACTCCAAGTTTACGAGCGCGGCTGCA
 ACTGGTACCCGATCACGGGGGCCCGTGCCCGGGATGGGTTTGTACGCGAAC
 TCCATGCACGTGTCCGACCAACCGTTCCCTGGTGCCGCTTATGTGTTAAC
 GAACTCACCTCTGCCTCAGCAGGCTTGTGACAGCCGTTTTTGTCCATTTG
 AGGAGGTTTATTCCGACGTATACAGGTGGAAGAAATTCGTGATTTTTGTG
 GATTCCTCTTCTGACGGCCGATCTCGCATGATGTGGACACCAGGATCCGA
 CGACTCGGCTGCCTTAGAAGTATTGCCACCTGAACTAGAATGTCGAGTCG
 AAATCCTCGTTCGGAGTTTTCTCTGCCCCACCACCCTGTGACATCACCAAC
 TGGGAGCTCACTGAGTCCCCTGAGCACGGTTTTTCTTTCAGCACGTCTCA
 TTCTTGTGGTTACCTTGCCCAAGACCCTGACGTGTTTGATGGTAAGTGTT
 GGCTTTCTTGCTTTTTTGGGCCTGCCGACCGAAGTGTGGCGTCATGAGGAG
 CATCTAGCTAACGCCTTCGGTTACCAAACCAAGTGGGGCGTGATGGTAA
 GTACCTCCAGCGCAGGCTTCAGGTCCGCGGCATGCGTGCTGTAGTTGATC
 CTGATGGTCCCATCCACGTTGAAGCGCTGTCTTGCCCCAGTCTTGGATC
 AGGCACCTGACTCTAAATGATGACGTCACCCCAGGATTTGTTTCGCCTAAC
 ATCCCTTCGCATTGAGCCGAACACAGAGCCTACTACTTTCCGGATCTTTC
 GGTTTGGAGCGCATAAGTGGTATGGCGCTGCCGGCAAACGGGCTCGTGCT
 AAGCGTGCCGCTAAAGGTGAGAAGAATTCAGCTCCCACCCCCAAGGTGCG
 CCTGCCGGTCCCCACCTATGGAATTACCACCTACTCTCCACCGACAGACG
 GGTCTTGTGGTTGGCATGTCTTGGCGCCATAATGAACCGGATGATAAAT
 GGTGACTTCACGTCCCCTCTGACTCCGTACAACAGACCAGAGGATGATTG
 GGCTTCTGATTATGATCTTGCTCAGGCAATCCAATGTCTACAACCTGCCTG

