

Вариативность штаммов вируса респираторно-репродуктивного синдрома свиней в Восточной Европе как основание для определения новых генетических подтипов

Последовательности ORC5 и ORC7 вируса респираторно-репродуктивного синдрома свиней (вирус РРСС) в Беларуси были признаны европейским (европейский) генотипом. Но их группируют отдельно от всех других последовательностей генотипов, описанных до сих пор, включая живые ослабленные вакцины европейского генотипа вируса РРСС и последовательности итальянского европейского генотипа, некоторые из которых связываются со снижением эффективности вакцины. Кроме того, у белорусского европейского вируса РРСС наблюдается предельных размеров полиморфизм ORC7, величина которого варьируется от 375 nt (наименьший описанный европейский генотип ORC7) до 393 nt (наибольший описанный ORC7 для любого артеривируса). Вместе с белорусскими последовательностями разнообразие европейского генотипа вируса РРСС на данный момент превышает вариативность североамериканского генотипа вируса РРСС, что наводит на мысль о европейском происхождении вируса РРСС. Также наблюдается очень острое географическое разграничение различных европейских генотипов вируса РРСС вдоль восточной границы Польши. Новые белорусские последовательности имеют большое значение для разработок вакцин и диагностики антигенов. Анализ последовательности вируса РРСС из восточной части Европы может дать более полное представление о возникновении и эволюции вируса РРСС.

Вирус респираторно-репродуктивного синдрома свиней (вирус РРСС) представляет собой недавно появившийся патоген. Отчеты о симптомах заболевания и ретроспективные серологические исследования свидетельствуют о том, что вирус был выявлен в Канаде в 1979, в США в 1985, в Южной Корее в 1985, в азиатской части бывшего Советского Союза в 1986, в Японии в 1987, в бывшей Германской Демократической Республике в 1987, на Филиппинах в 1987 году и в Таиланде в 1989. В Западной Европе первые клинические вспышки были зарегистрированы в ноябре 1990 года в Германии, а также в Нидерландах, Испании, Великобритании, Франции, Бельгии и Дании в 1991-1992 годах.

Таким образом, вирус РРСС появился по всему миру в течение короткого временного промежутка. Удивительно, что вирусы, появившиеся в Европе и Северной Америке, были связаны лишь отдаленно (55-70% нуклеотидной идентичности). Вирус РРСС впервые был выделен в Нидерландах, и данный изолят (вирус Лелистад) вместе с первым североамериканским изолятом (VR2332) в настоящее время определяют два признанных генотипа вируса РРСС: европейский (европейский генотип, тип I) и североамериканский (американский генотип, тип II).

Одновременное появление генетически различных вирусов может быть связано с резким переходом на новый вид вируса двух отдельных разновидностей в Европе и Северной Америке (факторы, инициирующие такие переходы, еще не изучены) или с переходом одного вида вируса в неизвестном районе, за которым последовало его повсеместное распространение и эволюция. Однако, согласно филогенетическому анализу, возраст последнего общего предка европейского и американского генотипов составляет по крайней мере 100 лет. Это говорит в пользу гипотезы о том, что европейский и американский вирусы развивались параллельно на двух континентах вплоть до одновременного перехода вируса на свиней и его появления в качестве клинической единицы в 1980-х.

Изначально существовало мнение, что европейские генотипы вируса формируют достаточно однородную группу, схожую с вирусом Лелистад. Недавно такая точка зрения

подверглась сомнению из-за отчетов о появлении различных штаммов европейского генотипа вируса РРСС сначала в Дании, позже в Италии, Чехии, Польше, Испании, Германии и Нидерландах и даже в Таиланде. В последнем новаторском исследовании с помощью схожего с Лелистад штамма живой ослабленной вакцины и итальянского изолята в качестве провокационной пробы было продемонстрировано, что генетическое разнообразие внутри вирусов европейского генотипа является достаточным, чтобы влиять на эффективность вакцины. Итальянский провокационный вирус представляет собой один из наиболее вариативных европейских генотипов полевых изолятов, известных в настоящее время. Новые исследования показали, что в странах Восточной Европы, таких как Литва, существуют гораздо более разнообразные штаммы европейских генотипов, чем в Италии.

Из-за большого значения вариативности вирусов РРСС для разработки вакцины, а также с целью дальнейшего изучения разнообразия европейского генотипа вируса РРСС в восточной Европе, была построена последовательность полевых штаммов европейского генотипа из 11 стад Беларуси. Для исследования были выбраны большие стада количеством от 2500 до 9000 свиноматок, включая ядерные стада и стада от опороса до заключительного периода откорма. Все стада подвергались постоянному инфицированию вирусом РРСС. В них наблюдался полный спектр состояний болезни, которые можно отнести к вирусу РРСС. Для сравнения с белорусскими последовательностями нами были взяты последовательности, полученные из стад в северо-восточной Польше недалеко от границы с Литвой, Россией и Беларусью, а также из одного стада на западе Польши.

Как говорилось ранее, была проведена очистка РНК от сыворотки свиней, ОТ-ПЦР амплификация 5 и 7 открытых рамок считывания (ОРС) и построение последовательности неочищенного (не клонированного) продукта ПЦР. Для ОТ-ПЦР ОРС5 были использованы праймеры, описанные ранее. Была проведена ОТ-гнездная ПЦР ОРС 7 с использованием внешних и внутренних праймеров (5'-GCCCTGCCCCAICACG-3' и 5'-TCGCCCTAATTGAATAGGTGA-3'; 5'-TCGCCCTAATTGAATAGGTGACTC-3' и 5'-CGAGCTGTAAACGAGGAGTG-3' соответственно). ОТ-ПЦР ОРС5 была специфической для европейского генотипа вируса РРСС (например, участки связывания праймеров не консервируются в американском генотипе вируса РРСС), в то время как участок связывания праймера ОРС7 консервируется в европейском и американском генотипах вируса. Построению были также подвергнуты три живые ослабленные вакцины европейского генотипа: Porcilis PRRS (Intervet), Amervac-PRRS (HIPRA) and Pysrvac-183 (SYVA).

Все новые белорусские и польские последовательности были европейского генотипа. Для филогенетического анализа нами был использован набор контрольных последовательностей, в которых наблюдалось наибольшее мировое разнообразие европейского и американского генотипов РРСС. Когда контрольные последовательности европейского генотипа сравнили с новыми белорусскими последовательностями европейского генотипа, то первые были объединены в группу, названную европейский подтип 1, а белорусские и литовские последовательности были от него отделены. Таким образом, изучение новых белорусских последовательностей показало, что европейский генотип вируса РРСС состоит из нескольких генетических подтипов, которые могут быть отделены бутстреп-методом. Аналогичная картина была представлена после филогенетического анализа полных последовательностей ОРС7. Только в одной последовательности Bel-42 наблюдались различные позиции в деревьях ОРС5 и ОРС7. Должно быть, это происходит из-за рекомбинации, которая была описана ранее в полевых штаммах европейского и американского генотипов и для которой консервативная последовательность проходит между ОРС5 и ОРС7 и служит «горячей точкой».

