

Даний винахід стосується вакцини проти синдрому БСВС (багатосистемного синдрому виснаження свиней, що також називається багатосистемним синдромом виснаження після відлучення).

У нижченаведеному тексті цитуються різноманітні документи, в яких також цитуються або містяться посилання на різні документи. Це не означає, що будь-який з цих документів дійсно являє собою попередній рівень техніки стосовно даного винаходу. Всі документи, що цитуються в даному винаході, як і ті, що процитовані або містяться як посилання у цих документах, тим самим включаються в даний винахід у вигляді посилань.

PCV (від porcine circovirus, що означає цирковірус свиней) спочатку був виявлений як нецитопатогенна домішка в лінії ниркових клітин свиней PK/15. Цей вірус був зарахований до Circoviridae разом з вірусом анемії курчат (CAV, від chicken anaemia virus) і вірусом PBFVDV (від psittacine beak and feather disease virus, вірус захворювання дзьобата пір'я папуг). Це невеличкий безоболонковий вірус (15-24нм), загальною характеристикою якого є геном у вигляді кільцевої однострункової ДНК розміром від 1,76 до 2,31кб. Спочатку вважали, що цей геном кодує поліпептид приблизно у 30кД [Todd et al., Arch. Virol. 1991, 117: 129-135]. Однак в недавній роботі показано, що транскрипція більш складна [Meehan et al., 1997, 78: 221-227]. Більш того, не виявлено значної гомології в нуклеотидній послідовності або в загальних антигенних детермінантах між трьома типами відомих цирковірусів.

PCV з клітин PK/15 не вважається патогенним. Його послідовність відома [Meehan et al., J. Gen. Virol. 1997, 78: 221-227]. Лише зовсім нещодавно деякі автори стали вважати, що штами PCV можуть бути патогенними у зв'язку з синдромом БСВС [Gupi P.S. Nayar et al., Can. Vet. J. 1997, 38: 385-387 і Clark E.G., Proc. Am. Assoc. Swine Prac. 1997: 499-501]. Nayar et al. виявили ДНК PCV у свиней і синдромом БСВС методом ПЦР.

Синдром БСВС, виявлений у Канаді, США та Франції, клінічно характеризується поступовою втратою ваги і такими проявами, як тахіпнея, диспнея і жовтяниця. З погляду патології, його прояви включають лімфоцитичну та грануломатозну інфільтрацію, лімфаденопатію і, рідше, гепатит та лімфоцитичний і грануломатозний нефрит [Clark E.G., Proc. Am. Assoc. Swine Prac. 1997: 499-501; La Semaine Veterinaire No.26, supplement to La Semaine Veterinaire 1996. 834; La Semaine Veterinaire 1997, 857: 54; Gupi P.S. Nayar et al., Can. Vet. J. 1997, 38: 385-387].

Подавцям заявки вдалося виділити нові штами PCV із зразків тканини легень і лімфатичних вузлів, одержаних на фермах, розташованих у Канаді, США (Каліфорнія) і Франції (Бретань). Ці віруси виявлені в ушкоджених тканинах свиней з синдромом БСВС, але вони були відсутні у здорових свиней.

Крім того, подавці заявки просеквенували геноми 4 з цих штамів, а саме штамів, отриманих з Канади і США, а також 2 штамів з Франції. Штами виявляють дуже сильну гомологію один з одним на нуклеотидному рівні, що перевищує 96%, і більш слабку - зі штамом PK/15, біля 76%. Таким чином, нові штами можна розглядати як представників нового типу цирковірусу свиней, який надалі називається тип II, тоді як тип I поданий PK/15.

Очищені препарати 5 штамів були депоновані згідно з Будапештським договором в ECACC [Європейська колекція клітинних культур. Центр прикладної мікробіології та досліджень, Porton Down. Salisbury. Wiltshire SP4 0JG, Великобританія] у четвер 2 жовтня 1997 року:

- за номером V97100219 (надалі називається Impr. 1008PCV),
 - за номером V97100218 (надалі називається Impr. 1010PCV),
 - за номером V97100217 (надалі називається Impr. 999PCV),
- та у п'ятницю 16 січня 1998 року:
- за номером V9S011608 (надалі називається Impr. 1011-48285),
 - за номером V98011609 (надалі називається Impr. 1011-48121).

Подавці заявки на дослідях по експериментальному відтворенню багатосистемного синдрому виснаження свиней спостерігали, що парвовірус свиней у поєднанні з цирковірусом свиней може викликати ускладнення захворювання.

Тому предметом даного винаходу є вакцинація свиней за допомогою вакцини проти цирковірусу свиней, зокрема типу I або II, переважно типу II, у поєднанні з вакциною проти парвовірусу свиней. При цьому мається на увазі вакцинація або за допомогою двовалентної вакцини, або застосування одночасно вакцини проти цирковірусу свиней та вакцини проти парвовірусу свиней.

Контрольним штамом парвовірусу є штам NADL-2, який можна одержати з колекції ATCC за номером VR-742. Вакцинація проти парвовірусу свиней добре відома спеціалістам у цій галузі, і вакцини проти парвовірусу свиней є у продажу. Як приклад можна відзначити Parvovax® (інактивована вакцина проти парвовірусу свиней, яку постачає Merial). Також, наприклад, див. P. Vannier et al. Laval. Point Vét 1993. 25 (151): 53-60; G. Florent et al., Proceedings of the Ninth Congress of Pig Veterinary Society, July 15-18, 1986, Barcelona, Spain. Що стосується ДНК-вакцин, то можна порекомендувати, наприклад, WO-A-98 03658.

Отже, предметом даного винаходу є антигенний препарат проти синдрому БСВС, що включає щонайменше один антиген цирковірусу свиней (переважно цирковірусу типу II) та щонайменше один антиген парвовірусу свиней. Відповідно до винаходу, антиген цирковірусу свиней (переважно цирковірусу типу II) і антиген парвовірусу свиней обирають незалежно один від одного і групи, що складається з ослаблених цілісних живих антигенів, інактивованих цілісних антигенів, субодиночних антигенів, рекомбінантних живих векторів і ДНК-векторів. Мається на увазі, що в ці комбінації відповідно до винаходу можуть входити будь-які придатні антигени або різновиди антигенних препаратів і що зовсім не обов'язково застосовувати однакові різновиди для даної комбінації. Крім того, антигенний препарат може містити, як це звичайно буває, розчинник або наповнювач, прийнятний з ветеринарної точки зору, а також, але не обов'язково, ад'ювант, прийнятний з ветеринарної точки зору.

Предметом даного винаходу також є імуногенна композиція або вакцина проти синдрому БСВС, то включає ефективну кількість антигенного препарату проти цирковірусу та парвовірусу, як описано вище, у розчиннику або наповнювачі, прийнятному з ветеринарної точки зору, а також, але не обов'язково ад'ювант, прийнятний з ветеринарної точки зору. Імуногенна композиція викликає імунологічну реакцію, яка може мати

профілактичну дію, хоча й не обов'язково. Відповідно, термін "імуногенна композиція" включає "вакцині композиції" (оскільки перший термін може означати профілактичну композицію).

Предметом винаходу також є імунологічний набір або набір для вакцинації, що містить в окремих упаковках антигенний препарат, імуногенну композицію або вакцину проти цирковірусу свиней, і антигенний препарат, імуногенну композицію або вакцину проти парвовірусу свиней. Цей набір може мати різні характеристики, викладені вище щодо антигенних препаратів, імуногенних композицій та вакцин.

Предметом винаходу також є спосіб імунізації або вакцинації проти синдрому БСВС, що включає введення імуногенної композиції чи вакцини проти цирковірусу свиней і імуногенної композиції чи вакцини проти парвовірусу свиней або введення двовалентної імуногенної композиції чи вакцини, що включає в одному і тому ж складі антигенні препарати, специфічні для кожного вірусу. У цьому способі імунізації або вакцинації застосовуються ті ж самі вакцини, що визначені вище.

Предметом винаходу також є застосування антигенного препарату або імуногенної композиції чи вакцини проти парвовірусу, зокрема, як визначено вище, для одержання фармацевтичної композиції, призначеної для застосування при профілактиці синдрому БСВС, у поєднанні з антигенним препаратом або імуногенною композицією чи вакциною проти цирковірусу свиней.

Для приготування антигенних препаратів цирковірусу можна одержати після культивування в клітинах, особливо в клітинних лініях, наприклад, клітинах PK/15. Супернатанти або екстракти культури, необов'язково очищені стандартними методами, можуть застосовуватися як антигенний препарат.

Стосовно ослаблених антигенних препаратів і ослаблених імуногенних композицій або вакцин ослаблення може проводитися загальноприйнятими способами, наприклад, культивуванням в клітинах, переважно в клітинах свиней, особливо клітинних ліній, таких як PK/15 (наприклад, 50-150 пересівань, переважно порядку 100). Ці імуногенні композиції і вакцини загалом включають розчинник або розріджувач, прийнятний з ветеринарної точки зору, не обов'язково ад'ювант, прийнятний з ветеринарної точки зору, а також, але не обов'язково, стабілізатор для ліофілізації.

Ці антигенні препарати, імуногенні композиції і вакцини, переважно, повинні містити від 10^3 до 10^7 TCID₅₀ даного ослабленого вірусу.

Вони можуть являти собою антигенні препарати, імуногенні композиції і вакцини на основі інактивованого цілісного антигену. Інактивовані імуногенні композиції і вакцини, крім того, включають розчинник або розріджувач, прийнятний з ветеринарної точки зору, а також, але не обов'язково ад'ювант, прийнятний з ветеринарної точки зору.

Цирковіруси даного винаходу з тими фракціями, які можуть в них бути присутні, інактивують способами, відомими фахівцям з цієї галузі. Інактивація переважно проводиться хімічним шляхом, наприклад, обробкою антигену хімічним засобом, таким як формальдегід (формалін), параформальдегід, β -пропіолактон або етиленімін або його похідні. Більш прийнятним способом інактивації в даному винаході є обробка хімічним агентом, зокрема етиленіміном або β -пропіолактоном.

Більш прийнятно, інактивовані антигенні препарати та інактивовані імуногенні композиції і вакцини даного винаходу також можуть містити ад'ювант, переважно введений у вигляді емульсії, наприклад, вода в олії або олія у воді, відповідно до методів, добре відомих фахівцям з цієї галузі. Ад'ювантний компонент може також відбуватися шляхом інкорпорації загальноприйнятої ад'ювантної сполуки в активний інгредієнт.