ФІГУРА 1А

повна геномна послідовність для SEQ ID NO:5

>96V198c1p49 повний геномний пасаж 49 (SEQ ID NO:5)
 CTACCGTGGTCCGGAGTCGCGCCTGTCCCAACGCCAAGTACCTCATAAAA
 CTC AACGGAGTCCACTGGGAGGTAGAGGTGAGGTCAGGAATGGCTCCTCG
 CTCTCTTTCTCGTGAATGTGTGGTTGGCGTTTGCTCTGAAGGTTGTGTTG
 CACCGCCTTATCCAGCAGACGGGCTACCAGAACGAGCACTCGAGGCCTTG
 GCGTCTGCTTACAGGTTACCTCTGATTGTGTTAGCTCTGGCATTGCTGA
 CTTTCTTGCTAACCCACCTCCTCAGGAATTCTGGACCCTCGACAAAATGT
 TGACCTCCCCGTACCCAGAGCGGTCCGGCTTCTCTAGTTTGTATAAATTA
 CTATTAGAGGTTGTTCCGCAAAAATGCGGTGCCACGGAAGGGGGCTTTCTG
 CTATGCTGTTGAGAGAATGTTGAAGGATTGTCCGAGCTCCAAACAGGCCA
 TGGCCCTTCTGGCAAAAATTAAAGTTCCATCCTCAAAGGCCCCGTCTGTG
 TCCCTTGACGAGTGTTTCCCTACGGATGTTTCAGCCGACTTCGAGCCAGC
 ATCTCAGGAAAGGCCCCCAAAGTTCCGGTGCTGCTGTTGTCCTGTGTTAC
 CGGAAGTAAAAGAGTTCCGAAGAAGCAGCCCCAGAAGAAGTTCAAGAGAGT
 GGCCATAAGGTGCGCCCGCTCTGCATTTGTTGCCGAGGGTCTAACAATGA
 ACAGGTACCGATGGCTGCCGGCGAGCAACTGAAGCCCGGTGGTCGCGTTT
 TGGCGGTGCGGAATGCTCATGAAGGTGTTCTGGCCTCAACTAGTTTCGACC
 AACCTGATAGGCGGGAACTTCCCCCTTCAGACTCCATGAAAGAGAGCAT
 GCTCAATAGCTGGGAAGACGAACCACTGGATTTGTCCCAACCGGCACCAG
 CTGTTACAATGACCCTTGTGAGAGAGCAAAACACCCGACAACCTGGGTCTT
 GATGCCGGTGCTTCCCCGTACCGTTCCGAAAATTTGTCCCGACAGGGCC
 TAACTCCGTCATGTTGAGCACTGCGGCACGGAGTCAGGCGACAGCAGTT
 CGCCCTTGGATCTGTCTTATGCGCAAAACCCTGGACCAGCCTTTAAATCTA
 TCCTTGGCCGCTTGGCCAGTGAGGGCCACCGCGTCTGACCCTGGCTGGGT
 CCACGGTAGGCGTGAGCCTATCTTTGTGAAGCCTCGAGATGCTTTCTCTG
 ACGGCGATTACGCCCTTCAGCTCGGGGAGCTGTCTGAATCCGGCTCCGTC
 ATCGAGTTTGACCGGACAAGAAATGCTCCGGCGGTGACGCCCCCTGTTGA
 CTTGACGGCTTCGAACAAGGCCCTCTCTGTGGTTGATCCTTTCGAATTTG
 CCGAACTCAAGCGCCCGCGTTTTTCCGCAACAAGCCTTAATTGACCGAGGC
 GGTCCACTTGCCGACGTCCATGCAAAAATAAAGAACCAGGGTATATGAACA
 GTGCCTCCAGGCTTGTGAGCCTGGCAGTCGCGCAACCCAGCCACCAAGA
 AGTGGCTCGATAAAATGTGGGATAGGGTGGACATGAAGACTTGGCGCTGT
 ACCTCGCAGTTCCAAGCTGGTCGCATTCTTGCGTCCCTTAAATTCCTCCC

ФІГУРА 1В

повна геномна послідовність для SEQ ID NO:5

>96V198clp49 повний геномний пасаж 49 (SEQ ID NO:5)
 TGACATGATTCAGGACACACCCACCTCCTGTTCCCTAGGAAGAATCGGGCTA
 GTGATAATGCCGGCCTGAAGCGACTGGTGGCCGAGTGGGACAGAAAATTG
 AGTGCAACCCCCCTTCAAAACCGGTTGGACCAACACTTGACCAAATTGT
 CCCTTCGCCACGGGTACCCAGCAAGAAGATGTCACCTTCCTCCGATGGGC
 CATCTCATGCGCCGGATCCTCCTAGTCGAATGAGCACGAGTGGGAGTTGG
 AAGGGCCTTGTGCTCTCTGGTACCCGTCTCGCGGGGTCCATTAGTCAGCA
 TTTCATGACATGGGTTTTTTGAGGTTTTCTCCCATCTCCCAGCTTTTTGCAC
 TCACACTTTTTCTCGCCGAGGGGCTCTATGGCTTCAGGTGATTGGATGTTT
 GCAGGTGTTGTTTTACTTGCTCTCCTGCTCTGTCGTTCTTACCCAGTATT
 CGGGTGCCCTTCCCTTATTGGGTGTCTTTCTGGCTCTGTGCGGCGCCTTC
 GTCTGGGGGTTTTTTGGTTCCTTGGATGGCTTTTCGCTGTATTTTTATTCTCG
 ACTCCATCCAACCCAGTCGGTTCTTCTTGTGACCACGATTCGCCGGAGTG
 TCATGCTGAGCTTTTGGCTCTTGAGCAGCGCCAACTTTGGGAACCTGTGC
 GCGGCCTTGTGGTCGGCCCCCTCGGGCCTCTTATGTGTCAATTCTTGGCAAG
 CTACTCGGTGGGTCACGTTATCTCTGGCATGTTTTCTTACGTTTATGCAT
 GCTTGCAGATTTGGCCCTTTCTCTTGTTTATGTGGTGTCCCAGGGGCGTT
 GTCACAAGTGTTGGGGAAAGTGTATAAGAACAGCTCCGGCGGAGGTGGCT
 CTCAATGTGTTCCCTTTCTCGCGCGCTACCCGTAGCTCTCTTGTGTCCTT
 GTGCGATCGGTTCCAAGCGCCAAAAGGGGTGATCCTGTGTACTTGGCAA
 CGGGTTGGCGCGGGTGTGTTGGTGTGGTGAGAGTCCCATTCATCAACCGCAC
 CAAAAACCCATAGCTTATGCTAATCTGGATGAAAAGAAAATATCTGCCCA
 AACGGTGGTTGCTGTCCCACACGATCCCAGTCAGGCCATCAAGTGCCTGA
 AAGTTTTGCAGGCGGGAGGAGCCATCGTGGACCAGCCCACACCTGAGGTC
 GTCCGTGTATCCGAAATCCCCTTCTCAGCCCCATTTTTCCCAAAAGTTCC
 AGTCAACCCAGATTGTAAGGTTGTGGTGGATTCCGACACTTTTGTGGCTG
 CGGTTCTGCTGCGGCTACTCGACAGCACAACCTGGTCTTAGGCCAGGGCAAC
 TTTGCCAAGTTAAATCAGATTCCCCCTCAGGAGCTCTATCTCCACCAAAGC
 GATTGGCGGGGCTCTTACACCCCTTGCTGTGGCTCAAGTTTCTGTGTGGA
 CTCTTGTTCACCTCATCCTCGGTCTTTGGTTCACGTCACCCCAAGTGTGT
 GGCCGAGGAACCTCTGACTCATGGTGTTCAAATCCTTTTTTCATACCCTAC
 CTATGGCCCCGGGGTTGTGTGCTCCTCTCGACTTTGTGTGTCTGCCGACG
 GGGTCACTCTACCATTTGTTCTCAGCCGTGGCTCAACTCTCCGGTAGAGAG