Вдоль польской границы наблюдалось резкое географическое разграничение между различными европейскими подтипами. Таким образом, наши данные показывают, что на большей части Европы (к западу от восточной польской границы) распространяются штаммы, относительно близкие к европейскому генотипу, в то время как к востоку от восточной границы Польши наблюдается вариативность штаммов европейского генотипа. Мы полагаем, что данная схема распространения европейского генотипа вируса РРСС объясняется торговыми связями: в то время как Беларусь импортирует племенных животных с Запада, из Беларуси в Польшу торговля КРС не осуществляется. Из-за того, что прародительские популяции более разнообразны, чем потомственные, мы полагаем, что отсутствие движения КРС с востока на запад может служить филогенетическим доказательством возникновения вируса РРСС в восточной Европе. Гипотеза «евразийского происхождения РРСС» также более привлекательна и по другим причинам: имеющиеся в настоящее время последовательности определяют последнего общего предка штаммов генотипа европейский вируса РРСС между 1946 и 1967 гг., т.е. в период развития Европы после второй мировой войны. Кажется правдоподобным, что послевоенное расширение бывшего Советского Союза создало среду, в которой возник новый вирус или которая поспособствовала распространению уже существовавшего вируса. Также из-за того, что Польша и другие страны восточной и центральной Европы, например, Беларусь и Прибалтика (Литва), менее всего были подвержены влиянию политики Советского Союза в отношении животноводства, нам кажется, что если новые подтипы вируса РРСС возникли в период послевоенных переворотов, то они бы доминировали в Литве, Беларуси и возможно других странах бывшего Советского Союза, но не обязательно присутствовали бы к западу от польской границы.

Нуклеокапсидный белок является одним из наиболее консервативных протеинов вируса РРСС. Все без исключения предыдущие исследования в период с 1989 по 2005 в западной, северной, центральной и южной Европе, Северной Америке и Азии, по результатам которых в ГенБанк европейского и американского генотипов было заложено около 270 последовательностей, не смогли раскрыть размер полиморфизмов в нуклеокапсидном белке вируса РРСС. Соответственно, у всех новых польских штаммов, основанных на выведенной аминокислотной последовательности и перечисленных в данном исследовании, наблюдались размеры ОРС7, прототипичные для генотипа европейского вируса РРСС (128aa).

У белорусских штаммов вируса РРСС наблюдаются размеры ОРС7 белка от 123 aa (наименьший размер ОРС7, зарегистрированный для генотипа европейский вируса РРСС) до 130aa (наибольший размер ОРС7, зарегистрированный для любого артеривируса).

В дополнение к крайнему полиморфизму ОРС7 белорусские штаммы вируса РРСС также послужили редким примером вариативности в высококонсервированном N-46 сайте гликозилирования GP₅. Было обнаружено, что N-46 очень важен для вырабатывания инфекционных вирионов в контексте инфекционного кДНК-клона вируса Лелистад. Мы обнаружили, что вирусы без N-46 были относительно распространены в Беларуси. Также мы обнаружили, что в одном и том же вирусе, полученном из различных возрастных групп, N-46 присутствовал в некоторых возрастных группах и не обнаруживался в других. В вирусе элевации лактатдегидрогеназы было обнаружено, что N-46 и N-53 всегда присутствовали в не-нейропатогенных штаммах, в то время как в нейропатогенных штаммах N-46 всегда не хватало, и это находилось в связи с большей восприимчивостью к нейтрализации антител. Как и вирус РРСС, гликозилирование GP₅ является важным для нейтрализации антител. Таким образом, основываясь на наблюдениях за вариативностью N-46 у свиней разных возрастных групп, можно выдвинуть гипотезу, что вирус РРСС

использует вариативность N-46 сайта гликозилирования в качестве генетического переключателя для регулирования взаимодействия иммунной системы с возрастом хозяина.

В филогенезе, основанном на ORF5, между европейским и американским генотипами вируса, включая новые белорусские последовательности, у целого кластера европейского генотипа было обнаружено большее разнообразие, чем в кластере американского генотипа. Как было упомянуто во введении, оказалось, что вирус РРСС появился независимо в Европе и Северной Америке в 1980-х. Таким образом, следует говорить о том, что провирус РРСС уже существовал в резервентных видах и перешел на свиней, что произошло практически одновременно в Европе и Северной Америке. Иницирующие факторы легко представить. Например, можно предположить, что возникновению вируса РРСС способствовало повсеместное возникновение в начале 1980-х респираторного коронавируса свиней, имеющего общий клеточный тропизм с вирусом РРСС в легочном тракте. Однако открытым остается вопрос происхождения провируса РРСС. Вероятнее всего, что провирус РРСС существовал как в Европе, так и в Северной Америке и распространился на другие континенты посредством экспорта или миграции неизвестного изначального хозяина вируса до того, как данный вирус перешел на свиней в 1980-х. Используя аргументы, схожие с теми, которые применялись при прослеживании возникновения вируса иммунодефицита человека, кажется правдоподобным, что анцестральная популяция провируса РРСС должна иметь большее генетическое разнообразие, чем популяция колониста, и что данная ситуация была бы отображена в разнообразии вируса РРСС после его возникновения. Таким образом, из-за большого разнообразия выявленных в данном исследовании вирусов европейского генотипа в данный момент наиболее вероятным можно считать европейское или евразийское происхождение провируса РРСС. Дальнейшие косвенные свидетельства его происхождения вытекают из предположения, что домашние мыши являются наиболее вероятным резервентным видом для провируса РРСС и что они пришли в Северную Америку из Европы. Согласно другой гипотезе, вирус РРСС был перенесен в США при импорте диких кабанов из Европы.

Таким образом, в довольно большом количестве современных исследований подвергалось анализу генетическое разнообразие европейского генотипа вируса РРСС в Европе. Исходя из этого, под вопросом оказывается ценность проведения дополнительных молекулярно-филогенетических исследований. Однако текущие исследования показывают, что взятие образцов из новых географических регионов Европы все еще стоит проводить, поскольку при этом выявляется большое разнообразие европейского генотипа вируса РРСС к востоку от Польши. И наоборот, все известные европейские последовательности генотипов к западу от польско-белорусской границы формируют единый филогенетический кластер, называемый подтипом 1. Несмотря на то, что подтип 1 является микрогетерогенным по сравнению с новыми белорусскими последовательностями, разнообразие внутри европейского подтипа 1 по существу является таким же, как и во всем американском генотипе вируса РРСС, и достаточно большим, чтобы повлиять на эффективность вакцины. Из-за того, что все имеющиеся вакцины против европейского вируса РРСС, как и все современные антигены ELISA европейского генотипа вируса РРСС, принадлежат к подтипу 1, новые подтипы данного генотипа, описанные в этом исследовании, являются значимыми для развития вакцин и диагностических проб. Дальнейшие молекулярно-эпидемиологические исследования в дальневосточной Европе и в Азии будут сочетать в себе прикладные и фундаментальные научные достижения, а именно знания для разработки диагностических проб и вакцин второго поколения, а также для выявления причин возникновения вируса РРСС в Европе.

Short
Communication

Correspondence

T. Stadejek
stadejek@piwet.pulawy.pl

Received 21 December 2005

Accepted 31 March 2006

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes

T. Stadejek,¹ M. B. Oleksiewicz,² D. Potapchuk³ and K. Podgórska¹

¹National Veterinary Research Institute, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, Poland

²Novo Nordisk A/S, Virology and Molecular Toxicology, Novo Nordisk Park, 2760 Måløv, Denmark

³S. N. Vyshesl'skij Institute of Experimental Veterinary Medicine, National Academy of Sciences of Belarus, 2 Vyshesl'skij Street, Minsk 223020, Belarus

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ORF5 and ORF7 sequences from Belarus were found to be of the European (EU) genotype, but grouped separately from all other EU genotype sequences described so far, including live-attenuated EU genotype PRRSV vaccines and Italian EU genotype sequences, some of which have been associated with reduced vaccine efficacy. Also, the Belarusian EU-PRRSV exhibited extreme ORF7 size polymorphism, ranging from 375 nt (the smallest EU genotype ORF7 yet described) to 393 nt (the largest ORF7 yet described for any arterivirus). With the Belarusian sequences, the diversity of EU genotype PRRSV now exceeds that of the North American (US) genotype PRRSV, suggesting a European origin of PRRSV. Finally, a very sharp geographical demarcation of highly diverse EU genotype PRRSV was observed along the eastern Polish border. The new Belarusian sequences have relevance for vaccine and diagnostic-antigen design and show that sequence analysis of PRRSV from more eastern parts of Europe may offer further insights into the emergence and evolution of PRRSV.