В числі ад'ювантів, які можна використовувати, як приклад можна згадати гідроокис алюмінію, сапоніни [наприклад, сапонін Quillaja або Quil A; див. Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach. 1995, edited by Michael F. Powel and Mark J. Newman, Plenum Press, New York and London, p.210]. Avridine® [Vaccine Design, p.148]. DDA [диметилдіоктадецил-амоній бромід, Vaccine Design, p.157], поліфосфазен [Vaccine Design, p.204], або ж емульсії олії у воді на основі мінеральної олії, сквалену [наприклад, емульсія SPT, Vaccine Design, p.147], сквалену [наприклад, MF59. Vaccine Design, p.183], або емульсій води в олії на основі метаболізованої олії [переважно згідно з WO-A-94 20071], а також емульсій, описаних в US-A-5 422 109. Можна також обрати комбінації ад'ювантів, наприклад, Avridine® або DDA у поєднанні з емульсією.

Ці антигенні препарати, імуногенні композиції та вакцини переважно повинні містити від 10^5 до 10^8 TCID₅₀ даного інактивованого цілісного вірусу.

Ад'юванти для живих вакцин, описаних вище, можна обрати з числа тих, що наведені для інактивованих вакцин. Більш прийнятні емульсії. До тих, що зазначені для інактивованих вакцин, можна додати описані у WO-A-9416681.

Що стосується стабілізаторів для ліофілізації, то як приклад можна згадати SPGA [Bovarnik et al., J Bacteriol 59, 509, 950], такі вуглеводи, як сорбітол, манітол, крохмаль, сахароза, декстран або глюкоза, такі білки, як альбумін або казеїн, похідні цих сполук або буфери типу фосфатів лужноземельних металів.

Антигенні препарати, імуногенні композиції і вакцини, відповідно до винаходу, можуть містити один або декілька активних інгредієнтів (антигенів) з одного або кількох цирковірусів і/або парвовірусів даного винаходу.

Подавці заявки, крім того, одержали геноми 4 ізолятів цирковірусу свиней типу II, які позначені як SEQ ID №№1-4. Послідовність штаму PK/15 позначена як SEQ ID №5. Зрозуміло, винахід автоматично поширюється на еквівалентні послідовності, тобто послідовності, що не змінюють функціональність або штамоспецифічність описаної послідовності чи поліпептидів, кодованих цією послідовністю. Звичайно, сюди належать і послідовності, що відрізняються внаслідок виродження коду.

Винахід також поширюється на ті еквівалентні послідовності, що здатні гібридизуватися із зазначеною вите послідовністю в умовах високої строгості або мають високий ступінь гомології зі штамми винаходу.

Ці послідовності та їхні фрагменти можна з користю застосовувати для експресії поліпептидів in vitro або in vivo за допомогою відповідних векторів.

Зокрема, в геномних послідовностях цирковірусів типу II були ідентифіковані відкриті рамки зчитування (ORF 1-13), що утворюють фрагменти ДНК даного винаходу, які можна застосовувати з цією метою. Винахід охоплює будь-які поліпептиди, що містять щонайменше одну з цих відкритих рамок зчитування (відповідні амінокислотні послідовності). Переважно винахід охоплює білки, які в основному складаються з ORF4, ORF7,

ORF10 або ORF13.

Для експресії субодиниць *in vitro* як засіб експресії переважно застосовуються *E. coli* або бакуловіруси (US-A-4 745 051). Кодувальні послідовності або їх фрагменти можна інтегрувати в геном бакуловірусу (наприклад, бакуловірусу *Autographa californica*, інакше кажучи, Nuclear polyhedrosis virus, або AcNPV) і розмножити цей бакуловірус в клітинах комах, наприклад, *Spodoptera frugiperda* Sf9 (депозит CRL 1711 в ATTC). Субодиниці також можна продукувати в таких еукаріотичних клітинах, як дріжджі (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*), або клітинах ссавців (наприклад, CHO, BHK).

Предметом винаходу також є застосування як субодиниць таких поліпептидів, які продукуються *in vitro* за допомогою цих засобів експресії, а потім, але не обов'язково, очищених загальноприйнятими методами. Субодиничні імуногенні композиції і вакцини містять щонайменше один поліпептид, одержаний таким способом, або фрагмент в розчиннику чи розріджувачі, прийнятному з ветеринарної точки зору, а також, але не обов'язково, ад'ювант, прийнятний з ветеринарної точки зору.

Для експресії *in vivo* з метою одержання імуногенних композицій та вакцин, рекомбінантних живих або на основі ДНК, кодувальні послідовності або їх фрагменти вставляють у відповідний експресійний вектор в умовах, що дозволяють експресію поліпептиду. Як живі вектори можна переважно використовувати живі віруси, переважно здатні розмножуватися в свинях, непатогенні для свиней (природно непатогенні або зроблені такими), відповідно до методів, дооре відомих фахівцям з цієї галузі. Зокрема, можна використовувати герпесвіруси свиней типу вірусу хвороби Aujeszky, аденовіруси свиней, поксвіруси, особливо вірус коров'ячої віспи. Віруси віспи птахів, вірус віспи канарок, вірус віспи свиней. Також можна використовувати як вектори ДНК-вектори [WO-A-9011092, WO-A-9319813, WO-A-9421797, WO-A-9520660].

Отже, предметом винаходу також є вектори та імуногенні композиції або вакцини, рекомбінантні живі або на основі ДНК (полінуклеотиду), одержані таким способом, їх одержання та їх застосування, а також імуногенні композиції і вакцини, що додатково включають розчинник або розріджувач, прийнятний з ветеринарної точки зору.

За визначенням імуногенна композиція або вакцина на основі ДНК включає ДНК-вектор, що є кільцевою вакцинною плазмідною, суперскрученою або ні, чи лінійною молекулою ДНК, що несе та експресує *in vivo* нуклеотидну послідовність, яка кодує антигенний поліпептид.

Імуногенні композиції і вакцини, рекомбінантні та на основі ДНК, можуть містити ад'ювант.

Стосовно програм комбінованої імунізації або вакцинації можна також комбінувати імунізацію або вакцинацію проти цирковірусу свиней і парвовірусу свиней з імунізацією або вакцинацією проти інших патогенів свиней, зокрема тих, що можуть бути пов'язані з синдромом БСВС. Отже, імуногенна композиція або вакцина, відповідно до винаходу, може містити іншу валентність, що відповідає іншому патогену свиней, до числа яких входять PRRS (репродуктивний та респіраторний синдром свиней), і/або *Mycoplasma hyopneumoniae*, *E. coli*, і/або атрофічний риніт, і/або вірус псевдоскасу (хвороба Aujeszky), і/або свинячий грип, і/або *Actinobacillus pleuropneumoniae*, і/або холера свиней та їх комбінації. Переважно, у програмах імунізації або вакцинації і а у вакцинах, відповідно до винаходу, комбінують імунізацію або вакцинацію проти цирковірусу та парвовірусу, а також проти PRRS [WO-A-93/07898, WO-A-94/18311, FR-A-2 709 966: C. Spaiteyre et al., Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9 July 1998, p.139] і/або *Mycoplasma hyopneumoniae* [EP-A-597 852, EP-A-550 477, EP-A-571 648; O. Marton et al., p.157. 284. 285 і G. Reynaud et al., p.150 в зазначених вище Proceedings of the 15th IPVS Congress] і/або грипу свиней. Таким чином, можна використовувати будь-які придатні види імуногенних композицій або вакцин, зокрема будь-які комерційні вакцини, комбінуючи їх з імуногенною композицією або вакциною проти цирковірусу свиней та парвовірусу свиней, описаною у даному винаході.

Отже, предметом даного винаходу також є мультивалентні імуногенні композиції і вакцини, мультивакцинні набори і способи комбінованої імунізації або вакцинації, що дають можливість застосовувати такі програми комбінованої імунізації або вакцинації.

Далі винахід та його втілення будуть розкриті в необмежувальних прикладах, з посиланням на відповідні креслення.

Перелік фігур

Фіг.1. Послідовність геномної ДНК штаму Imp. 1011-48121.

Фіг.2. Послідовність геномної ДНК штаму Imp. 1011-48285.

Фіг.3. Послідовність геномної ДНК штаму Imp. 999.

Фіг.4. Послідовність геномної ДНК штаму Imp. 1010.

Фіг.5. Порівняння 4 послідовностей, що відповідають Фіг.1-4, з послідовністю штаму PK/15 PCV.

Перелік послідовностей

SEQ ID №1. Послідовність геномної ДНК штаму Imp. 1011-48121.

SEQ ID №2. Послідовність геномної ДНК штаму Imp. 1011-48285.

SEQ ID №3. Послідовність геномної ДНК штаму Imp. 999.

SEQ ID №4. Послідовність геномної ДНК штаму Imp. 1010.

SEQ ID №5. Послідовність геномної ДНК штаму PK/15.

Приклад 1. Культивування та виділення штамів цирковірусу свиней

Зразки тканин з легень та лімфатичних вузлів поросят збирали у Франції, Канаді і США. Ці поросята виявляли клінічні симптоми, типові для багатосистемного синдрому виснаження після відлучення. Для полегшення виділення вірусу зразки тканин заморожували при -70°C відразу після аутопсії.

Для виділення вірусу готували суспензії, що містять приблизно 15% зразка тканини, в мінімальному середовищі, яке містить солі Ерла (EMEM, Bio Whittaker UK Ltd., Wokingham, UK), пеніцилін (100од/мл) і стрептоміцин (100мкг/мл) (середовище MEM-SA), шляхом розтирання тканини перильним піском за допомогою стерильної ступки з товкачиком. Цей протертий препарат потім суспендували в MEM-SA, а далі центрифугували 30 хвилин при 3000×g при +4°C і збирали супернатант.

Перед інокуляцією клітинних культур додавали 100мкл хлороформу до 2мл кожного супернатанту і

перемішували безперервно 10 хвилин при кімнатній температурі. Цю суміш потім переносили в мікронентрифугальну пробірку, центрифугували 10 хвилин при 3000×g і збирали супернатант. Потім цей супернатант використовували як інокулум у дослідах по виділенню вірусу).