ФІГУРА 1С

повна геномна послідовність для SEQ ID NO:5

>96V198clp49 повний геномний пасаж 49 (SEQ ID NO:5)
 GTGGGGGATTTTTATTTTGGTACTCGTCTCCTTGATGGCTTTGGCCCCACCG
 CATGGCCCTTAAGGCAGACATGTTGATGGTCTTTCTGGCTTTTGTGCTT
 ACGCCTGGCCCATGAGCTCCTGGTTGATTTGCTTCTTTCTACACTCTTG
 AAGTGGGTACCCCTCCACCCTCTTACTATGCTTTGGGTGCACTCATTCCT
 GGTGTTTTGTCTGCCAGCAGCCGGCATCCTCTCACTAGGGATAACTGGCC
 TTCTTTGGGCGGTTGGCCGCTTTACTCAGGTTGCCGGAATTATTACACCT
 TATGACATCCACCAGTACACCTCTGGGCCACGTGGCGCTGCAGCTGTGGC
 CACAGCCCCAGAAGGCACTTATATGGCCGCCGTCCGGAGAGCTGCTTTAA
 CTGGGCGAACTTTAATCTTCACCCCGTCTGCAGTTGGATCCCTTCTCGAA
 GGAGCTTTCAGGACTCATAAACCTTGTCTTAACACCGTAAATGTTGTAGG
 CTCTTCCCTTGGTTCCGGCGGGGTTTTCACTATTGACGGCAGAAAAATTG
 TTGTCAGTCTGCTGCCCATGTCTTGAACGGCGACACAGCTAGAGTCACCGGC
 GACTCCTACAACCGCATGCATACTTTCAAGACCAATGGTGATTATGCCTG
 GTCCCATGCTGATGACTGGCGGGGCGTTGCCCTGCGGTCAAGGTTGCGA
 AGGGGTACCGCGGTCTGCTTACTGGCAAACATCAACTGGCGTCAACCC
 GGTGTTATTGGGGAAGGGTTCGCCTTCTGTTTCACCACCTGTGGCGATT
 GGGGTCACCCGTCATCTCAGAATCCGGTGATCTCATTTGGAATCCATACCG
 GTTCAAATAAACTTGGTTCTGGTCTTGTGACAACCCCTGAAGGGGAGACA
 TGTACCATCAAAGAAACCAAGCTCTCTGACCTCTCCAGACATTTCCGAGG
 CCCAAGCGTTCCTCTTGGGGATATTAAATTGAGTCCAGCCATCATCCCTG
 ATATAACATCCATTCCGAGTGACTTGGCATCGCTCCTATCCTCCGTCCCT
 GTAGTGGAAGGCGGCCTCTCGACCGTTCAACTTTTGTGTGTCTTTTTCT
 ACTTTGGCGCATGATGGGCCATGCCTGGACTCCCATTTGTTGCCGTGGGT
 TCTTTTTACTGAATGAAATTCTTCCAGCAGTTTTTGGTCCGAGCCGTGTTT
 TCTTTTGCATTTTTTGTGCTTGCATGGGCCACCCCTGGTCTGCACAGGT
 GTTGATGATTAGACTCCTCACGGCATCTCTCAACCGCAATAAGCTTTCTC
 TGGCGTTCTACGCACTCGGGGGGGTCTGTCGCTTGGCCGCTGAAATCGGG
 ACTTTTGCTGGCAAATTGCCTGAATTGTCTCAAACCCTTTCGACATACTG
 CTTCCTACCTAGGGTCCTTGCTATGACCAGTTGTGTTCCCAACCATCATCA
 TTGGTGGACTCCATGCCCTCGGTGTAATTCTGTGGTTGTTCAAATAACCG
 TGCCTCCACAACATGCTCGTTGGTGATGGGAGTTTTTCAAGCGCCTTCTT