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a recently emerged pathogen. Based on reporting of disease symptoms and retrospective serological surveys, the virus emerged in Canada in 1979 (Carman *et al.*, 1995), in the USA in 1985 (Zimmerman *et al.*, 1997), in South Korea in 1985 (Shin *et al.*, 1993), in the Asian part of the former Soviet Union in 1986 (Grebennikova *et al.*, 2004), in Japan in 1987 (Yoshii *et al.*, 2005), in the former German Democratic Republic in 1987 (Ohlinger *et al.*, 2000), in the Philippines in 1987 (Thanawongnuwech *et al.*, 2003) and in Thailand in 1989 (Thanawongnuwech *et al.*, 2004). In western Europe, the first clinical outbreaks were reported in November 1990 in Germany, with outbreaks in the Netherlands, Spain, UK, France, Belgium and Denmark occurring through 1991–1992 (OIE, 1992).

Thus, PRRSV emerged globally through a brief time window. Surprisingly, the viruses that appeared in Europe and North America were related only distantly (55–70 %

nucleotide identity). PRRSV was first isolated in the Netherlands (Wensvoort *et al.*, 1991) and that isolate (Lelystad virus), together with the first North American isolate (VR2332), now define the two recognized genotypes of PRRSV: European (EU genotype, type I) and North American (US genotype, type II) (Snijder *et al.*, 2004).

The cotemporal emergence of genetically very different viruses could be due to two independent species jumps in Europe and North America (triggered by as-yet-unknown factors) or a single species-jump event at an unknown location followed by very quick global spread, coupled with unusually quick evolution of the virus (Forsberg, 2005; Hanada *et al.*, 2005). However, phylogenetic analysis places the most recent common ancestor (MRCA) for the EU and US genotypes at least 100 years back in time (Forsberg, 2005; Hanada *et al.*, 2005), providing strong support for the hypothesis that EU and US viruses evolved in parallel in North America and Europe prior to their cotemporal species jump into pigs and emergence as clinical entities in the later 1980s.

Originally, EU genotype viruses were thought to form a very homogeneous, 'Lelystad-like' group (Wensvoort *et al.*, 1991; Suarez *et al.*, 1996; Drew *et al.*, 1997; Le Gall *et al.*, 1998).

Published online ahead of print on 7 April 2006 as DOI 10.1099/vir.0.81782-0.

Supplementary figures and a table showing details of the Belarusian and Polish herds from which sequences were obtained are available in JGV Online.

More recently, the view that EU genotype viruses are genetically homogeneous and Lelystad-like was challenged by the reporting of unusually diverse EU genotype PRRSV strains, first in Denmark (Oleksiewicz *et al.*, 2000) and later in Italy (Forsberg *et al.*, 2002), the Czech Republic (Indik *et al.*, 2000), Poland (Stadejek *et al.*, 2002), Spain (Mateu *et al.*, 2003), Germany and the Netherlands (Pesch *et al.*, 2005) and even Thailand (Thanawongnuwech *et al.*, 2004). In a recent, groundbreaking study, by using a Lelystad-like, live-attenuated vaccine strain and an Italian isolate as challenge, it was demonstrated that the genetic diversity within EU genotype viruses is sufficient to affect vaccine efficacy (Labarque *et al.*, 2004). The Italian challenge virus represented one of the most diverse EU genotype field isolates known at the time (Forsberg *et al.*, 2002). Since then, new studies have demonstrated that eastern European countries such as Lithuania harbour EU genotype strains of much higher diversity than does Italy (Stadejek *et al.*, 2002).

Because of the great importance of PRRSV diversity for vaccine development and because we wished to further explore the diversity of EU genotype PRRSV in eastern Europe, we sequenced EU genotype field strains from 11 Belarusian herds. The herds were large, ranging from 2500 to 9000 sows, and included farrow to finish and nucleus herds. All herds were infected persistently with PRRSV and presented the full range of disease conditions that could be ascribed to PRRSV. For comparison with the Belarusian sequences, we obtained sequences from four herds located in north-eastern Poland, close to the Lithuanian, Russian and Belarusian borders, and from one herd from western Poland (Fig. 1; Table 1; Supplementary Table S1, available in JGV Online). RNA purification from pig serum, RT-PCR amplification of open reading frames (ORFs) 5 and 7 and sequencing of bulk (not cloned) PCR product were done essentially as described previously (Stadejek *et al.*, 2002).

Briefly, for RT-PCR of ORF5, previously described primers were used (Stadejek *et al.*, 2002). RT-nested PCR of ORF7 was performed by using the following primers: external, 5'-GCCCTGCCCAICACG-3' and 5'-TCGCCCTAATTGAATAGGTGA-3' (Oleksiewicz *et al.*, 1998), and internal, 5'-TCGCCCTAATTGAATAGGTGACTC-3' and 5'-CGAGCTGTAAACGAGGAGTG-3' (Drew *et al.*, 1997). The ORF5 RT-PCR was specific for EU genotype PRRSV (i.e. the primer-binding sites are not conserved in US genotype PRRSV), whereas the ORF7 primer-binding sites are conserved between EU and US genotype viruses. The three currently available EU genotype live-attenuated vaccines, Porcilis PRRS (Intervet), Amervac-PRRS (HIPRA) and Pysrvac-183 (SYVA), were also sequenced (Table 1).

All of the new Belarusian and Polish sequences were of the EU genotype. For phylogenetic analysis, we used a set of reference sequences representing the maximal global diversity of EU and US genotype PRRSV (Table 1). When analysed together with the new Belarusian EU genotype sequences, the highly diverse reference EU type sequences coalesced to form a single group, termed EU subtype 1 (Fig. 2). In contrast, the Belarusian and Lithuanian sequences were separated from EU subtype 1. Thus, the new Belarusian sequences demonstrated that EU genotype PRRSV consists of several genetic subtypes that can be separated with high bootstrap support (Fig. 2a). An identical picture was seen after phylogenetic analysis of complete ORF7 sequences (see Supplementary Fig. S1, available in JGV Online). Only one sequence, Bel-42, exhibited different positioning in the ORF5 and ORF7 trees. This could be due to recombination, which has been described previously in EU as well as US genotype field strains (van Vugt *et al.*, 2001) and for which conserved sequence stretches between ORFs 5 and 7 are known to serve as hot spots (Forsberg *et al.*, 2002).