В усіх дослідах по виділенню вірусу використовували культури клітин PK/15, які, як відомо, не заражені цирковірусом свиней (PCV), пестивірусами, аденовірусами свиней та парвовірусами свиней (Allan G. et al., Pathogenesis of porcine circovirus experimental infections of colostrums-deprived piglets and examination of pig foetal material. Vet. Microbiol. 1995,44: 49-64).

Виділення цирковірусів свиней проводили за наступною методикою.

Моношари клітин PK/15 дисоціювати трипсинізацією (за допомогою суміші трипсин-версен. вереси = EDTA) конфлуентних культур і суспендували в середовищі MEM-SA, що містить 15% ембріональної телячої сироватки, не зараженої пестивірусом (= середовище MEM-G), до кінцевої концентрації приблизно 400000клітин/мл. Порції по 10мл цієї клітинної суспензії змішували і 2мл різних інокулумів, описаних вище, потім ці суміші розділяли по 6мл у дві колби Falcon на 25см². Ці культури інкубували при 37°C протягом 18 годин в атмосфері, що містить 10% CO₂.

Після інкубації культуральне середовище напівконфлуентних моношарів обробляли 300мМ D-глюкозаміну [Cat. # G48175, Sigma-Aldrich Company Limited, Poole, UK] [Tischr. I. et al., Arch. Virol. 1987. 96: 39-57] і продовжували інкубацію ще 48-72 годин при 37°C. Після цієї останньої інкубації одну з двох колб Falcon кожного інокулума піддавали 3 циклам заморожування/розморожування поспіль. Клітини PK/15 в колбі Falcon, що залишилася, обробляли розчином трипсин-версену, ресуспендували в 20мл середовища MEM-G та інокулювали в колби Falcon на 75см² при концентрації 400000клітин/мл. Свіжоінокульовані колби відразу ж "суперінфікували" додаванням 5мл відповідного лізату, одержаного після заморожування/розморожування.

Приклад 2. Підготовка зразків клітинної культури для виявлення цирковірусів свиней за імунофлуоресценцією та гібридизацією *in situ*

Відбирали 5мл "суперінфікованої" культури та інокулювали в чашку Петрі діаметром 55мм. що містила стерильне та знежирене покривне скло. Культури в колбах та на покривних стеклах інкубували при 37°C і обробляли глюккозаміном, як описано у Прикладі 1. Культури на покривних стеклах виймали через 24-48 годин після обробки глюккозаміном і фіксували або ацетоном протягом 10 хвилин при кімнатній температурі, або 10% формальдегідом в буфері протягом 4 годин. Після фіксації всі покривні стекла зберігати при -70°C на силікагелі до використання в дослідах по гібридизації *in situ* та імуноцитохімії з міченням.

Приклад 3. Виявлення послідовностей PCV методом гібридизації *in situ*

Гібридизацію *in situ* проводили у фіксованих формальдегідом зразках тканин хворих свиней, а також у препаратах клітинних культур, інокульованих для виділення вірусу (див. Приклад 2) та фіксованих на покривних стеклах.

Використовували повні геномні зонди, що відповідають цирковірусу свиней (PCV) PK/15 і вірусу інфекційної анемії курчат (CAV). Як специфічне джерело ДНК вірусу PCV використовували плазмиду pPCV1, що містить реплікативну форму геному PCV, клоновану у вигляді однієї вставки у 1,7 тисячі пар основ (т.п.о. або кБ) (Meehan B. et al., Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses, J. Gen. Virol. 1997, 78: 221-227). Аналогічну плазмиду pCAA1, що містить реплікативну форму цирковірусу птахів CAV у 2,3кБ, використовували як негативний контроль. Відповідні концентрати обох плазмід в гліцерині використавали для одержання та очищення плазмід методом лужного лізису [Sambrook J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. New York. 1989], які потім застосовували як матриці для приготування зондів. Цирковірусні зонди, що являють собою повні геноми PCV і CAV, одержували з очищених плазмід, описаних вище (по 1мкг для кожного зонда), і гексануклеотидних випадкових праймерів за допомогою комерційного набору для нерадіоактивного мічення ("DIG DNA labelling kit", Boehringer Mannheim. Lewes, UK), відповідно до рекомендацій постачальника.

Мічені дигоксигеніном зонди суспендували в 50-100мкл стерильної води перед використанням для гібридизації *in situ*.

Зразки тканин хворих свиней, залиті в парафін і фіксовані формальдегідом, а також препарат інфікованих клітинних культур, фіксовані формальдегідом, підготовляли для виявлення нуклеїнових кислот PCV у такий спосіб:

Зрізи товщиною 5мкм нарізали із залитих парафіном зразків тканин, вилучали парафін, а потім регідратували в розчинах спирту з концентрацією, що послідовно знижується. Тканинні зрізи і клітинні культури, фіксовані формальдегідом, інкубували по 15 та по 5 хвилин, відповідно, при 37°C у 0.5% розчині протеїнази K в 0,05М трис-HCl буфері, що містить 5мМ EDTA (pH7,6). Потім препарати поміщали в 1% розчин гліцерину в автоклаваній дистильованій воді на 30 секунд, промивали двічі 0,01М буфером PBS (фосфатний буфер у фізрозчині) (pH7,2), нарешті, промивали протягом 5 хвилин в стерильній дистильованій воді. Нарешті, їх висушували на відкритому повітрі і покривали розчинами зондів.

Кожний препарат тканини/зонда накривали чистим і знежиреним покривним склом і поміщали на 10 хвилин у піч при 90°C, а потім поміщали на лід на 1 хвилину і, нарешті, інкубували 18 годин при 37°C. Препарати потім занурювали в 2X сольовий буферний розчин цитрату натрію (SSC) (pH7,0) для того, щоб зняти захисні покривні стекла, потім промивали двічі по 5 хвилин 2X буфером SSC і, нарешті, промивали двічі по 5 хвилин буфером PBS.

Після цих промивок препарати занурювали в розчин 0,1М maleїнової кислоти, 0,15М NaCl (pH7.5) (maleїновий буфер) на 10 хвилин, а потім інкубували в 1% розчині блокувального реактиву (Cat. # 1096176, Boehringer Mannheim UK, Lewis, East Sussex, UK) в maleїновому буфері 20 хвилин при 37°C.

Потім препарати інкубували з моноклональним антитілом проти дигоксигеніну (Boehringer Mannheim), розбавленим 1:250 у блокувальному буфері, протягом 1 години при 37°C, промивали PBS. а далі інкубували з біотинілованим антитілом проти мишачого імуноглобуліну 10 хвилин при 37°C. Препарати промивали PBS і блокували ендогенну пероксидазну активність обробкою 0,5% розчину перекису водню в PBS протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Препарати знову промивали PBS і обробляли субстратом, 3-аміно-9-

діетилкарбазолом (ABC) (Cambridge Bioscience, Cambridge, UK), який готували безпосередньо перед застосуванням.

Після останнього промивання водопровідною водою препарати забарвлювали гематоксиліном, відмивали водопровідною водою і фіксували на покривних стеклах для мікроскопії за допомогою фіксувального розчину (GVA Mount, Cambridge Bioscience, Cambridge, UK). Експериментальні контролю полягали у застосуванні неспорідненого негативного зонда (CAV) і позитивного зонда (PCV) для зразків, одержаних з хворих свиней та свиней, що не хворіли.

Приклад 4. Виявлення PCV за допомогою імунофлуоресценції

Початкове скринування всіх препаратів клітинних культур, фіксованих ацетоном, проводили методом непрямой імунофлуоресценції (НІФ), використовуючи розведення 1:100 змішаної сироватки дорослих свиней. Ця змішана сироватка містить сироватки 25 дорослих свиноматок з Північної Ірландії і, як відомо, містить антитіла проти цілого ряду вірусів свиней, включаючи PCV: парвовірусу свиней, аденовірусу свиней і вірусу PRRS. НІФ проводили, покриваючи сироваткою (розведеною PBS) клітинні культури протягом 1 години при 37°C, а потім промивали двічі PBS. Після цього клітинні культури забарвлювали розведеним 1:80 в PBS кролячим антитілом проти імуноглобуліну свиней, кон'югованого з флуоресцеїн ізотіоціанатом, протягом 1 години, а потім промивали PBS і фіксували в гліцериновому буфері для мікроскопії в ультрафіолетовому світлі.

Приклад 5. Результати гібридизації in situ у тканинах хворих свиней

Гібридизація in situ за допомогою геномного зонда PCV на препаратах тканин, фіксованих формальдегідом, поросят з багатосистемним виснаженням з Франції, Канади і Каліфорнії виявила присутність нуклеїнових кислот PCV в ушкоджених тканинах у ряді досліджуваних тканин. Сигнал не спостерігався, коли геномний зонд PCV застосовували на тканинах свиней, які не хворіли, або коли застосовували зонд CAV на тканинах хворих свиней. Присутність нуклеїнових кислот PCV відзначалася в цитоплазмі та ядрах численних одноядерних клітин, що інфільтрують ушкоджені тканини легень у каліфорнійських поросят. Присутність нуклеїнових кислот PCV було також встановлено в пневмоцитах, епітеліальних клітинах бронхів і бронхіол та в ендотеліальних клітинах артерій, венул і лімфатичних судин.

У хворих французьких свиней присутність нуклеїнових кислот PCV виявлено в цитоплазмі численних фолікулярних лімфоцитів і одноядерних клітин всередині синусів лімфатичних вузлів. Нуклеїнові кислоти PCV також виявлялися в деяких синцитіях. На основі цих результатів були узяті зразки легень у каліфорнійських свиней, брижових лімфатичних вузлів у французьких свиней і органів канадських свиней з метою виділення нових штамів цирковірусу свиней.

Приклад 6. Результати клітинної культури нових штамів цирковірусу свиней та виявлення за: імунофлуоресценцією

Не спостерігалось ніяких цитопатичних ефектів у клітинних культурах, інокульованих зразками узятимися у французьких поросят (штам Imp. 1008), каліфорнійських поросят (штам Imp. 999) і каналських поросят (штам Imp. 1010), що виявляли клінічні симптоми багатосистемного синдрому виснаження. Проте, імуноічення препаратів, одержаних з інокульованих клітинних культур, фіксованих ацетоном та оброблених змішаною поліклональною сироваткою свиней, показало флуоресценцію в ядрах численних клітин з культур, інокульованих зразками легень каліфорнійських поросят (штам Imp. 999), брижових лімфатичних вузлів французьких поросят (штам Imp. 1008) і органів канадських поросят (штам Imp. 1010).