ФІГУРА 1D

повна геномна послідовність для SEQ ID NO:5

>96V198clp49 повний геномний пасаж 49 (SEQ ID NO:5)
 CCTACGGTATTTTGCAGAGGGTAATCTCAGAAAAGGTGTTTCGCAGTCCT
 GTGGCATGAATAACGAGTCCCTGACGGCTGCTTTGGCTTGCAAGTTGTCA
 CGGGCTGACCTTGATTTTTTGTCCAGCTTAACGAACTTCAAGTGCTTTGT
 ATCTGCTTCCGAATATGAAAAATGCTGCCGGCCAGTACATTGAAGCGGCGT
 ATGCCAAGGCCCTGCGCCAAGAGTTGGCGTCTCTAGTTCAGATTGACAAA
 ATGAAAGGAGTTTTTGTCCAAACTCGAGGCCCTTTGCTGAAACAGCTACTCC
 GTCCCTTGACATAGGTGACGTGATTGTTCTGCTTGGGCAACATCCACACG
 GATCTATCCTTGATATTAATGTGGGGACTGAGAGGAAAAGTGTGTCCGTG
 CAAGAGACCCGGAGCCTAGGCGGTTCCAAATTCAGTGTTTGTACTGTCTGT
 GTCTAACACACCCCGTGGACGCCCTTAACCGGCATCCCACTCCAGACACCAA
 CCCCTCTTTTTGAGAATGGTCCGCGTCATCCGAGCGAAGAAGACGATCTT
 AAAGTCGAGAGGATGAAGAAACACTGTGTGCCCCCTCGGCTTCCACAACAT
 CAATGGCAAAGTTTACTGCAAGATTTGGGACAAGTCCACCGGTGACACCT
 TTTACACGGATGATTCCCGGTATACCCACGACCATGCTCTTCAGGACAGG
 TCAGCCGACTACAGAGACAGGGACTATGAGGGTGTGCAAACCGCCCCCCA
 ACAGGGATTTGATCCAAAGTCTGAAACCCCTGTCGGCACTGTTGTGATCG
 GCGGTATTACGTATAACAGGTATCTGACTAAGGGTAAGGAGGTTCTGGTT
 CCCAAGCCCGACAATTGCCTTGAAGCTGCCAAGCTGTCTCTTGAGCAAGC
 TCTCGCTGGGATGGGCCAACTTGGGACCTTACAGCTGCCGAGGTGGAAA
 AGTTAAAGCGCATCATCAGTCAACTCCAAGGTTTGACCACTGAACAGGCT
 TTAAGTGTAGCCGCTAGCGGCTTGACCCGCTGTGGCCGCGGCGGCTTA
 GTTGTTACTGAAACGGCGGTAAAAATTGTAAGATACCACAGCAGAACTTT
 CACCTTGGGCCCTTTGGACCTAAAAGTCGCTTCTGAGGTGGAGGTGAAGA
 GATCAACTGAGCAGGGCCACGCTGTTGTGGCAAACCTATGTTCTGGTGT
 GTATTGATGAGACCTCACCCACCGTCCCTTGTTGACGTTCTTCTGAAACC
 CGGACTTGACACAACACCCGGCATTCAACCGGGGCATGGGGCCGGGAATA
 TGGGCGTGGACGGTTCCATTTGGGATTTTGAAACCGCACCCACAAAGGCA
 GAGCTCGAGTTGTCCAGGCAAATAATCCAAGCATGTGAAGTCAGGCGCGG
 GGATGCCCCGAACCTCCAACCTCCCTTACAAGCTCTGTCCAGTTAGGGGGG
 ATCCTGAGCGGCATAAAGGCCGCTTATCAATACCAGGTTTGGAGATTTG
 CCTTACAAGACTCCTCAAGACACCAAGTCCGCAATCCACGCGGCTTGTTG
 CCTGCACCCCAACGGGGCTCCCGTGTCTGATGGTAAATCCACATTAGGCA