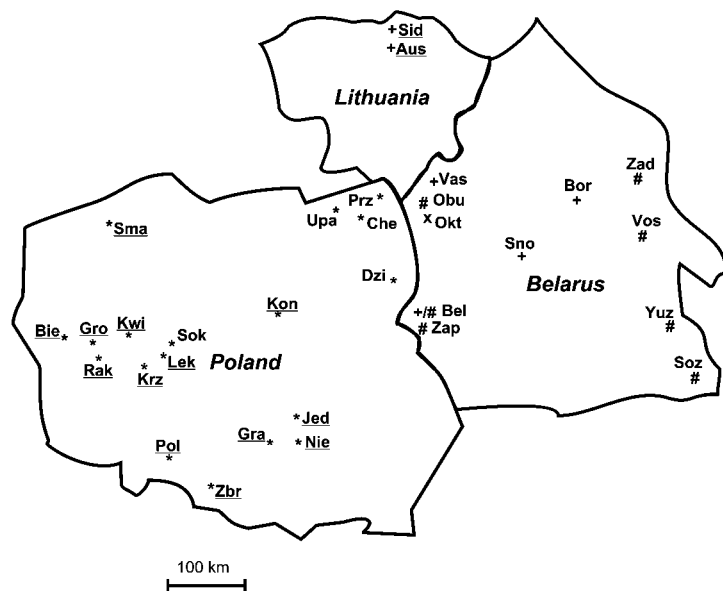


Fig. 1. The eastern Polish border separates radically diverse EU genotype PRRSVs. The locations of the five Polish and 11 Belarusian herds from which new sequences were derived in the present study are labelled by a three-letter designation. The locations of the herds from which sequences were derived in a previous study (Stadejek *et al.*, 2002) are indicated by underlined names. Herds with EU subtype 1 viruses are marked '*', EU subtype 2 '+', EU subtype 3 '#' and EU subtype 4 'x'. Herd Bel, where sequence analysis indicated recombinant virus composed of subtype 2 and subtype 3 material, is marked '+/#'.

Table 1. PRRSV sequence summary

Sequences 1–46 were obtained as part of this study (all EU genotype). The two Lithuanian sequences (Aus and Sid) have been described previously, but were resequenced from original material for the present study (Stadejek *et al.*, 2002). Sequences 47–76 are reference sequences, representing the most diverse EU and US genotype sequences available in GenBank (Forsberg *et al.*, 2002; Thanawongnuwech *et al.*, 2004; Yoshii *et al.*, 2005). The consecutive numbers 1–76 are also used in branch labelling in the phylogenetic trees in Fig. 2(b). ORF7 size includes the stop codon.

No.	Sequence name (herd ID-serum no.)	Pig age (days)	Country	Year	GenBank accession no.		ORF7 size (nt)	Genotype- subtype
					ORF5	ORF7		
1	Bel-42	65	Belarus	2004	DQ324669	DQ324699	378	EU-3/2
2	Bel-43	65	Belarus	2004	DQ324670	DQ324700	378	EU-3/2
3	Bor-41	65	Belarus	2004	DQ324671	DQ324701	393	EU-2
4	Bor-54	120	Belarus	2004	DQ324672	DQ324702	393	EU-2
5	Obu-1	30	Belarus	2005	DQ324676	DQ324707	375	EU-3
6	Okt-35	65	Belarus	2004	DQ324677			EU-4
7	Okt-46	65	Belarus	2004		DQ324708	375	EU-4
8	Okt-47	65	Belarus	2004		DQ324709	375	EU-4
9	Sno-4		Belarus	2004	DQ324683	DQ324713	378	EU-2
10	Sno-6		Belarus	2004		DQ324714	378	EU-2
11	Soz-6	80	Belarus	2004	DQ324686	DQ324719	375	EU-3
12	Soz-8	80	Belarus	2004	DQ324687	DQ324720	375	EU-3
13	Soz-42	65	Belarus	2004		DQ324717	375	EU-3
14	Soz-43	65	Belarus	2004		DQ324718	375	EU-3
15	Vas-2	55	Belarus	2005	DQ324689	DQ324722	378	EU-2
16	Vas-3	55	Belarus	2005		DQ324723	378	EU-2
17	Vas-4	55	Belarus	2005		DQ324724	378	EU-2
18	Vos-29	220	Belarus	2004		DQ324725	375	EU-2
19	Vos-41	220	Belarus	2004		DQ324726	375	EU-3
20	Vos-49	220	Belarus	2004	DQ324690			EU-3
21	Vos-50	220	Belarus	2004	DQ324691			EU-3
22	Yuz-34	65	Belarus	2004	DQ324692	DQ324727	375	EU-3
23	Yuz-48	65	Belarus	2004	DQ324693	DQ324728	375	EU-3
24	Zad-1	30	Belarus	2004	DQ324694	DQ324729	375	EU-3
25	Zad-13	60	Belarus	2004		DQ324730	375	EU-3
26	Zad-14	60	Belarus	2004	DQ324695	DQ324731	375	EU-3
27	Zad-37	120	Belarus	2004		DQ324732	375	EU-3
28	Zad-39	120	Belarus	2004		DQ324733	375	EU-3
29	Zap-36-40	65	Belarus	2004	DQ324696			EU-3
30	Zap-41	65	Belarus	2004		DQ324734	375	EU-3
31	Zap-46-50	65	Belarus	2004	DQ324697			EU-3
32	Aus		Lithuania	2000	DQ324667	AF438362	378	EU-2
33	Sid		Lithuania	2000	DQ324682	AF438363	378	EU-2
34	Che-46	63	Poland	2005	DQ324673	DQ324703	387	EU-1
35	Che-50	63	Poland	2005	DQ324674	DQ324704	387	EU-1
36	Dzi-62	91	Poland	2005	DQ324675	DQ324705	387	EU-1
37	Dzi-64	91	Poland	2005		DQ324706	387	EU-1
38	Prz-66-70	49	Poland	2005	DQ324679			EU-1
39	Prz-71-75	63	Poland	2005	DQ324680			EU-1
40	Prz-87	120	Poland	2005		DQ324711	387	EU-1
41	Sok-4	42	Poland	2004	DQ324684	DQ324715	387	EU-1
42	Sok-9	56	Poland	2004	DQ324685	DQ324716	387	EU-1
43	Upa-13	101	Poland	2005	DQ324688	DQ324721	387	EU-1
44	Amervac PRRS		Spain	Vaccine	DQ324668	DQ324698	387	EU-1
45	Pyrsvac-183		Spain	Vaccine	DQ324681	DQ324712	387	EU-1
46	Porcilis PRRS		The Netherlands	Vaccine	DQ324678	DQ324710	387	EU-1
47	Quebec 807/94		Canada	1994	Z82995			US

Table 1. cont.

No.	Sequence name (herd ID-serum no.)	Pig age (days)	Country	Year	GenBank accession no.		ORF7 size (nt)	Genotype- subtype
					ORF5	ORF7		
48	FJ-1		China		AY881994			US
49	GDCZ1		China		AY857635			US
50	GDCZ2		China		AY857636			US
51	361-4		Denmark	1994	AY035915	AY035960	387	EU-1
52	28639/98		Denmark	1998	AY035912	AY035957	387	EU-1
53	2567/96		Italy	1996	AY035932	AY035976	387	EU-1
54	2029/97		Italy	1997	AY035930	AY035973	387	EU-1
55	Gu922M		Japan	1992	AB175721			US
56	Nagasaki 93		Japan	1993				US
57	Jeh1		Japan	2000	AB175691			US
58	Jis1		Japan	2000	AB175694			US
59	Jis2		Japan	2000	AB175695			US
60	Jos1		Japan	2000	AB175699			US
61	Jyt2		Japan	2000	AB175713			US
62	Jam2		Japan	2000	AB175690			US
63	Lelystad		The Netherlands	1991	M96262	M96262	387	EU-1
64	L56/2/91		Spain	1991	AY035935	AY035979	387	EU-1
65	MD-001		Taiwan		AF121131			US
66	01UD6		Thailand	2001	AY297113			US
67	01CB1		Thailand	2001	AY297119			EU-1
68	02PB1		Thailand	2002	AY297116			US
69	03RB1		Thailand	2003	AY297124			EU-1
70	VR-2332		USA	1989	U87392			US
71	HP		USA		AY754345			US
72	MN-184		USA		AY656992			US
73	EuroPRRS		USA	1999	AY366525			EU-1
74	Ingelvac PRRS MLV		USA	Vaccine	AF020048			US
75	Ingelvac PRRS ATP		USA	Vaccine	AY656991			US
76	PrimePac PRRS		USA	Vaccine	AF066384			US