Приклад 7. Екстракція геномної ДНК цирковірусів свиней

Реплікативні форми нових штамів цирковірусу свиней (PCV) одержували з інфікованих культур клітин PK/15 (див. Приклад 1) (10 колб Falcon на 75см²), які збирали після 72-76 годин інкубації та обробляли глюкозаміном, як описано для клонування реплікативної форми CAV [Todd D. et al., Dot blot hybridization assay for chicken anaemia agent using a cloned DNA probe, J. Clin. Microbiol. 1991, 29; 933-939]. Двониткову ДНК цих реплікативних форм екстрагували модифікованим методом Хірта [Hirt, B. Selective extraction of polyoma virus DNA from infected cell cultures. J. Virol. 1967, 36: 365-369], як описано у Molitor [Molitor T.W. et al. Porcine parvovirus DNA: characterization of the genomic and replicative form DNA of two virus isolates, Virology, 1984, 137:241-254].

Приклад 8. Рестрикційна карта реплікативної форми геному штаму Imp. 999 цирковірусу свиней

ДНК (1-5мкг). екстраговану методом Хірта, обробляли нуклеазою SI (Amersham) відповідно до рекомендацій постачальника, після чого розщеплювали різними рестрикційними ферментами (Boehringer Mannheim, Lewis, East Sussex, UK) і продукти рестрикції поділяли методом електрофорезу в 1,5% агарозному гелі за присутності етидйброміду, як описано у Todd et al. [Purification and biochemical characterization of chicken anemia agent. J. Gen. Virol. 1990, 71: 819-823]. ДНК, екстрагована з культур штаму Imp. 999, має унікальний сайт EcoRI, два сайти SacI і немає сайту PstI. Тим самим цей рестрикційний профіль відрізняється від рестрикційного профілю PCV штаму PK/15 [Meehan B. et al. Sequence of porcine circovirus DNA; affinities with plant circoviruses. 1997. 78: 221-227], який навпаки має сайт PstI і немає сайту EcoRI.

Приклад 9. Клонування геному цирковірусу свиней штаму Imp. 999

Рестрикційний фрагмент розміром біля 1,8кб, одержаний при розщепленні двониткової реплікативної форми PCV штаму Imp. 999 рестрикційним ферментом EcoRI, виділяли після електрофорезу в 1,5% агарозному гелі (див. Приклад 3) за допомогою комерційного набору фірми Qiagen [QUIAEXH Gel Extraction Kit, Cat.# 20021, QIAGEN Ltd, Crawley, West Sussex, UK]. Потім цей рестрикційний фрагмент EcoRI-EcoRI лігували з вектором pGEM-7 (Promega, Medical Supply Company, Dublin, Ireland), який попередньо розщеплювали тим же самим рестрикційним ферментом (HcoRI) і дефосфорильовали згідно з стандартними методами клонування [Sambrook J. Et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989]. Одержані плазмиди вводили в штам хазяїна Escherichia coli JM109 (Stratagen, La Jolla, USA) шляхом трансформації стандартними методами. Рестрикційний фрагмент EcoRI-EcoRI штаму Imp. 999 також клонували в сайт EcoRI вектора pBlueScript SK+ (Stratagen Inc., La Jolla, USA). 3 клонів, одержаних в кожному штамі хазяїна, відбирати не менше 2 клонів, що містять фрагменти

очікуваного розміру. Одержані клони потім культурували і виділяли плазміни, що містять повний геном штаму Imp. 999, у невеличкому обсязі (2мл) або у великому обсязі (250мл) стандартними методами одержання та очищення плазмід.

Приклад 10. Секвенування геномної ДНК (двониткової реплікативної форми) PCV штаму Imp. 999

Нуклеотидну послідовність двох EcoRI-клонів Imp. 999 (клони pGEM-7/2 і pGEM-7/8) визначати дидезоксинуклеотидним методом Сангера за допомогою набору для секвенування "AmpliTaq DNA polymerase FS" (Cat.# 402079 PE Applied Biosystems, Warrington, UK) та автоматичного секвенатора AB1373A фірми Applied Biosystems відповідно до рекомендацій постачальника. Початкові реакції секвенування проводили за допомогою "прямого" і "зворотного" універсальних праймерів M13. Наступні реакції секвенування проводили методом "просування по ДНК". Олігонуклеотиди для цих наступних реакцій секвенування були синтезовані фірмою Life Technologies (Inchinnan Business Park, Paisley, UK).

Одержані послідовності збирали разом та аналізувати за допомогою програми MacDNASIS версії 3.2 (Cat.# 22020101, Appligene, Durham, UK). Різні відкриті рамки зчитування аналізували за допомогою алгоритму BLAST через сервер Національного Центру Біотехнологічної Інформації (NCBI, Bethesda, MD, USA).

Повна послідовність (фрагмент EcoRI-EcoRI) подана в SEQ ID №3 (Фіг.3). Вона являє собою загальну послідовність цього штаму, за початок якої було прийнято початок сайту EcoRI, тобто G як перший нуклеотид.

Така ж процедура проводилася для одержання послідовностей інших трьох ізолятів даного винаходу (див. SEQ ID №№1, 2 і 4 та Фіг.1, 2 і 4).

Розміри геному цих чотирьох штамів складають:

Imp. 1011-48285	1767 нуклеотидів
Imp. 1011-48285	1767 нуклеотидів
Imp. 999	1768 нуклеотидів
Imp. 1010	1767 нуклеотидів

Приклад 11. Аналіз послідовності PCV штаму Imp. 999

Коли послідовність штаму Imp. 999 перевірили на гомологію до послідовностей, що містяться у базі даних GenBank, була виявлена тільки одна істотна гомологія приблизно у 76% (на рівні нуклеїнової кислоти) до послідовності штаму PK/15 (інвентарні номери Y09921 і U49186) (див. Фіг.5).

На амінокислотному рівні перевірка на гомологію продуктів трансляції у 6 фазах в базах даних (алгоритм BLAST X на сервері NABI) виявила гомологію у 94% до відкритої рамки зчитування, яка теоретично відповідає репліказі вірусу BBTV, близького цирковірусам рослин (ідентифікаційний номер 1841515 у GenBank), і кодується послідовністю U49186 у базі даних GenBank.

Ніякі інші послідовності, що містяться у базах даних, не виявляли істотної гомології до послідовності, одержаної з PCV штаму Imp. 999.

Аналіз послідовностей, одержаних з культур штаму Imp. 999, що походять з ушкоджених тканин каліфорнійських поросят з клінічними симптомами багатосистемного синдрому виснаження, мітко показує, що цей ізолят вірусу є новим штамом цирковірусу свиней.

Приклад 12. Порівняльний аналіз послідовностей

Проводили порівняння нуклеотидних послідовностей 4 нових штамів PCV з послідовністю PCV PK/15 штаму (Фіг.5). Була складена матриця гомології між 4 новими штамми і штамом PK/15 з наступними результатами:

1=Imp. 1011-48121
2=Imp. 1011-48285
3=Imp. 999
4=Imp. 1010
5=PK/15

	1	2	3	4	5
1	1,0000	0,9977	0,9615	0,9621	0,7600
2		1,0000	0,9621	0,9632	0,7594
3			1,0000	0,9949	0,7560
4				1,0000	0,7566
5					1,0000

Гомологія між двома французькими штамми Imp. 1011-48121 і Imp. 1011-48285 складає понад 99% (0,9977).

Гомологія між двома північноамериканськими штамми Imp. 999 і Imp. 1010 також складає понад 99% (0,9949). Гомологія між французькими штамми і північноамериканськими штамми трохи перевищує 96%.

Гомологія між усіма цими штамми і PK/15 потрапляє між 75 і 76%.

Звідси можна зробити висновок, що штамми даного винаходу являють собою новий тип цирковірусу свиней, відмінний від типу, поданого штамом PK/15. Цей новий тип, виділений із свиней, що виявляють синдром БСВС, названо типом II цирковірусу свиней, тоді як PK/15 являє собою тип I. Штами, що належать до типу II, виявляють помітну гомогенність за нуклеотидною послідовністю, незважаючи на те, що вони виділені з регіонів, географічно дуже віддалених один від одного.

Приклад 13. Аналіз білків, кодованих геномом нових штамів PCV

Нуклеотидна послідовність ізоляту Imp. 1010 була визнана репрезентативною для решти штамів цирковірусу, що мають відношення до багатосистемного синдрому виснаження. Цю послідовність докладно аналізували за допомогою алгоритму BLASTX [Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990. 215: 403-410] і комбінації програм з набору Mac Vector 6.0 (Oxford Molecular Group, Oxford OX4 4GA. UK). У цій послідовності (кільцевому геномі) виявилось 13 відкритих рамок зчитування (ORF) розміром більше, ніж 20 амінокислот. Ці 13 ORF наводяться нижче:

Назва	Поча-ток	Кінець	Нитка	Розмір ORF, нуклеотидів	Розмір білка, амінокислот
ORF1	103	210	змістова	108	35
ORF2	1180	1317	змістова	138	45
ORF3	1363	1524	змістова	162	53
ORF4	398	1342	змістова	945	314
ORF5	900	1079	змістова	180	59
ORF6	1254	1334	змістова	81	26
ORF7	1018	704	антизмістова	315	104
ORF8	439	311	антизмістова	129	42
ORF9	190	101	антизмістова	90	29
ORF10	912	733	антизмістова	180	59
ORF11	645	565	антизмістова	81	26
ORF12	1100	1035	антизмістова	66	21
ORF13	314	1381	антизмістова	702	213

Положення початку та кінця кожного ORF належать до послідовності, поданої на Фіг.4 (SEQ ID №4). і геному штаму 1010. Межі ORF 1-13 ідентичні і для штаму 999. Вони також ідентичні для штамів 1011-48121 і 1011-48285, за винятком ORF 3 і 13:

ORF3 1432-1539, змістова, 108 нуклеотидів, 35 амінокислот;

ORF13 314-1377, антизмістова, 705 нуклеотидів, 35 амінокислот.