ФІГУРА 1E

повна геномна послідовність для SEQ ID NO:5

>96V198clp49 повний геномний пасаж 49 (SEQ ID NO:5)
 CCACTCTTCAACACGGTTTCGAGCTTTATGTCCCTACTGTGCCCTATAGT
 GTCATGGAGTACCTTGATTACGCCCCTGACACCCCCTTTATGTGTACCAA
 ACATGGTACCCCCGAGGCTGCTGCAGAGGACCTTCGAAAATATGACTTAT
 CCACCCAAGGGTTTGTCTGCTGGGGTCCCTACGTCTAGTACGCAGATTCT
 ATCTTTGGCCATATTGGTAAGGCACCGCCACTGTTCCCTCCCATCAACTTA
 TCCCGCCAAGAACTCTATGGCAGGGATCAATGGCCAGAGGTTCCCAACAA
 AAGACGTTTCAGAGCATACCTGAAATTGATGAAATGTGTGCCCGCGCTGTC
 AAAGAGAATTGGCAAACTGTGACGCCTTGACCCCTCAAAAAACAGTATTG
 TTCCAAGCCTAAAACCAGGACCATCCTTGGTACCAACAACCTTCATTGCCT
 TGGCTCACAGGTGCGCACTCAGCGGTGTCACTCAGGCGTTCATGAAAAAA
 GCCTGGAAGTCCCCGATCGCCTTGGGGAAAAACAAATTTAAGGAGTTGCA
 CTGCACTGTCGCCGGTAGGTGCCTCGAGGCCGACTTGGCCTCTTGATGATC
 GCAGCACCCCGGCCATCGTGAGGTGGTTTGTGTTGCCAACCTCCTGTACGAA
 CTTGCGGGTTGTGAAGAGTACTTGCCAAGCTATGTGCTCAATTGTTGCCA
 TGACCTGGTGGCAACGCAAAATGGCGCCTTCACAAAACGTGGTGGCCTGT
 CATCTGGAGACCCCGTTACCAGTGTGTCCAACACAGTGTATTCAGTGGTG
 ATTTATGCTCAGCACATGGTGCTGTCGGCTTTGAAGATGGGTCATGAAAT
 CGGCCTCAAGTTCCTCGAGGAACAGCTTAAGTTCGAGGACCTTCTCGAAA
 TCCAGCCTATGTTGGTATATTCTGATGACCTTGTATTGTATGCTGAAAGA
 CCCACCTTCCCCAATTACCATTGGTGGGTTGAGCACCTTGACCTGATGCT
 GGGTTTTAAGACAGACCCAAAAAAGACTGTCATAACTGACAAACCCAGCT
 TTCTTGGCTGTAGAATCGAAGCGGGGCGACAACCTGGTTCCCAGTCGCGAC
 CGCATTCTGGCTGCTCTTGCAATATCACATGAAGGCGCAGAACGCCTCAGA
 GTATTATGCGTCTGCTGCCGCGATTCTGATGGACTCGTGTGCTTGCAATTG
 ACCACGATCCTGAGTGGTATGAGGACCTCATCTGCGGCATTGCTCGATGC
 GCCCGCCAGGATGGCTACAGTTTCCCAGGCCCGCCGTTCTTCATGTCCAT
 GTGGGAGAAGCTGAAAAGTCACAATGAAGGCAAGAAATTCGCGCACTGTG
 GCATTTGTGACGCCAAGGCCGATCATGCGTCCGCCTGTGGGCTTGATTTA
 TGTCTGTTCCACTCGCACTTTTCATCAACACTGCCCTGTTACTCTGAGCTG
 CGGCCATCATGCCGGTTCAAAAGAATGCCACAGTGTGAGTCACCTGTTG
 GAGCTGGTAAATCCCCCTTGATGCAGTGTGAAACAAATCCCGTACAAA
 CCCCCCTCCTGTCATCATGAAGGTGGACAATAAAACAACGACCCCTTGA