There was a sharp geographical demarcation along the eastern Polish border between the highly diverse EU subtypes (Fig. 1 and 2). Thus, our data show that, in most of Europe (west of the eastern Polish border), relatively closely related EU genotype strains circulate, whereas east of the eastern Polish border, a great diversity of EU genotype strains can be observed (Fig. 1). We believe that this EU genotype PRRSV distribution pattern is explained by trade: whilst Belarus imports breeding animals from the west, there is essentially no livestock trade from Belarus to Poland. Because ancestral populations are generally held to be more diverse than descendant populations, we suggest that this lack of livestock movement from east to west may have serendipitously preserved phylogenetic evidence of PRRSV emergence in eastern Europe. Other reasons also make a 'Eurasian PRRSV origin' hypothesis attractive: the currently available sequences place the MRCA of EU genotype PRRSV strains between 1946 and 1967, i.e. during the post-World War II development of Europe (R. Forsberg, personal communication). It seems plausible that the post-war expansion of the former Soviet Union might have created an environment that allowed a new virus to emerge or an already

emerged virus to spread. Also, because Poland and other east and central European countries were influenced much less by the Soviet Union animal-breeding policies than, for example, Belarus and the Baltic states (e.g. Lithuania), it seems plausible that, if new PRRSV subtypes arose during the post-war upheavals, they would be dominant in Lithuania, Belarus and probably other countries of the former Soviet Union, but would not necessarily be present west of the Polish border (Fig. 1).

The nucleocapsid protein is one of the most conserved PRRSV proteins. Accordingly, without exception, all previous studies covering the time period 1989–2005 in western, northern, central and southern Europe, North America and Asia, yielding approximately 270 sequences deposited in GenBank of both EU and US genotypes, have so far failed to reveal size polymorphisms in the PRRSV nucleocapsid protein (Meng *et al.*, 1995; Suarez *et al.*, 1996; Drew *et al.*, 1997; Le Gall *et al.*, 1998; Forsberg *et al.*, 2002). Accordingly, based on deduced amino acid sequence, all of the new Polish strains sequenced in the present study had ORF7 sizes prototypical for EU genotype PRRSV (128 aa).

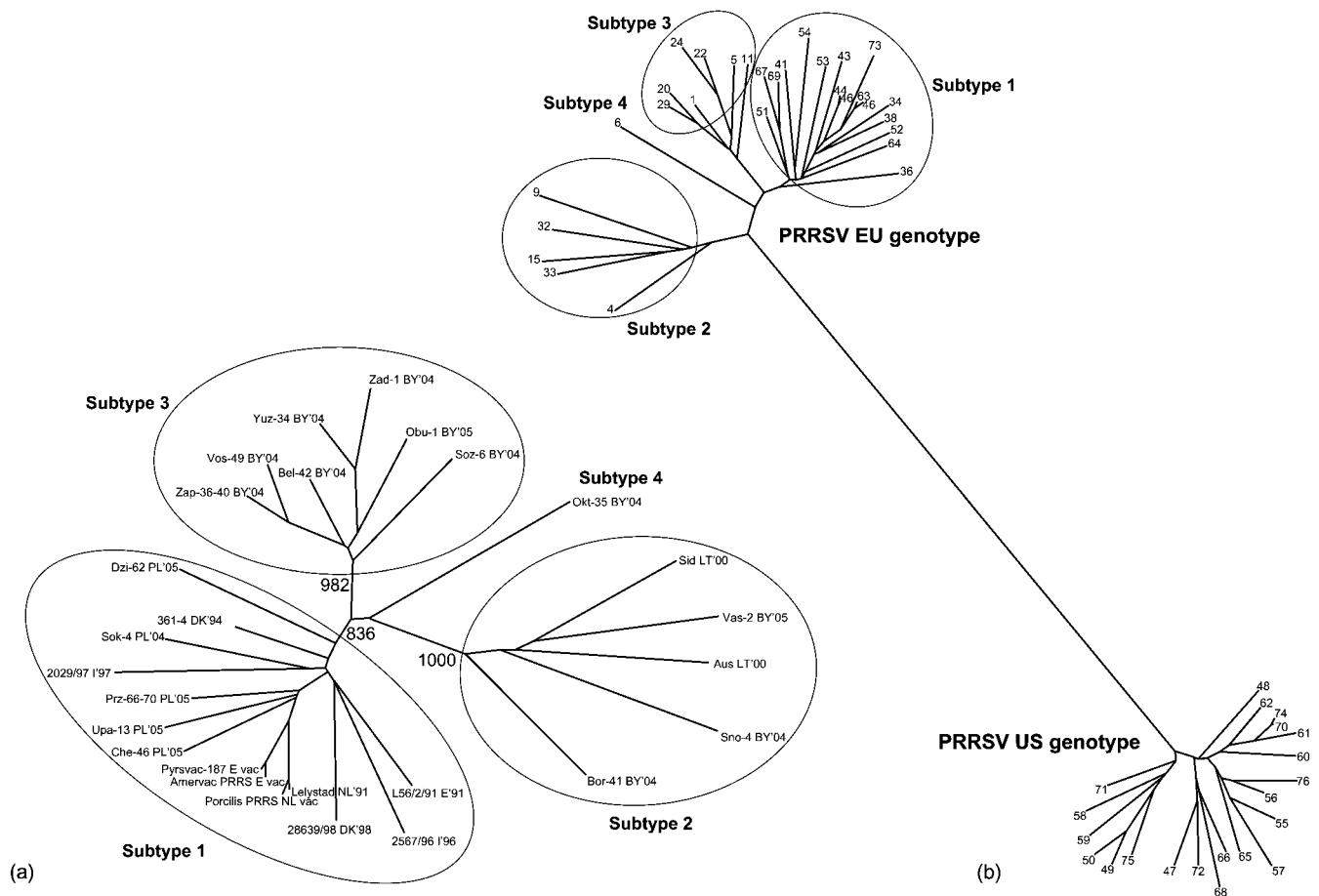


Fig. 2. Belarusian strains expand the diversity of EU genotype PRRSV beyond that of US genotype PRRSV. (a) EU genotype ORF5 tree. The bootstrap values adjacent to the main nodes represent the number of 1000 trees that supported the clustering. The Sid, Aus, Bor and Sno herds had trade links (replacement animals and semen). (b) Pan-PRRSV (EU + US genotype) ORF5 tree. Branch numbers correspond to the first column of Table 1.

In contrast, the Belarusian PRRSV strains had ORF7 protein sizes from 124 aa, the lowest ORF7 size reported so far for EU genotype PRRSV, to 130 aa, the largest ORF7 size yet reported for any arterivirus (Snijder *et al.*, 2004) (see Supplementary Fig. S2, available in JGV Online).