Чотири з цих 13 ORF мають значну гомологію з аналогічними ORF у геномі клонованого вірусу PCV PK/15. Проаналізували кожну з відкритих рамок зчитування, які присутні в геномі всіх ізолятів цирковірусу. що мають відношення до багатосистемного синдрому виснаження. Ці чотири ORF наводяться нижче:

Назва	Поча-ток	Кінець	Нитка	Розмір ORF, нуклеотидів	Розмір білка, амінокислот	Молекулярна маса
ORF4	398	1342	змістова	945	314	37,7кД
ORF7	1018	704	антизмістова	315	104	11,8кД
ORF10	912	733	антизмістова	180	59	6,5кД
ORF13	314	1381	антизмістова	702	233	27,8кД

Положення початку та кінця кожного ORF належать до послідовності, поданої на Фіг.4 (SEQ ID №4). Розмір ORF (у нуклеотидах) включає стопкодони.

Порівняння організації геному ізолятів PCV Imp. 1010 і PK/15 дозволило виявити 4 консервативних ORF в геномі цих двох вірусів. У нижченаведеній таблиці подані їхні ступені гомології:

ORF Imp. 1010/ORF PVC PK/15	Процент гомології
ORF4/ORF1	86%
ORF13/ORF2	66,4%
ORF7/ORF3	61,5% (у ділянці, що перекривається, із 104 амінокислот)
ORF10/ORF4	83% (у ділянці, що перекривається, із 59 амінокислот)

Найбільша ідентичність спостерігається між послідовностями ORF4 Imp. 1010 і ORF1 PK/15 (гомологія 86%). Це й очікувалося, тому що цей білок, напевно, бере участь у реплікації вірусної ДНК і абсолютно необхідний для розмноження вірусу [Meehan et al., J. Gen. Virol., 1997, 78: 221-227; Mankertz et al., J. Gen. Virol., 1998, 79: 381-384].

Ідентичність послідовності між ORF13 Imp. 1010 і ORF2 PK/15 менш сильна (гомологія 66,4%). проте кожна з них виявляє дуже консервативну N-кінцеву основну ділянку, ідентичну N-кінцевій ділянці основного структурного білка цирковірусу птахів CAV [Meehan et al., Arch. Virol., 1992, 124: 301-319]. Крім того, спостерігаються великі відмінності між ORF7 Imp. 1010 і ORF3 PK15 та між ORF10 Imp. 1010 і ORF4 PK/15. У кожному випадку є делеція C-кінцевої ділянки в ORF7 і ORF10 ізоляту Imp. 1010 при порівнянні з ORF3 і ORF4 PCV штаму PK/15. Найбільша гомологія послідовності спостерігається на рівні N-кінцевих ділянок ORF7/ORF3 (гомологія 61,5% у ділянці, то перекривається) і ORF10/ORF4 (гомологія 85% у ділянці, що перекривається).

Напевно, геном цирковірусу свиней має дуже складну організацію внаслідок його надзвичайної компактності. Основний структурний білок, напевно, утворюється за допомогою сплайсинга в декількох рамках зчитування, розташованих на одній і тій самій нитці геному цирковірусу свиней. Отже, можна вважати, що будь-яка з відкритих рамок зчитування (від ORF1 до ORF13), описаних у таблиці вище, може являти собою увесь або частину антигенного білка, кодованого цирковірусом свиней типу II, і тому може служити як антиген для специфічного діагнозу і/або вакцинації. Винахід тому стосується будь-якого з білків, що складаються в основному з ORF4, ORF7, ORF10 або ORF13.

Приклад 14. Інфекційна природа геному PCV, клонованого з нових штамів

Плазмиду pGEM-7/8, що містить повний геном (реплікативну форму) ізоляту Imp. 999, вводили в клітини PK/15 шляхом трансфекції за методом, описаним Meehan B. et al. [Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anemia agent: sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. Arch. Virol., 1992, 124: 301-319]. Імунофлуоресцентний аналіз (див. Приклад 4) першого пересівання після трансфекції позаражених клітин PK/15 показав, що плазмідна рGEM-7/8 здатна індукувати утворення інфекційного вірусу PCV. Наявність клону, що містить інфекційний генетичний матеріал

PCV, дозволяє проводити будь-які корисні зміни в геномі вірусу з метою одержання модифікованих вірусів PCV (або ослаблених у свинях, або дефектних), які можна використовувати для одержання ослаблених або рекомбінантних вакцин чи для одержання антигену для діагностичних наборів.

Приклад 15. Продукція антигенів PCV у культурі in vitro

Культигування незаражених клітин PK/15 та розмноження вірусу проводили тими ж методами, то й у Прикладі 1. Інфіковані клітини збирали після трипсинізації після 4 днів інкубації при 37°C і підраховували. При наступному пересіванні їх інокулювали з розрахунку 400000 інфікованих клітин на 1мл.

Приклад 16. Інактивація вірусних антигенів

По закінченні культивування вірусу збирали інфіковані клітини і лізували за допомогою ультразвуку (Branson Sonifier) або за допомогою подрібнювача типу ротор-статор (UltraTurrax, IKA). Цю суспензію потім центрифугували 30 хвилин при 3700×g. Вірусну суспензію інактивували 0,1% етиленіміном протягом 18 годин при 37°C або 0,5% β-пропіолактоном протягом 24 годин при 28°C. Якщо титр вірусу перед інактивацією недостатній, вірусну суспензію концентрували ультрафільтрацією за допомогою мембрани, що має межу виключення 300кД (Millipore PTMK300). Суспензію інактивованого вірусу зберігали при +5°C.

Приклад 17. Приготування вакцини у вигляді емульсії на основі мінеральної олії

Вакцину готували відповідно до наступної формули:

- суспензія інактивованого цирковірусу свиней 250мл
- Montanide® ISA 70 (SEPPIC) 750мл.

Водну фазу і олійну фазу окремо стерилізували фільтруванням. Емульсію одержували шляхом змішування та гомогенізації інгредієнтів за допомогою турбінного емульгатора Silverson.

Одна доза вакцини містить біля $10^{7,5}$ TCID₅₀. Обсяг однієї дози вакцини складає 0,5мл для внутрішньошкірного введення та 2мл для внутрішньом'язового введення.

Ця вакцина застосовується у програмі вакцинації проти багатосистемного синдрому виснаження у поєднанні з вакциною Parvovax®.

Приклад 18. Приготування вакцини у вигляді емульсії на основі метаболізованої олії

Вакцину готували відповідно до наступної формули:

- суспензія інактивованого цирковірусу свиней 200мл
- Dehymuls HRE 7 (Henkel) 60мл
- Radia 7204 (Oleofina) 740мл.

Водну фазу та олійну фазу окремо стерилізували фільтруванням. Емульсію одержували шляхом змішування і гомогенізації інгредієнтів за допомогою турбінного емульгатора Silverson.

Одна доза вакцини містить біля $10^{7,5}$ TCID₅₀. Обсяг однієї дози вакцини складає 2мл для внутрішньом'язового введення.

Ця вакцина застосовується у програмі вакцинації проти багатосистемного синдрому виснаження у поєднанні з вакциною Parvovax®.

Приклад 19. Результати непрямой імунофлуоресценції щодо штамів вірусу PCV з США та Франції і забруднення в PK/15 за допомогою гіперімунної сироватки (PCV-T) та серії моноклональних антитіл F99, одержаних з PK/15, і гіперімунної сироватки, одержаної з канадського штаму (PCV-C)

ВІРУС			
	PK/15	США	Франція
Антисироватка PCV-T	>6400	200	800
Антисироватка PCV-C	200	>6,400	>6,400
F99 1H4	>10000	<100	100
F99 4B10	>10000	<100	<100
F99 2B7	>10000	100	<100
F99 2E12	>10000	<100	<100
F99 1C9	>10000	<100	100
F99 2E1	>10000	<100	<100
F99 1H4	>10000	100	<100

* Зворотна величина останнього розбавлення сироватки або моноклонального антитіла, що дає позитивну реакцію при непрямій імунофлуоресценції.

Приклад 20. Експериментальне вироблення багатосистемного синдрому виснаження свиней (Протокол 1)

Триденних гнотобіотичних поросят, одержаних кесаревим розтином і які містяться в ізоляторі, інокулювали розчином вірусу PCV. Застосовувалися віруси PCV типу II, а саме ізолят Impr. 1010 та вірус, одержаний з гомогенатів лімфатичних вузлів хворих свиней.

Протокол 1

Було утворено 5 груп. Усіх поросят інокулювали у віці 3 днів, вводячи ороназально 1,5мл вірусного розчину відповідно до наступної схеми:

Група	Кількість	Вірус	Доза
A	6	гомогенат лімфатичних вузлів	невідомо
B	5	Impr. 1010 (мале число пересівань)	10^2 TCID ₅₀
C	4	Impr. 1010 (велике число пересівань)	10^2 TCID ₅₀
D	2	лізат клітин PK/15, вільних від вірусу PCV	---
E	3	---	---

Результати експериментальної обробки

За час 5-тижневого спостереження у поросят не з'явилося клінічних симптомів, окрім одного у групі B, що проявляв істотне виснаження. При аутопсії поросят у групах A, B і C виявляли гіперплазію лімфатичних вузлів (їхні розміри у 2-10 разів більші, ніж у тварин у групах D і E). зокрема підщелепних, бронхіальних,

брижових, клубових та стегових вузлів. Ця гіперплазія супроводжувалася значною експансією коркових зон за рахунок інфільтрації моноцитів і макрофагів. Поросята у групах А, В і С також проявляли гіперплазію бронхіальної лімфоїдної тканини.

У кожній з груп А, В і С було по одному поросяті з пневмонією.

У поросяти в групі В, що проявляв істотне виснаження, та в одного поросяти у групі А була виразка шлунка. Крім того, в усіх тварин у групах А, В і С був міозит у м'язовій стінці шлунку та кишечнику.

У більшості тварин у групах А, В і С був міокардит, багатовогнищевий гепатит з інфільтрацією лімфоцитів, макрофагів та еозинофілів, а також інтерстиціальний нефрит коркового і мозкового шару нирок.

В одного поросяти у групі С була збільшена печінка, що мала розсіяні світлі вогнища на поверхні.

Не спостерігалось жодних ушкоджень у поросят в групах D і E.

Цирковірус виділяли з органів поросят у групах А, В і С.

Приклад 21. Експериментальне відтворення багатосистемного синдрому виснаження свиней (Протоколи 2 і 3)

Звичайних поросят, тільки ізольованих від своїх матерів з моменту народження, інокулювали вірусними розчинами PCV типу II, парвовірусу свиней або сумішшю з обох вірусів.