ФІГУРА 1F

повна геномна послідовність для SEQ ID NO:5

>96V198c1p49 повний геномний пасаж 49 (SEQ ID NO:5)
 CCCGGGAAGGTATCAGTCCCGTCGAGGTCTTGTTGCTGTCAAGAGGGGTA
 TTGCAGGCAATGAGGTTGATCTCGCTGATGGAGACTATCAGGTGGTGCCC
 CTTTTGCCAACCTGCAAAGACATAAACATGGTGAAGGTGGCTGTCAATGT
 GCTACTCAGCAAGTTCATAGTGGGGGCCGCCAGGTTCCGGCAAGACGACCT
 GGCTACTGAGTCAAGTTCAGGATGATGATGTCATCTATACACCTACCCAT
 CAGACCATGTTTCGACATAGTCAATGCCCTCAAAGTCTGTAGGTATTCCAT
 CCCAGTGGCTTCAGGGCTCCCTTTCCACACCGCCCGCCagatetggaCCGT
 GGGTTAGGCTCGTTGCTAGCGGGCACATCCCTGGCCGAATATCATAACCTT
 GACGAGGCCCGGATATTGCAATCATCTGGATATTCTCAGACTGCTTTCTAA
 GACACCTCTTGTTGTGTTTGGGTGACCTTCAGCAACTTCACCCTGTCCGGCT
 TTGACTCTTACTGTTATGTTTTTGATCACATGCCTCATAAGCAGCTGACC
 ACTATTTATAGATTTGGCCCCAATATCTGTTCTGCCATTCAACCTTGTTA
 CAGGGAAAACTCGAATCTAAGGCCAGGAACACTAGGGTGGTTTTTACTG
 CCCGGCCCGTGGCTTTTGGTCAGGTGTTGACGCCATATCATAAAGACCCG
 ACCGGCTCAGCTATAACCATAGATTTCATCCAGGGAGCCACCTTTGATGT
 TGTGACGCTGCATTTGCCGTCGCCAGATTCCCTGAACAAATCCCGGGCTC
 TTGTAGCTATCACTCGGGCAAGGCATGGGTGTTTCATCTATGACCCTCAT
 AACCAACTCCGGAAGTTTTTCAACTTAACACCTGAGCGCACTGATTGCAA
 CCTCGTGTTC AACCGCGGGGACGAGTTGGTAGTTTTGAATGCAGATAATG
 CAGTCACGACTGTGGCTAAGGTTCTGGAGGCGGGCCCGTCTCGGTTTCGA
 GTATCAGATCCAAGGTGCAAGTCTCTTTTAGCCGCTTGCTCGGCCAGTCT
 GGAAGGAGGCTGCATGCCACTGCCGCAAGTGGCACATAATCTGGGGTTTTT
 ACTTCTCTCCAGATAGTCCAGCATTTGCACCTCTGCCAAAAGAGCTGGCA
 CCACATTGGCCGGTTGTTACTAGTCAGAACAACCAGGCATGGCCCGACCG
 ACTTGTCGCTAGTATGCGGCCAGTTGATGCCCGCTACAGCAAGCCTATGG
 TCGGTGCAGGGTATGTGGTTGGGCCATCCACTTTCCTTGGCACTCCTGGT
 GTGGTGTCACTATCTCACGCTGTACATCAGGGGTGAGCCCCAGGCCTT
 GCCGGAGACACTCGTCTCAACGGGACGTATAGCTACTGATTGTTCGAGAGT
 ATCTCGACGCAGCTGAGGAAGAAGCAGCTAAAGAACTCCCTCACGCATTC
 ATTGGCGATGTCAAAGGTACTACAGTGGGGGGGTGTCACCACATTACGTC
 AAAATACCTTCCCAGGTCCCTTGCCCAAGGACTCCGTTGCCGTGGTCCGGAG
 TGAGTTCGCCCCGGCAAGGCTGCCAAAGCCGTGTGTACTCTCACCGATGTG