In addition to the extreme ORF7 polymorphism, the Belarusian PRRSV strains also provided a rare example of variability in the otherwise highly conserved N-46 glycosylation site of GP₅ (Chen *et al.*, 2000; Wissink *et al.*, 2004; Mateu *et al.*, 2005). N-46 was found to be important for infectious virion production in the context of an infectious cDNA clone of Lelystad virus (Wissink *et al.*, 2004). In contrast, we found that viruses without N-46 were relatively common in the field in Belarus. Also, we found that, in the the same virus derived from different age groups, N-46 was present in some age groups and not in others (see Bor and Zad farm sequences in Supplementary Fig. S3, available in JGV Online). In LDV, it was found that N-46 and N-53 were always present in non-neuropathogenic strains, whereas

in neuropathogenic strains, N-46 was always lacking and this correlated with a higher susceptibility to antibody neutralization (Chen *et al.*, 2000). Similarly for PRRSV, GP₅ glycosylation has recently been shown to be important for antibody neutralization (Ansari *et al.*, 2006). Thus, based on the observation of N-46 variability in pigs of different age groups (see Bor and Zad farm sequences in Supplementary Fig. S3, available in JGV Online), it could be hypothesized that PRRSV uses variability of the N-46 glycosylation site as a genetic switch to adjust immune-system interactions to the age of its host.

In an ORF5-based phylogeny between EU and US genotype viruses, including the new Belarusian sequences, the whole EU genotype cluster exhibited clearly higher diversity than the US genotype cluster (Fig. 2b). As mentioned in the introduction, PRRSV appears to have emerged independently in Europe and North America in the 1980s (Forsberg, 2005; Hanada *et al.*, 2005). Thus, a pre-PRRS virus must be postulated to have existed in reservoir species, making

species jumps into pigs triggered by global factors that acted in Europe and North America almost simultaneously. Global candidate triggering factors can easily be conceived. For example, the global emergence in the early 1980s of porcine respiratory coronavirus, which shares cell tropism with PRRSV in the pulmonary tract (Laude *et al.*, 1993), could be hypothesized to have helped PRRSV emergence. However, there remains the question of the origin of pre-PRRSV. Most likely, pre-PRRSV existed in either Europe or North America and spread to the other continent by means of export or migration of the unknown original host, well before the species jump into pigs the 1980s. By using arguments similar to those used to track human immunodeficiency virus emergence (Mokili & Korber, 2005), it seems plausible that the ancestral population of pre-PRRSV should exhibit a larger genetic diversity than the colonist population and that this situation would be reflected in PRRSV diversity post-emergence. Thus, because of the large diversity of EU genotype viruses revealed in the present study (Fig. 2b), a European or Eurasian origin of pre-PRRSV currently seems most likely. Further indirect support for a European origin of pre-PRRSV comes from the fact that house mice have been suggested as the most likely reservoir species for pre-PRRSV (Plagemann, 2003) and these rodents colonized North America from Europe (Tichy *et al.*, 1994). An alternative hypothesis suggested that PRRSV was spread to the USA by wild-boar imports from Europe (Plagemann, 2003).

In summary, a quite large number of recent studies have examined the genetic diversity of EU genotype PRRSV in Europe (Suarez *et al.*, 1996; Drew *et al.*, 1997; Le Gall *et al.*, 1998; Indik *et al.*, 2000, 2005; Forsberg *et al.*, 2002; Stadejek *et al.*, 2002; Mateu *et al.*, 2003, 2005; Pesch *et al.*, 2005). On this basis, the value of performing yet more molecular-phylogeny work should be questioned. However, the current study illustrates that sampling new geographical regions in Europe remains a highly worthwhile undertaking, revealing a hitherto-unsuspected diversity of EU genotype PRRSV east of Poland (Figs 1 and 2). In contrast, all known EU genotype sequences from west of the Poland/Belarus border formed a single phylogenetic cluster, operationally termed subtype 1 (Figs 1 and 2). Whilst subtype 1 appears micro-heterogeneous by comparison with the new Belarusian sequences (Fig. 2), the diversity within the European subtype 1 is in fact at least as large as within the total body of US genotype PRRSV (Forsberg *et al.*, 2002) (Fig. 2b) and sufficiently large to affect vaccine efficacy (Labarque *et al.*, 2004). Because all current EU-PRRSV vaccines, as well as all current EU genotype PRRSV ELISA antigens, belong to subtype 1 (Fig. 2 and Table 1), the new subtypes of EU genotype PRRSV described in this study are relevant for vaccine and diagnostic-assay development. In short, further molecular-epidemiology studies in the far-eastern parts of Europe and in Asia would combine applied and basic scientific gains, namely knowledge for design of second-generation diagnostic assays and vaccines, as well as unravelling the emergence of PRRSV in Europe.

Acknowledgements

Drs Iwona Stankiewicz and Marian Porowski are thanked for supplying serum samples from Polish pig herds and Katarzyna Chabros and Jonas Steenbuch Krabbe for excellent technical assistance. Roald Forsberg is thanked for sharing unpublished data on the MRCA of EU genotype PRRSV.

References

- Ansari, I. H., Kwon, B., Osorio, F. A. & Pattnaik, A. K. (2006). Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J Virol* **80**, 3994–4004.
- Carman, S., Sanford, S. E. & Dea, S. (1995). Assessment of seropositivity to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine herds in Ontario – 1978 to 1982. *Can Vet J* **36**, 776–777.
- Chen, Z., Li, K. & Plagemann, P. G. W. (2000). Neuropathogenicity and sensitivity to antibody neutralization of lactate dehydrogenase-elevating virus are determined by poly(lactosaminoglycan) chains on the primary envelope glycoprotein. *Virology* **266**, 88–98.
- Drew, T. W., Lowings, J. P. & Yapp, F. (1997). Variation in open reading frames 3, 4 and 7 among porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the UK. *Vet Microbiol* **55**, 209–221.
- Forsberg, R. (2005). Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes. *Mol Biol Evol* **22**, 2131–2134.
- Forsberg, R., Storgaard, T., Nielsen, H. S., Oleksiewicz, M. B., Cordioli, P., Sala, G., Hein, J. & Bøtner, A. (2002). The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe. *Virology* **299**, 38–47.
- Grebennikova, T. V., Zaberezhny, A. D., Vlasova, A. N. & 8 other authors (2004). Genetic variability of the nucleocapsid protein of the virus of the porcine reproductive and respiratory syndrome. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* **2**, 37–40 (in Russian).
- Hanada, K., Suzuki, Y., Nakane, T., Hirose, O. & Gojobori, T. (2005). The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Mol Biol Evol* **22**, 1024–1031.
- Indik, S., Valíček, L., Klein, D. & Klánová, J. (2000). Variations in the major envelope glycoprotein GP5 of Czech strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* **81**, 2497–2502.
- Indik, S., Schmoll, F., Sipos, W. & Klein, D. (2005). Genetic variability of PRRS virus in Austria: consequences for molecular diagnostics and viral quantification. *Vet Microbiol* **107**, 171–178.
- Labarque, G., Van Reeth, K., Nauwynck, H., Drexler, C., Van Gucht, S. & Pensaert, M. (2004). Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. *Vaccine* **22**, 4183–4190.
- Laude, H., Van Reeth, K. & Pensaert, M. (1993). Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. *Vet Res* **24**, 125–150.
- Le Gall, A., Legeay, O., Bourhy, H., Arnauld, C., Albina, E. & Jestin, A. (1998). Molecular variation in the nucleoprotein gene (ORF7) of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Res* **54**, 9–21.
- Mateu, E., Martín, M. & Vidal, D. (2003). Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory virus strains in Spain. *J Gen Virol* **84**, 529–534.
- Mateu, E., Díaz, I., Darwich, L., Casal, J., Martín, M. & Pujols, J. (2005). Evolution of ORF5 of Spanish porcine reproductive and