Як віруси PCV типу II використовували ізоляти Imp. 1010 і Imp. 1011 (штам 48121). Як вірус PPV використовували ізолят канадського походження Imp. 1005. Послідовність цього вірусу (секвеновано 1/3 геному) є ідентичною послідовності інших відомих штамів парвовірусу свиней (штамів NADL-2 та Kresse).

Застосовували два експериментальних протоколи.

Протокол 2

Було утворено 3 групи з 3-денних поросят. Усіх поросят інокулювали, вводючи ороназально 1 мл вірусного розчину відповідно до наступної схеми:

Група	Кількість	Вірус	Доза
А	5	Imp.1010	10^6 TCID ₅₀
В	5	Imp.1010+Imp.1005	5×10^6 TCID ₅₀
С(контроль)	2	---	---

Результати експериментальної обробки

Група А: 2 поросяти померли через 21 день після інокуляції і 1 поросє було забите гуманним чином через 24 дні після інокуляції.

Група В: 1 поросє померло через 23 дні після інокуляції і 1 поросє було забите гуманним способом через 24 дні після інокуляції.

Аутопсія поросят, померлих після зараження, показала наявність істотних макроскопічних ушкоджень: наявність рідини в плевральній порожнині, легеневої едеми, крововиливів у нирках, білястих пошкоджень у вигляді шпилькової головки у нирках, некрозу печінки. Ці ушкодження ідентичні тим, які спостерігаються при польових випадках.

Аутопсія забитих поросят не показала наявності макроскопічних ушкоджень.

Гістологічне дослідження органів, узятих у поросят з груп А і В, померлих після зараження, а також забитих поросят з цих 2 груп, показало повну картину пошкоджень, типову для багатосистемного синдрому виснаження свиней, яка спостерігається у тварин в польових умовах: некроз печінки, некроз лімфатичних вузлів, вогнищевий некроз і сильні крововиливи в нирках, наявність синцитіїв в легенях, сильний некроз гепатоцитів з ядерними вкрапленнями.

Слід зазначити, що у всіх цих ушкодженнях (померлих або забитих поросят) спостерігалася масивна кількість антигену PCV, тоді як антиген PPV не був виявлений в тих самих ушкодженнях.

Не виявлено жодних ушкоджень у контрольних поросят в групі С.

Протокол 3

Було утворено 4 групи з 4-тижневих поросят. Усіх поросят інокулювали, вводючи ороназально 1 мл вірусного розчину відповідно до наступної схеми:

Група	Кількість	Вірус	Доза
А(контроль)	2	---	---
В	4	Imp.1005 (PPV)	$10^{5.3}$ TCID ₅₀
С	4	Imp.1011 (PCV)	10^5 TCID ₅₀
D	4	Imp.1005+Imp.1011	$10^5 + 5 \times 10^4$ TCID ₅₀

Результати експериментальної обробки

Одного контрольного поросє та по 2 поросяти у кожній експериментальній групі (В, С і D) забивали гуманним способом і піддавали аутопсії через 2 тижні після інокуляції. Спостерігалися значні імуногістологічні ушкодження у двох поросят в групі D (спільне зараження PCV+PPV). Слід зазначити, що в цих ушкодженнях не виявлялося присутності парвовірусу свиней, хоча й спостерігалася сероконверсія до парвовірусу свиней у всіх поросят в групі D.

Не спостерігалось жодних макроскопічних або гістологічних ушкоджень у контрольного поросяти та у поросят в інших групах.

Отже, видається ймовірним, що комбінація PCV+PPV дає можливість відтворювати гістологічні ушкодження, типові для багатосистемного синдрому виснаження свиней. У цих двох експериментальних протоколах відзначається, що інокуляція одним PCV, так само як сумішшю PCV+PPV, веде до більш або менш повного відтворення багатосистемного синдрому виснаження свиней, однак в ушкоджених тканинах виявляється тільки цирковірус свиней. Навпаки, експериментальне зараження одним PPV (група В протоколу 3) не викликає появи макроскопічних або гістологічних ушкоджень, проте за присутності PCV ушкодження з'являються у 4-тижневих поросят (група D протоколу 3).

Послідовність ізоляту PCV Imp. 1011-48121 (SEQ ID № 1)

1 AATTCAACCT TAACCTTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG
51 GGGGTTTGAG CCCCTCCTG GGGGAAGAAA GTCATTAATA TTGAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GGCCTTCTGA CTGTGGTTCG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TGCGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
201 CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC
301 CTTGGATACG TCATATCTGA AAACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCGAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCCATA AAAGTGGGT
451 GTTCACTCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGATC
501 TTCCAATATC CCTATTTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTG GCTAATTTTG TGAAGAAGCA
601 GACTTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCGAAAGG AACAGATCAG CAGAATAAAG AATACTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTGA TGGAGTGTGG AGCTCCTAGA TCTCAGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTTGTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCTGTA ACGTTTGTC GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTTGA AAGTGAGCGG GAAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACTAA
901 TGTACACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAGC AAATGGGCTG
Фіг. 1
951 CTAATTTTGC AGACCCGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCCTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGAAGTGTAC CTTTTTTGGC CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTTT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGGG
1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCAACCCT
1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTT TATTATTCAT TAAGGGTTAA GTGGGGGGTC
1401 TTTAAGATTA AATTCTCTGA ATTGTACATA CATGGTTACA CGGATATTGT
1451 ATTCTGGTC GTATATACTG TTTTCGAACG CAGTGCCGAG GCCTACGTGG
1501 TCTACATTTC CAGCAGTTG TAGTCTCAGC CACAGCTGGT TTCTTTGTT
1551 GTTTGGTTGG AAGTAATCAA TAGTGGAATC TAGGACAGGT TTGGGGGTAA
1601 AGTAGCGGGA GTGGTAGGAG AAGGGCTGGG TTATGGTATG GCGGGAGGAG
1651 TAGTTTACAT AGGGGTCATA GGTGAGGGCT GTGGCCTTG TTACAAAGTT
1701 ATCATCTAGA ATAACAGCAC TGGAGCCAC TCCCCTGTCA CCCTGGGTGA
1751 TCGGGGAGCA GGGCCAG

Фіг. 1 (продовження та закінчення)

Послідовність ізоляту PCV Imp. 1011-48285 (SEQ ID № 2)

1 AATTCAACCT TAACCTTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG
51 GGGGTTTGGAG CCCCTCCTG GGGGAAGAAA GTCATTAATA TTGAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGTTTTGA CTGTGGTTCCG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TCGGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
201 CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGCGGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC
301 CTTGGAACG TCATATCTGA AAACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCCATA AAAGTGGGT
451 GTTCACTCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGATC
501 TTCCAATATC CCTATTGAT TATTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTG GCTAATTTTG TGAAGAAGCA
601 GACTTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCGAAAGG AACAGATCAG CAGAATAAAG AATACTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTGA TGGAGTGTGG AGCTCCTAGA TCTCAGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CTTGTTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGAGAGCA GCACCTGTA ACGTTTGTA GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTTGA AAGTGAGCG GAAAATGCAG AAGCGTATT GGAAGACTAA
901 TGACACGTC ATTGTGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAGC AAATGGGCTG

Фіг. 2

951 CTAATTTTGC AGACCCGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCCTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGAAGTGTAC CTTTTTTGGC CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTTT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGGA
1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTACCCCTT
1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTAAT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TAAGGGTTAA GTGGGGGGTC
1401 TTTAAGATTA AATTCTCTGA ATTGTACATA CATGGTTACA CGGATATTGT
1451 ATTCCTGGTC GTATATACTG TTTTCGAACG CAGTGCCGAG GCCTACGTGG
1501 TCTACATTC CAGTAGTTTG TAGTCTCAGC CACAGCTGAT TTCTTTTGT
1551 GTTTGGTTGG AAGTAATCAA TAGTGGAATC TAGGACAGGT TTGGGGGTAA
1601 AGTAGCGGGA GTGGTAGGAG AAGGGCTGGG TTATGGTATG GCGGGAGGAG
1651 TAGTTTACAT AGGGGTCATA GGTGAGGGCT GTGGCCTTTG TTACAAAGTT
1701 ATCATCTAGA ATAACAGCAC TGGAGCCAC TCCCCTGTCA CCCTGGGTGA
1751 TCGGGGAGCA GGGCCAG

Фіг. 2 (продовження та закінчення)

Послідовність ізоляту PCV Imp. 999 (SEQ ID № 3)

1 AATTCAACCT TAACCTTTTT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GTATAGAGAT
51 TTTGTTGGTC CCCCTCCCG GGGGAACAAA GTCGTCAATA TTAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGTTCTGA CTGTGGTAGC CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TCGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
201 CCAACGGTAG CGGTGGCGG GGTGGACGAG CCAGGGCGG CGCGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCG GGGCGGTGTC TTCTTCTGCG GTAACGCCTC
301 CTTGGATACG TCATAGCTGA AACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGG AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCACATA AAAGGTGGGT
451 GTTCACGCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGAGC
501 TCCCAATCTC CCTATTTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTT GCTAATTTTG TGAAGAAGCA
601 AACTTTTAAT AAAGTGAAG GGTATTTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCCAAAGG AACTGATCAG CAGAATAAAG AATATTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTTA TTGAATGTGG AGCTCCTCGA TCTCAAGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTTGTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCTGTA ACGTTTGTA GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTTGA AAGTGAGCG GAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACCAA
901 TGTACACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAAGC AAATGGGCTG

Фір. 3

951 CTAATTTTGC AGACCCGGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGTGGCTG CCGTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGAAGTGAT CTTTTTTGGC CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTCT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGA
1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCAACCTT
1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TAAGGGTTTA AGTGGGGGGT
1401 CTTTAAGATT AAATCTCTG AATTGTACAT ACATGGTTAC ACGGATATTG
1451 TAGTCTGGT CGTATATACT GTTTTCGAAC GCAGTGCCGA GGCCTACGTG
1501 GTCCACATTT CTAGAGGTTT GTAGCCTCAG CCAAAGCTGA TTCCTTTTGT
1551 TATTTGGTTG GAAGTAATCA ATAGTGGAGT CAAGAACAGG TTTGGGTGTG
1601 AAGTAACGGG AGTGGTAGGA GAAGGTTGG GGGATTGTAT GCGGGAGGA
1651 GTAGTTTACA TATGGGTCAT AGGTTAGGGC TGTGGCCTTT GTTACAAAGT
1701 TATCATCTAG AATAACAGCA GTGGAGCCCA CTCCCCTATC ACCCTGGGTG
1751 ATGGGGGAGC AGGGCCAG