ФІГУРА 1G

повна геномна послідовність для SEQ ID NO:5

>96V198c1p49 повний геномний пасаж 49 (SEQ ID NO:5)
TATCTTCCCGAGCTCCGGCCATATTTGCAACCGGAAACAGCATCGAAATG
CTGGAAACTTAAACTAGACTTCAGGGATGTCAGACTGATGGTCTGGAAAG
GAGCCACCGCATATTTCCAACCTGGAGGGGCTCACATGGTCAGCGCTGCCC
GACTATGCCAGGTTCAATTCAGCTACCAAAAGATGCCGTTGTGTACATTGA
TCCGTGCATAGGACCGGCAACAGCCAACCGTAAGGTTGTGAGAACTACAG
ATTGGCGAGCTGACCTGGCAGTGACACCGTACGACTACGGTGCTCAGAGC
ATTTTGACTACAGCCTGGTTTCGAGGACCTTGGGCCGCGAGTGGAAGATTTT
AGGGTTGCAACCCTTCAAGCGGGCATTGTTGGCTTTGAAAACACTGAGGATT
GGGCGATCCTTGCACGTCGCATGAACGACGGCAAGGACTACACTGACTAT
AACTGGAATTGTGTTTCGACAACGCCCACATGCCATCTACGGACGTGCCCCG
TGACCATACGTATCACTTTGCCCCCTGGCACTGAACTGCAAGTAGAGCTAG
GTAAACCTCGGCTACCGCCTGAGCAAGTACCGTGAATCTAGAGTGATGCA
ATGGGGTCACTGTGGAGTAAAATCAGTCAACTGTTCTGTGGATGCCTTCAC
TGAGTTCCTTGTTAGTGTGGTTGATATTGTCATCTTCCTTGCCATACTGT
TTGGGTTTCAACGTTGCAGGGTGGTTACTGGTCTTTTTTCTCAGAGTGGTT
TGCTCCGCGCTTCTCCGTTTCGCGCTCTGCCATTCACTCTTCGAACTATC
GAAGTCTTATGAGGGCTTCTACCTAATTGCAGACCGGATGTTCCACAA
TTCGCATTCAAGCACCCATTGGGTATGTTTTGGCACATGCGAGTTTCCCA
CTTAATTGACGAAATGGTCTCTCGCCGCATTTATCAGACCATGGAACATT
CAGGTCAAGCGGCCTGGAAGCAGGTGGTTAGTGAAGCTACTCTCACAAGA
CTGTCAAAGCTCGACATAGTTCTCCACTTCCAACACCTGGCCGCAATAGA
GGCGGATTCTTGCCGCTTCTCAGCTCACGACTTGTGATGCTGAAAAATC
TTGCTGTTGGCAATATGAGCCTACAGTACAACACCACGTTGSACCGCGTT
GAGCTCATCTTCCCAACACCAGGTACGAGGGCCCAAATTGACCGATTTTAG
ACAATGGCTCGTCAGTGTGCACGCTTCTATTTTTTCTCTGTGGCCTCAT
CAGTTACCTTGTTTCATAGTGCTTTGGCTTCGAATTCCAGCTCTACGCTAT
GTTTTTGGTTTCCATTGGCCCACGGCAACACATCATTGAGCTAACCATC
AATTACTCTATATGTAAGCCCTGTCTCACCAGTCAAGCGGCTCGACAAAG
GCTCGAACCCGGTCGCAACATGTGGTGCAAAATAGGGCACACCACGTGTG
AGGAGCGTGACCATGATGAGTTGTCAATGACCATTCCGTCCGGGTACGAT
AACCTCAAACCTTGAGGGTTATTACGCTTGGCTGGCTTTTTTGTCTTTTC
TTACGCAGCCCAATTTTCATCCAGAGTTGTTCCGAATAGGGAATGTGTCAC