- respiratory syndrome virus strains from 1991 to 2005. *Virus Res* **115**, 198–206.
- Meng, X.-J., Paul, P. S., Halbur, P. G. & Lum, M. A. (1995). Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Arch Virol* **140**, 745–755.
- Mokili, J. & Korber, B. (2005). The spread of HIV in Africa. *J Neurovirol* **11** (Suppl. 1), 66–75.
- Ohlinger, V. F., Pesch, S. & Bischoff, C. (2000). History, occurrence, dynamics, and current status of PRRS in Europe. *Vet Res* **31**, 86–87.
- OIE (1992). Animal health status and disease control methods (part one: reports). In *World Animal Health 1991*, vol. VII, no. 2, p. 126. Paris: Office International Épidémiologie.
- Oleksiewicz, M. B., Bøtner, A., Madsen, K. G. & Storgaard, T. (1998). Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Vet Microbiol* **64**, 7–22.
- Oleksiewicz, M. B., Bøtner, A., Toft, P., Grubbe, T., Nielsen, J., Kamstrup, S. & Storgaard, T. (2000). Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus deletion mutants: correlation with the porcine antibody response to a hypervariable site in the ORF 3 structural glycoprotein. *Virology* **267**, 135–140.
- Pesch, S., Meyer, C. & Ohlinger, V. F. (2005). New insights into the genetic diversity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol* **107**, 31–48.
- Plagemann, P. G. W. (2003). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: origin hypothesis. *Emerg Infect Dis* **9**, 903–908.
- Shin, J.-H., Kang, Y.-B., Kim, Y.-J. & 12 other authors (1993). Sero-epidemiological studies on porcine reproductive and respiratory syndrome in Korea. I. Detection of indirect fluorescent antibodies. *J Agric Sci* **35**, 572–576.
- Snijder, E. J., Brinton, M. A., Faaborg, K. S., Godeny, E. K., Gorbalenya, A. E., MacLachlan, N. J., Mengeling, W. L. & Plagemann, P. G. W. (2004). Family Arteriviridae. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. London: Elsevier/Academic Press.
- Stadejek, T., Stankevicius, A., Storgaard, T., Oleksiewicz, M. B., Belák, S., Drew, T. W. & Pejsak, Z. (2002). Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *J Gen Virol* **83**, 1861–1873.
- Suarez, P., Zardoya, R., Martin, M. J., Prieto, C., Dopazo, J., Solana, A. & Castro, J. M. (1996). Phylogenetic relationships of European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Res* **42**, 159–165.
- Thanawongnuwech, R., Damrongwatanapokin, S. & Horcharoen, A. (2003). PRRS virus in Southeast Asia. In *2003 PRRS Compendium*, pp. 269–273. Edited by J. Zimmerman & K.-J. Yoon. Des Moines: National Pork Board.
- Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tatsanakit, A. & Damrongwatanapokin, S. (2004). Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Vet Microbiol* **101**, 9–21.
- Tichy, H., Zaleska-Rutczynska, Z., O'Huigin, C., Figueroa, F. & Klein, J. (1994). Origin of the North American house mouse. *Folia Biol (Praha)* **40**, 483–496.
- van Vugt, J. J. F. A., Storgaard, T., Oleksiewicz, M. B. & Bøtner, A. (2001). High frequency RNA recombination in porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs preferentially between parental sequences with high similarity. *J Gen Virol* **82**, 2615–2620.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J. M. A & 19 other authors (1991). Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q* **13**, 121–130.
- Wissink, E. H. J., Kroese, M. V., Maneschijn-Bonsing, J. G., Meulenbergh, J. J. M., van Rijn, P. A., Rijsewijk, F. A. M. & Rottier, P. J. M. (2004). Significance of the oligosaccharides of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP_{2a} and GP₃ for infectious virus production. *J Gen Virol* **85**, 3715–3723.
- Yoshii, M., Kaku, Y., Murakami, Y., Shimizu, M., Kato, K. & Ikeda, H. (2005). Genetic variation and geographic distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan. *Arch Virol* **150**, 2313–2324.
- Zimmerman, J. J., Yoon, K.-J., Wills, R. W. & Swenson, S. L. (1997). General overview of PRRSV: a perspective from the United States. *Vet Microbiol* **55**, 187–196.

Supplementary Table S1. Sequence summary.

Sequence number	^a Farm and sequence name	Country	Administrative unit (economic region) of Russia	Year	Gen Bank Acc. No.		^b ORF7 size (nt)	^c pI N protein	^d Genotype/ subtype
					ORF5	ORF7			
1.	2888	Austria			AY875855	--			
2.	2906/2	Austria			AY875862	--			
3.	2234	Austria			AY875858	--			
4.	AN	Belarus		2001	--	EU071252	375	11.05	EU/3
5.	Bel	Belarus		2004	DQ324669	DQ324699	378	11.05	EU/2
6.	MN	Belarus		1999	--	EU071253	375	11.05	EU/3
7.	Bor	Belarus		2004	DQ324671	DQ324701	393	10.73	ungrouped
8.	BR	Belarus		2001	--	EU071254	375	10.82	EU/3
9.	Obu	Belarus		2005	DQ324676	DQ324707	375	11.08	EU/3
10.	Okt	Belarus		2004	DQ324677	DQ324708	375	10.46	ungrouped
11.	PK	Belarus		2002	EU071229	--			
12.	Sno	Belarus		2004	DQ324683	DQ324713	378	10.60	EU/2
13.	Soz	Belarus		2004	DQ324686	DQ324719	375	11.28	EU/3
14.	Soz(f2)	Belarus		2006	EU071227	EU071222	378	11.03	EU/2
15.	Soz(f3)	Belarus		2006	EU071228	EU071223	375	11.32	EU/3
16.	Vas	Belarus		2005	DQ324689	DQ324722	378	11.03	EU/2
17.	MG	Belarus		1999	--	EU071255	375	11.08	EU/3
18.	Vos	Belarus		2004	DQ324690	DQ324725	375	10.84	EU/3
19.	Yuz	Belarus		2004	DQ324692	DQ324727	375	11.32	EU/3
20.	ZD	Belarus		2000	--	EU071256	375	11.08	EU/3
21.	Zad	Belarus		2004	DQ324694	DQ324729	375	10.84	EU/3
22.	Zap	Belarus		2004	DQ324696	DQ324734	375	11.08	EU/3
23.	V-501	Czech Republic		1996	AF253531	--			
24.	KT	Czech Republic		2006	EU071226	EU071224	387	11.05	EU/1