Фір. 3 (продовження та закінчення)

Послідовність ізоляту PCV Imp. 1010 (SEQ ID № 4)

1 AATTCAACCT TAACCTTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GTATAGAGAT
51 TTTGTTGGTC CCCCTCCCG GGGGAACAA GTCTCAATT TTAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGTTGTGA CTGTGGTACG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TGCGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCTTCT
201 CCAACGGTAG CGGTGGCGG GGTGGACGAG CCAGGGCGG CGGCGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCG GGGCGGTGTC TTCTTCTGCG GTAACGCCTC
301 CTTGGATACG TCATAGCTGA AACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCACATA AAAGTGGGT
451 GTTCACGCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGAGC
501 TCCAATCTC CCTATTGAT TATTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTT GCTAATTTTG TGAAGAAGCA
601 AACTTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCCAAAGG AACTGATCAG CAGAATAAG AATATTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTTA TTGAATGTGG AGCTCCTCGA TCTCAAGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTGTGTGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCTGTA ACGTTTGTA GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTTGA AAGTGAGCG GAAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACCAA
901 TGTACACGTC ATTGTGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAAGC AAATGGGCTG

Фіг. 4

951 CTAATTTTGC AGACCCGGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCGTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGAAGTGAT CTTTTTGGC CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTCT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGA
1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCTT
1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TAAGGGTTTA AGTGGGGGGT
1401 CTTTAAGATT AAATCTCTG AATTGTACAT ACATGGTTAC ACGGATATTG
1451 TATTCCTGGTC GTATATACTG TTTTCGAACG CAGTGCCAC GCCTACGTC
1501 TCTACATTC CAGCAGTTG TAGTCTCAGC CACAGCTGGT TTCTTTTGT
1551 GTTTGGTTGG AAGTAATCAA TAGTGGAATC TAGGACAGGT TTGGGGGTAA
1601 AGTAGCGGGA GTGGTAGGAG AAGGGCTGGG TTATGGTATG GCGGGAGGAG
1651 TAGTTTACAT AGGGGTCATA GGTGAGGGCT GTGGCCTTGG TTACAAAGTT
1701 ATCATCTAGA ATAACAGCAC TGGAGCCAC TCCCCTGTCA CCCTGGGTGA
1751 TCGGGGAGCA GGGCCAG

Фіг. 4 (продовження та закінчення)

Множинне порівняння послідовностей програмою CLUSTAL W

```

PCVPK-15      AATTTCATATTTAGCCTTTCTAATACGGTAGTATTGAAAGGTAGGGTAGGGGTTGGTG
IMP99-ECO     AATTCAACCTTAACTTTTATTCTGTAGTATTCAAAGGTATAGAGATTTTGTGGTC
IMP1010-ST    AATTCAACCTTAACTTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGTATAGAGATTTTGTGGTC
IMP1011-48    AATTCAACCTTAACTTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGCACAGAGCGGGGTTTGAG
IMP1011-48    AATTCAACCTTAACTTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGCACAGAGCGGGGTTTGAG
*****      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

PCVPK-15      CCGCCTGAGGGGGGAGAACTGGCCGATGTTGAATTTGAGGTAGTTAACATCCAAGAT
IMP99-ECO     CCCCTCCCGGGGGAAACAAGTCGTCAATATTAAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAG
IMP1010-ST    CCCCTCCCGGGGGAAACAAGTCGTCAATTTTAAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAG
IMP1011-48    CCCCTCCTGGGGGAAGAAAGTCATTAATATTGAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAG
IMP1011-48    CCCCTCCTGGGGGAAGAAAGTCATTAATATTGAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAG
*****      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

PCVPK-15      GGC--TGCGAGTATCCTCTTTT-ATGGTGAGTACAAATCTGTAGAAAGCGGGAATTG
IMP99-ECO     GGCCTTCTGACTGTGTAGCCTTGACAGTATATCCGAAGGTGCGGGAGAGCGGGTGTG
IMP1010-ST    GGCCTTCTGACTGTGTAGCCTTGACAGTATATCCGAAGGTGCGGGAGAGCGGGTGTG
IMP1011-48    GGCCTTCTGACTGTGTTCGCTTGACAGTATATCCGAAGGTGCGGGAGAGCGGGTGTG
IMP1011-48    GGCCTTTTGACTGTGGTTGCTTGACAGTATATCCGAAGGTGCGGGAGAGCGGGTGTG
*****      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

PCVPK-15      AAGATACCCGTCCTTTCGGCGCATCTGTAACGGTTCTGAAGCGGGGTGTGCCAATAT
IMP99-ECO     AAGATGCCATTTTTCCTTCTCAACGGTAGCGGTGGC-GGGGTGGA-CGAGCCAGGGC
IMP1010-ST    AAGATGCCATTTTTCCTTCTCAACGGTAGCGGTGGC-GGGGTGGA-CGAGCCAGGGC
IMP1011-48    AAGATGCCATTTTTCCTTCTCAACGGTAGCGGTGGC-GGGGTGGA-CGAGCCAGGGC
IMP1011-48    AAGATGCCATTTTTCCTTCTCAACGGTAGCGGTGGC-GGGGTGGA-CGAGCCAGGGC
*****      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

PCVPK-15      GGTCTTCCGGAGGATGTTTCCAAGATGGCTGCGGGGCGGGTCTTCTTCTCGCGTAA
IMP99-ECO     GG----CGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGGCGGTGTCTTCTTCTCGCGTAA
IMP1010-ST    GG----CGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGGCGGTGTCTTCTTCTCGCGTAA
IMP1011-48    GG----CGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGGCGGTGTCTTCTTCTCGCGTAA
IMP1011-48    GG----CGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGGCGGTGTCTTCTTCTCGCGTAA
*****      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

PCVPK-15      CGCCTCCTTGGCCAGTCATCCTATAAAAGTGAAAGAGTGCCTGCTGTAGTATTACCA
IMP99-ECO     CGCCTCCTTGGATACGT CATAGC-TGAAAAAGAAAGAGTGCCTGTA--AGTATTACCA
IMP1010-ST    CGCCTCCTTGGATACGT CATAGC-TGAAAAAGAAAGAGTGCCTGTA--AGTATTACCA
IMP1011-48    CGCCTCCTTGGATACGT CATATC-TGAAAAAGAAAGAGTGCCTGTA--AGTATTACCA
*****      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

Фиг. 5

PCVPK-15      GCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCG--TCAGTG--AAAAAGCAAGCAAGAA
IMP99-ECO     GCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCAGCAAGAA
IMP1010-ST    GCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCAGCAAGAA
IMP1011-48    GCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCAGCAAGAA
IMP1011-48    GCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCAGCAAGAA
*****      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

PCVPK-15      -----AAGCGGCCGCAACCCCATAAAGAGTGGGTGTTACCCCTTAATAATCCTTC
IMP99-ECO     GAATGGAAGAACCGCACCCCAACACATAAAGCTGGGTGTTACCGCTGAATAATCCTTC
IMP1010-ST    GAATGGAAGAACCGCACCCCAACACATAAAGCTGGGTGTTACCGCTGAATAATCCTTC
IMP1011-48    GAATGGAAGAACCGCACCCCAACCCATAAAGCTGGGTGTTCACTCTGAATAATCCTTC
IMP1011-48    GAATGGAAGAACCGCACCCCAACCCATAAAGCTGGGTGTTCACTCTGAATAATCCTTC
*****      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

PCVPK-15      CGAGGAGGAGAAAAACAAATACGGGAGCTTCCAATCTCCCTTTTGAATTATTTGTTTG
IMP99-ECO     CGAAGACGAGCGCAAGAAAAACGGGAGCTCCCAATCTCCCTATTTGATTATTTATTTGT
IMP1010-ST    CGAAGACGAGCGCAAGAAAAACGGGAGCTCCCAATCTCCCTATTTGATTATTTATTTGT
IMP1011-48    CGAAGACGAGCGCAAGAAAAACGGGATCTTCCAATATCCCTATTTGATTATTTATTTGT
IMP1011-48    CGAAGACGAGCGCAAGAAAAACGGGATCTTCCAATATCCCTATTTGATTATTTATTTGT
*****      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

PCVPK-15      CGGAGAGGAAGGTTTGAAGAGGGTAGAACTCCTCACCTCCAGGGGTTTGCGAATTTTGC
IMP99-ECO     TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGGTTGCGTAATTTTGT
IMP1010-ST    TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGGTTGCGTAATTTTGT
IMP1011-48    TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGGTTGCGTAATTTTGT
IMP1011-48    TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGGTTGCGTAATTTTGT
*****      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

PCVPK-15      TAAGAAGCAGACTTTTAACAAGGTGAAGTGGTATTTGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAA
IMP99-ECO     GAAGAAGCAAACTTTTAATAAAGTGAAGTGGTATTTGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAA
IMP1010-ST    GAAGAAGCAAACTTTTAATAAAGTGAAGTGGTATTTGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAA
IMP1011-48    GAAGAAGCAGACTTTTAATAAAGTGAAGTGGTATTTGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAA
IMP1011-48    GAAGAAGCAGACTTTTAATAAAGTGAAGTGGTATTTGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAA
*****      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

PCVPK-15      AGCGAAAGGAACCGACCAGCAGAAATAAGAACTACTGCAGTAAAGAAGGCCACATACTTAT
IMP99-ECO     AGCCAAAGGAACCTGATCAGCAGAAATAAGAACTACTGCAGTAAAGAAGGCCAATCTACTTAT
IMP1010-ST    AGCCAAAGGAACCTGATCAGCAGAAATAAGAACTACTGCAGTAAAGAAGGCCAATCTACTTAT
IMP1011-48    AGCGAAAGGAACAGATCAGCAGAAATAAGAACTACTGCAGTAAAGAAGGCCAATCTACTGAT
IMP1011-48    AGCGAAAGGAACAGATCAGCAGAAATAAGAACTACTGCAGTAAAGAAGGCCAATCTACTGAT
*****      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

```

Фиг. 5 (продовження)