ФІГУРА 1Н

повна геномна послідовність для SEQ ID NO:5

>96V198clp49 повний геномний пасаж 49 (SEQ ID NO:5)
 GCGTCTTCGTGGATAAACGGCACCAGTTCATCTGTGCCGAGCACGACGGA
 CAAAATTCAACCGTATCCACCGAACATAATTTCCGCATTGTATGCGGC
 GTACTACCACCACCAGGTAGACGGGGGCAATTGGTTCCACCTGGAATGGC
 TGCGGCCTTTCTTTTCCTCCTGGCTAGTACTCAATATTTTCATGGTTTCTG
 AGGCGTTTCGCCTGCAAGCCCTGTTTCTCGACGCATTTATCAGATATTGAG
 ACCAACACGACCGCGGCTGCCGGTTTCATGGTCCTTCAGGACATCAACTG
 TTTCACAGTGGCTCAGAGGCACAAACGACTGGTCCCATCAGAAAGTCGT
 CCCAATGCCGTGAAGCCGTGGGCACTCCCCAGTACATCAAGATAACGGCC
 AATCTGACCGACGAATCATACTTGTAACAACGCGGACTTGCTGATGCTTTC
 TGCGTGCCTTTTCTACGCCTCAGAGATGAGCGAGAAAGGCTTTAAAGTCA
 TTTTGGGAATGTCTCTGGCGTTGTCTCCGCTTGTGTCAATTTTACAGAT
 TATGTGGCCCATCTGACCCAACATACCCAGCAGCATCATTTGGTAACCAA
 TCACATTCGGTTGCTACATTTCTGACACCATCAGCGATGAGGTGGGCTA
 CAACCATTGCTTGTGTTGTTGCGCCATTCTCTTGGCGATATGAGATGTTCTC
 ACAATCGGGGTGTTTCTTGACTCCGCACTCTTGCTTTTGGTGGTTTTTT
 TTGCTGTGTACCGGCTTGTCTGGTCCTTTGCCGATGGCAACGGCGACAG
 CTCGACATACCAATATATATAAATTGACGATATGCGAGCTGAATGGGA
 CCGAATGGCTGTCTGACCATTTTAATTGGGCAGTCGAGACTTTTGTGCTC
 TACCCAGTGGCGACTCATATCCTCTCACTGGGTTTCTTCACGACAAGTCA
 TTTCCTTGATGCGTTCGGTCTTGAGCTGTGTCAATTACAGGGTTTTGTG
 GCGGGCGGTACGTGCTCAGCAGCGTGTACGGCGCTTGTGCACTAGCAGCG
 CTCGTATGTTTTGTTATCCGTGCTGCCAAAAATTGTATGGCTTGCCGCTA
 TGCTCGTACCCGGTTTACCAACTTCATTGTGGATGACCGGGGGAGAATCC
 ATCGGTGGAGGTCTCCAATAGTGGTGGAAAAATTAGGTAAAGCTGACGTC
 GGCGGCGACCTTGTCAACCATCAAACATGTCATCCTCGAAGGAGTCAAAGC
 TCAACCCTTGACGAGGACTTCGGCCGAGCAATGGGAGGCCTAGATAATTT
 CTGCAACGATCCCACCGCCGCACAAAAGCTTGTGCTAGCCTTTAGCATCA
 CGTATACACCCATCATGATATACGCCCTTAAGGTGTCACGCGGCCGACTC
 TTGGGGTTGTTGCACATCTTGATATTTCTGAACTGTTCTTTCACGTTCCG
 ATACATGACATATATGCATTTTGAATCCACCAACCGTGTGCGCCTTACCA
 TGGGGGGCGTTGTGCGCCCTTCTGTGGGGCGTTTATAGTTTCATAGAGTCA
 TGGAAGTTTATCACTTCCAGATGCAGATTGTGTTGCCTAGGCCGGCGATA

ФІГУРА 11

повна геномна послідовність для SEQ ID NO:5

>96V198c1p49 повний геномний пасаж 49 (SEQ ID NO:5)
 CATTCCTGGCCCCCTGCCACCCACGTAAGAAAGTGCTGCAGGCCCTCCATCCGA
 TCCCAGCGTCTGGTAACCAAGCATACGCTGTGAGAAAGCCCGGACTAACA
 TCAGTGAACGGCACTCTGGTACCAGGACTTCGAGGCCCTCGTGCTGGGCGG
 CAAACGAGCTGTAAACGAGGAGTGGTTAACCTCGTCAAGTATGGCCGGT
 AAAAACCAGAGCCAGAAGAAAAAGAAAAATCCAGCTCCAATGGGGAATGG
 CCAGTCAGTCAATCAACTGTGCCAGCTGCTGGGCACAATGATAAAGTCCC
 AGCGCCAGCGACCCAGGGGAGGACAGGCTAAAAAGAAAAAGCCTGAGAAG
 CCACATTTCCCCCTGGCTGCTGAAGATGACGTCCGGCACCATCTCACCCA
 GACCGAGCGCTCCCTTTGCTTGCAATCGATCCAGACGGCTTTTAATCAAG
 GCGCAGGAACTGCGTCGCTTTCATCCAGCGGGAAGATCGGTTTTTCAGGTT
 GAGTTTATGCTACCGGTTGCTCATAAGTGCGCCTGATTCGCGTGACTTC
 TACATCCGCCGGTCAGGATGCAAATTAATTTGATAGTCAGGTGAATGGCC
 GCGATTGGCGTGTGGCCTCTGAGTCACCTATTCAATTAGGGCGATCACAT
 GGGGGTCAGACTTAATTAGGCAGGAACCATGTGACCGAAATT

ФІГУРА 1J