25.	361-4	Denmark		1994	AY035915	AY035960	387	10.64	EU/1
26.	28639/98	Denmark		1998	AY035912	AY035957	387	10.60	EU/1
27.	2567/96	Italy		1996	AY035932	AY035976	387	10.84	EU/1
28.	2029/97	Italy		1997	AY035930	AY035973	387	10.21	EU/1
29.	IT7	Italy		2004	AY739963	--			
30.	IT8	Italy		2004	AY739964	--			
31.	IT15	Italy		2004	AY739971	--			
32.	IT19	Italy		2002	AY739975	--			
33.	IT42	Italy		2003	AY739998	--			
34.	IT62	Italy		2003	AY743932	--			
35.	Aus	Lithuania		2000	DQ324667	AF438362	378	10.79	EU/2
36.	Sid	Lithuania		2000	DQ324682	AF438363	378	11.46	EU/2
37.	Lelystad	The Netherlands		1991	M96262	M96262	387	10.46	EU/1
38.	Che	Poland		2005	DQ324673	DQ324703	387	10.46	EU/1
39.	Dob	Poland		2007	--	EU071225	387	10.29	EU/1
40.	Dzi	Poland		2005	DQ324675	DQ324705	387	10.79	EU/1
41.	Prz	Poland		2005	DQ324680	DQ324711	387	10.46	EU/1
42.	Sok	Poland		2004	DQ324684	DQ324715	387	10.46	EU/1
43.	RS	Russian Federation	Bashkortostan (Urals)	2005	EU071230	EU071257	387	10.84	EU/1
44.	BK	Russian Federation	Belgorod (Central Black Earth)	2006	EU071231	EU071258	387	10.79	EU/1
45.	BLG	Russian Federation		2006	EU071232	EU071259	387	10.79	EU/1
46.	FR	Russian Federation		2000	--	EU071260	387	11.00	EU/1
47.	GB-1	Russian Federation		1997	--	EU071261	387	10.64	EU/1
48.	GB-2	Russian Federation		2000	--	EU071262	387	10.79	EU/1
49.	RV	Russian Federation	Cheliabinsk (Urals)	2003	--	EU071263	387	11.47	EU/1
50.	VR	Russian Federation	Chuvashia (Volga-Viatka)	2005	EU071233	EU071264	378	11.25	EU/2
51.	KM	Russian Federation	Kemerovo (West Siberian)	1999	--	EU071265	378	11.27	EU/2

52.	KH-1	Russian Federation	Khabarovsk (Far Eastern)	2004	--	EU071266	387	11.28	EU/1
53.	KH-2	Russian Federation		2005	EU071234	EU071267	378	10.79	EU/2
54.	KH-3	Russian Federation		2005	EU071235	EU071268	387	11.27	EU/1
55.	SHV	Russian Federation	Kostroma (Central)	2006	EU071236	EU071269	378	11.27	EU/2
56.	IN	Russian Federation	Krasnodar (Northern Caucasus)	2005	EU071237	EU071270	387	10.82	EU/1
57.	KR	Russian Federation	Kursk (Central Black Earth)	2000	--	EU071271	375	11.08	EU/3
58.	MB-1	Russian Federation	Mordovia (Volga-Viatka)	2004	--	EU071272	378	10.59	EU/2
59.	MB-2	Russian Federation		2005	EU071238	EU071273	378	10.40	EU/2
60.	KZ-1	Russian Federation	Moscow (Central)	1999	--	EU071274	387	10.64	EU/1
61.	KZ-2	Russian Federation		2004	EU071239	EU071275	387	10.82	EU/1
62.	DZ	Russian Federation	Nizhny Novgorod (Volga-Viatka)	2000	--	EU071276	378	10.79	EU/2
63.	IL-1	Russian Federation		1997	EU071240	EU071277	378	11.03	EU/2
64.	IL-2	Russian Federation		1999	--	EU071278	378	11.03	EU/2
65.	VD	Russian Federation		1997	--	EU071279	387	11.05	EU/1
66.	NB	Russian Federation	Novgorod (North Western)	2006	EU071241	EU071280	387	11.27	EU/1
67.	NV-1	Russian Federation	Novosibirsk (West Siberian)	1996	--	EU071281	378	10.77	EU/2
68.	NV-2	Russian Federation		2004	--	EU071282	378	11.00	EU/2
69.	NV-3	Russian Federation		2006	EU071242	EU071283	378	10.77	EU/2
70.	OR	Russian Federation	Orenburg (Urals)	2000	--	EU071284	378	11.03	EU/2
71.	PMP	Russian Federation	Penza (Volga)	2006	EU071243	EU071285	387	10.64	EU/1
72.	PN	Russian Federation		2000	--	EU071286	387	10.64	EU/1
73.	PR	Russian Federation	Perm (Urals)	1998	--	EU071287	378	11.03	EU/2
74.	SM	Russian Federation	Smolensk (Central)	1998	--	EU071288	378	11.27	EU/2
75.	SP	Russian Federation	St Petersburg (North Western)	1999	--	EU071289	378	10.60	EU/2

76.	NE	Russian Federation	Tatarstan (Volga)	1999	--	EU071290	378	10.55	EU/2
77.	NK-1	Russian Federation		1999	--	EU071291	378	10.60	EU/2
78.	NK-2	Russian Federation		2004	--	EU071292	378	10.60	EU/2
79.	TM-1	Russian Federation		2000	--	EU071293	387	10.80	EU/1
80.	TM-2	Russian Federation		2005	EU071244	EU071294	378	11.00	EU/2
81.	TT	Russian Federation		1998	--	EU071295	387	11.08	EU/1
82.	TL	Russian Federation	Tula (Central)	1999	--	EU071296	378	10.79	EU/2
83.	ZV	Russian Federation	Tver (Central)	2004	EU071245	EU071297	378	10.55	EU/2
84.	UD	Russian Federation	Udmurtia (Urals)	2001	--	EU071298	378	11.25	EU/2
85.	VL-1	Russian Federation	Vladimir (Central)	2001	--	EU071299	378	11.08	ungrouped
86.	VL-2	Russian Federation		2004	--	EU071300	378	11.08	ungrouped
87.	VL-3	Russian Federation		2006	EU071246	EU071301	378	11.08	ungrouped
88.	BT-1	Russian Federation	Vologda (Northern)	2000	--	EU071302	387	11.28	EU/1
89.	BT-2	Russian Federation		2006	EU071247	EU071303	387	10.82	EU/1
90.	ND-1	Russian Federation		1998	EU071248	EU071304	387	11.28	EU/1
91.	ND-2	Russian Federation		1999	--	EU071305	387	11.28	EU/1
92.	ND-3	Russian Federation		2006	EU071249	EU071306	387	11.05	EU/1
93.	VSH	Russian Federation	Voronezh (Central Black Earth)	2005	EU071250	EU071307	387	10.64	EU/1
94.	GK	Russian Federation	Yaroslavl (Central)	2005	EU071251	EU071308	378	10.55	EU/2
95.	IV3140	South Korea			DQ355821	DQ355822	387	10.60	EU/1
96.	CP6874	South Korea			EF031042	--			
97.	L57/2/91	Spain		1991	AY035935	AY035979	387	10.60	EU/1
98.	CRESA9	Spain			DQ009634	--			
99.	CRESA11	Spain			DQ009626	--			
100.	CRESA13	Spain			DQ009637	--			
101.	CRESA14	Spain			DQ009638	--			
102.	CRESA22	Spain			DQ009645	--			
103.	28/2003	Spain			DQ345755	--			

104.	01RB1	Thailand		2001	--	AY796316	387	10.84	EU/1
105.	03RB1	Thailand			AY297124	--			
106.	EuroPRRS	USA			AY366525	AY366525	387	10.46	EU/1
107.	Amervac PRRS	Spain		vaccine	DQ324668	DQ324698	387	10.60	EU/1
108.	Pyrsvac- 183	Spain		vaccine	DQ324681	DQ324712	387	10.60	EU/1
109.	Porcilis PRRS	The Netherlands		vaccine	DQ324678	DQ324710	387	10.46	EU/1

^aFor the new sequences derived in the present study (numbers 4, 6, 8, 17, 20, 43-94), letters indicate farm name, and number suffixes indicate repeated sampling over time.

^bThe ORF7 size is including stop codon, i.e., ORF7 sizes of 387, 378 and 375 nt correspond to 128, 125 and 124 amino acids, respectively.

^cPredicted isoelectric point (pI) for the deduced ORF7 (nucleocapsid) protein sequences.

^dThe subtypes 1, 2 and 3 of EU genotype PRRSV were assigned based on ORF7 sequence. EU genotype PRRSV isolates for which ORF7 sequence is not available were not assigned subtype