PCVPK-15	CGAGTGTGGAGCTCCGCGGAACCAAGGGGAAGCGCAGCGACCTGTCTACTGCTGTGAGTAC
IMP99-ECO	TGAATGTGGAGCTCTCGATCTCAAGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTAC
IMP1010-ST	TGAATGTGGAGCTCTCGATCTCAAGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTAC
IMP1011-48	GGAGTGTGGAGCTCTAGATCTCAGGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTAC
IMP1011-48	GGAGTGTGGAGCTCTAGATCTCAGGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTAC
	* * * * *
PCVPK-15	CCTTTTGGAGACGGGGCTTTGGTGACTGTAGCCGAGCAGTTCCTGTAACTGTGAG
IMP99-ECO	CTTGTGGAGACGGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCTGTAACTTTGTTCAG
IMP1010-ST	CTTGTGGAGACGGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCTGTAACTTTGTTCAG
IMP1011-48	CTTGTGGAGACGGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCTGTAACTTTGTTCAG
IMP1011-48	* * * * *
PCVPK-15	AAATTTCCGCGGGCTGGCTGAACCTTTGAAAGTGAGCGGGAAGATGCAGCAGCGTATTG
IMP99-ECO	AAATTTCCGCGGGCTGGCTGAACCTTTGAAAGTGAGCGGGAAGATGCAGCAGCGTATTG
IMP1010-ST	AAATTTCCGCGGGCTGGCTGAACCTTTGAAAGTGAGCGGGAAGATGCAGCAGCGTATTG
IMP1011-48	AAATTTCCGCGGGCTGGCTGAACCTTTGAAAGTGAGCGGGAAGATGCAGCAGCGTATTG
IMP1011-48	* * * * *
PCVPK-15	GAAGACAGCTGTACACGTATAGTGGGCGCCCGGTTGTGGGAAGCAGTGGGCCG
IMP99-ECO	GAAGACCAATGTACACGTATTGTGGGCGCACCTGGGTGTGGTAAAGCAAATGGGCTGC
IMP1010-ST	GAAGACCAATGTACACGTATTGTGGGCGCACCTGGGTGTGGTAAAGCAAATGGGCTGC
IMP1011-48	GAAGACTAATGTACACGTATTGTGGGCGCACCTGGGTGTGGTAAAGCAAATGGGCTGC
IMP1011-48	* * * * *
PCVPK-15	TAATTTTGTGAGCCTAGGGACACCTACTGGAAGCCTAGTAGAAATAAGTGGTGGATGG
IMP99-ECO	TAATTTTGCAGACCGGAAACACATACTGGAAAACACCTAGAAACAAGTGGTGGATGG
IMP1010-ST	TAATTTTGCAGACCGGAAACACATACTGGAAAACACCTAGAAACAAGTGGTGGATGG
IMP1011-48	TAATTTTGCAGACCGGAAACACATACTGGAAAACACCTAGAAACAAGTGGTGGATGG
IMP1011-48	* * * * *
PCVPK-15	ATATCATGGAGAAGAAGTTGTTTGTGGATGATTTTATGGCTGGTTACCTGGGATGA
IMP99-ECO	TTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTTGATGACTTTTATGGCTGGCTGCCGTGGATGA
IMP1010-ST	TTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTTGATGACTTTTATGGCTGGCTGCCGTGGATGA
IMP1011-48	TTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTTGATGACTTTTATGGCTGGCTGCCGTGGATGA
IMP1011-48	* * * * *

Фиг. 5 (продовження)

PCVPK-15	TCTACTGAGACTGTGTGACCGGTATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGGGTACTGTCC
IMP99-ECO	TCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGTGGAACGTGACC
IMP1010-ST	TCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGTGGAACGTGACC
IMP1011-48	TCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGTGGAACGTGACC
IMP1011-48	* * * * *
PCVPK-15	TTTTTTGGCCCGCAGTATTTTGATTACAGCAATCAGGCCCGCCAGGAATGGTACTCCTC
IMP99-ECO	TTTTTTGGCCCGCAGTATTTCTGATTACAGCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACTCCTC
IMP1010-ST	TTTTTTGGCCCGCAGTATTTCTGATTACAGCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACTCCTC
IMP1011-48	TTTTTTGGCCCGCAGTATTTCTGATTACAGCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACTCCTC
IMP1011-48	* * * * *
PCVPK-15	AACTGCTGTCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCTTGAATTTTGGAA
IMP99-ECO	AACTGCTGTCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCTTGGTATTTGGAA
IMP1010-ST	AACTGCTGTCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCTTGGTATTTGGAA
IMP1011-48	AACTGCTGTCCAGCTGTAGAAGCTCTTATCGGAGGATTACTTCTTGGTATTTGGAA
IMP1011-48	AACTGCTGTCCAGCTGTAGAAGCTCTTATCGGAGGATTACTTCTTGGTATTTGGAA
	* * * * *
PCVPK-15	GACTGCTGAGAGAACAACTCACGGAGGTACCCGAAGGCCGATTGGAAGCAGTGAGCCACCC
IMP99-ECO	GAATGCTACAGAACAATCACGGAGGAA---GGGGGCCAGTTCGTCAACCTTTCCCCCCC
IMP1010-ST	GAATGCTACAGAACAATCACGGAGGAA---GGGGGCCAGTTCGTCAACCTTTCCCCCCC
IMP1011-48	GAATGCTACAGAACAATCACGGAGGAA---GGGGGCCAGTTCGTCAACCTTTCCCCCCC
IMP1011-48	GAATGCTACAGAACAATCACGGAGGAA---GGGGGCCAGTTCGTCAACCTTTCCCCCCC
	* * * * *
PCVPK-15	CTGTGCCCTTTCCCATATAAAATAAATACTGAGTCTTTTGTATCAGATCGTAATG
IMP99-ECO	ATGCCCTGAAATTTCCATATGAAATAAATACTGAGTCTTTT---TATCACTTCGTAATG
IMP1010-ST	ATGCCCTGAAATTTCCATATGAAATAAATACTGAGTCTTTT---TATCACTTCGTAATG
IMP1011-48	ATGCCCTGAAATTTCCATATGAAATAAATACTGAGTCTTTT---TATCACTTCGTAATG
IMP1011-48	ATGCCCTGAAATTTCCATATGAAATAAATACTGAGTCTTTT---TATCACTTCGTAATG
	* * * * *
PCVPK-15	GTTTTATT-TTATTTA---TTTA---GAGGGTCTTTTAGGATAAATTCCTGAATTG
IMP99-ECO	GTTTTATTATTCAATTAAGGGTTTAAAGTGGGGGTCTTTAAGATTAAATTCCTGAATTG
IMP1010-ST	GTTTTATTATTCAATTAAGGGTTTAAAGTGGGGGTCTTTAAGATTAAATTCCTGAATTG
IMP1011-48	GTTTTATTATTCAATTAAGGGTTTAAAGTGGGGGTCTTTAAGATTAAATTCCTGAATTG
IMP1011-48	GTTTTATTATTCAATTAAGGGTTTAAAGTGGGGGTCTTTAAGATTAAATTCCTGAATTG
	* * * * *

Фиг. 5 (продовження)

PCVPK-15	GCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCG--TCAGTG--AAAATGCCAAGCAAGAA
IMP99-ECO	GCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCCAGCAAGAA
IMP1010-ST	GCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCCAGCAAGAA
IMP1011-48	GCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCCAGCAAGAA
IMP1011-48	GCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCCAGCAAGAA

PCVPK-15	-----AAGCGGCCCGCAACCCATAAGAGGTGGGTGTTCAACCTTAATAATCCTTC
IMP99-ECO	GAATGGAAGAAGCGGACCCCAACACATAAAAGGTGGGTGTTCAACCTGAATAATCCTTC
IMP1010-ST	GAATGGAAGAAGCGGACCCCAACACATAAAAGGTGGGTGTTCAACCTGAATAATCCTTC
IMP1011-48	GAATGGAAGAAGCGGACCCCAACCCATAAAAGGTGGGTGTTCACTCTGAATAATCCTTC
IMP1011-48	GAATGGAAGAAGCGGACCCCAACCCATAAAAGGTGGGTGTTCACTCTGAATAATCCTTC

PCVPK-15	CGAGGAGGAGAAAAACAAAATACGGGAGCTTCCAATCTCCCTTTTGTATTATTTGTTTG
IMP99-ECO	CGAAGACGAGCGCAAGAAAAATACGGGAGCTCCAATCTCCCTATTTGATTATTTATTGT
IMP1010-ST	CGAAGACGAGCGCAAGAAAAATACGGGAGCTCCAATCTCCCTATTTGATTATTTATTGT
IMP1011-48	CGAAGACGAGCGCAAGAAAAATACGGGATCTTCCAATATCCCTATTTGATTATTTATTGT
IMP1011-48	CGAAGACGAGCGCAAGAAAAATACGGGATCTTCCAATATCCCTATTTGATTATTTATTGT
	*** ** *
PCVPK-15	CGGAGAGGAAGGTTTGGAAGAGGGTAGAACTCCTCACCTCCAGGGGTTTGCGAATTTTGC
IMP99-ECO	TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGGTTTCGCTAATTTTGT
IMP1010-ST	TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGGTTTCGCTAATTTTGT
IMP1011-48	TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGGTTTCGCTAATTTTGT
IMP1011-48	TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGGTTTCGCTAATTTTGT
	** ***** ** *
PCVPK-15	TAAGAAGCAGACTTTTAACAAGGTGAAGTGGTATTTTGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAA
IMP99-ECO	GAAGAAGCAAACCTTTTAATAAAGTGAAGTGGTATTTGGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAA
IMP1010-ST	GAAGAAGCAAACCTTTTAATAAAGTGAAGTGGTATTTGGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAA
IMP1011-48	GAAGAAGCAGACTTTTAATAAAGTGAAGTGGTATTTGGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAA
IMP1011-48	GAAGAAGCAGACTTTTAATAAAGTGAAGTGGTATTTGGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAA

PCVPK-15	AGCGAAAGGAACCGACCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAGGCCACATACTTAT
IMP99-ECO	AGCCAAAGGAACTGATCAGCAGAATAAAGAATATTGCAGTAAAGAAGGCAACTTACTTAT
IMP1010-ST	AGCCAAAGGAACTGATCAGCAGAATAAAGAATATTGCAGTAAAGAAGGCAACTTACTTAT
IMP1011-48	AGCGAAAGGAACAGATCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAGGCAACTTACTGAT
IMP1011-48	AGCGAAAGGAACAGATCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAGGCAACTTACTGAT
	*** ***** ** ***** ** *****

Фіг. 5 (продовження)