



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 159**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)

**C12N 7/04** (2006.01)

**C12N 7/08** (2006.01)

**C12N 7/02** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00926264 .3**

96 Fecha de presentación : **21.04.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1183332**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.03.2002**

54 Título: **Vacuna contra el síndrome respiratorio y reproductivo porcino basada en el aislado JA-142.**

30 Prioridad: **22.04.1999 US 298110**  
**15.12.1999 US 461879**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.11.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.11.2010**

73 Titular/es: **UNITED STATES DEPARTMENT OF  
AGRICULTURE**  
**1400 Independence Avenue SW**  
**Washington, District of Columbia 20250-0302, US**  
**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.**

72 Inventor/es: **Mengeling, William, L.;**  
**Vorwald, Ann;**  
**Lager, Kelly;**  
**Gorcycya, David, E.;**  
**Burkhart, Kelly y**  
**Roof, Mike**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 348 159 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

# ES 2 348 159 T3

## DESCRIPCIÓN

Vacuna contra el síndrome respiratorio y reproductivo porcino basada en el aislado JA-142.

### 5 Antecedentes de la invención

#### Campo de la invención

10 La presente invención se refiere en líneas generales al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (SRRP) atípico avirulento atenuado (VSRRP) y a las vacunas de virus vivo correspondientes para su administración a ganado porcino para conferir una inmunidad eficaz en el ganado porcino frente a VSRRP. La invención se refiere a un nuevo procedimiento altamente eficaz para pasar virus SRRP hasta su atenuación.

#### Descripción de la técnica anterior

15 El SRRP surgió a finales de los años 80 como una enfermedad vírica importante del ganado porcino. El VSRRP causa insuficiencia reproductiva grave en cerdas gestantes, manifestada en forma de partos prematuros, aumento del número de mortinatos, cerdos momificados y nacidos débiles, tasa de partos disminuida y retraso en la vuelta al estro. Además, el sistema respiratorio del ganado porcino infectado con VSRRP se ve afectado desfavorablemente, lo que se demuestra por lesiones que aparecen en los pulmones del ganado porcino infectado. Para combatir los problemas asociados con la infección por VSRRP, se han desarrollado vacunas que conferían inmunidad a las cepas de SRRP existentes entonces.

25 Las epidemias de una forma excepcionalmente grave de SRRP, denominado en lo sucesivo en el presente documento "SRRP atípico", se reconoció por primera vez en Norteamérica en la última parte de 1996. Se diferenciaban de las epidemias de "SRRP típico" en que: 1) los signos clínicos eran más prolongados así como más graves; 2) la incidencia de abortos era superior, especialmente durante la primera parte y la mitad de la gestación; 3) existía una mayor incidencia de mortalidad de cerdas nulíparas y mutíparas; 4) el VSRRP se aislaba menos frecuentemente de fetos abortados, cerdos mortinatos y cerdos nacidos vivos -quizá porque los abortos eran más frecuentemente el resultado de una enfermedad maternal aguda más que de una infección transplacentaria; 5) las lesiones pulmonares de los cerdos jóvenes afectados eran más amplias; y 6) las vacunas disponibles en el mercado proporcionaban escasa o ninguna protección. En su conjunto, estas observaciones indicaban la emergencia de cepas más virulentas y antigénicamente diferentes de SRRP y la necesidad de una nueva generación de vacunas contra SRRP.

35 El procedimiento usado más frecuentemente para producir vacunas de virus vivo atenuado es realizar pases en serie del virus en un sustrato (habitualmente un cultivo celular) distinto del huésped natural (S) hasta que se atenúe lo suficiente (es decir, se reduzca su virulencia o capacidad para producir enfermedades) para usarlo como vacuna. Para el primer pase, se infecta un cultivo celular con el inóculo seleccionado. Después de obtener pruebas claras de replicación de virus (por ejemplo, efectos citopáticos inducidos por virus [ECP] en las células infectadas), se usa una alícuota del medio de cultivo celular, o células infectadas, o ambas, del primer pase para infectar un segundo cultivo celular. El procedimiento se repite hasta que una o más mutaciones críticas en el genoma viral causan una atenuación suficiente de modo que el virus pueda usarse con seguridad como vacuna. El grado de atenuación se determina habitualmente empíricamente exponiendo al huésped natural (S) a niveles de pase progresivamente mayores del virus.

45 El procedimiento anterior es básicamente válido y se ha usado con éxito para el desarrollo de numerosas vacunas para uso humano y veterinario. Sin embargo, es relativamente ineficaz porque la fase logarítmica de la replicación de virus, durante la que es más probable que se produzcan mutaciones, se completa con frecuencia mucho antes de que se hagan visiblemente evidentes pruebas de la replicación viral.

50 El documento US 5.840.563 desvela un procedimiento para los virus del síndrome respiratorio y de infertilidad porcino en aumento, por el que el virus se inocula en células de simio y las células de simio inoculadas se incuban.

55 El documento US 5.846.805 describía un virus del síndrome respiratorio y de infertilidad porcino atenuado que se produce por un procedimiento que comprende pasar el virus del síndrome respiratorio y de infertilidad porcino por células de simio.

El documento US 5.476.778 desvela un procedimiento de atenuación de virus del síndrome respiratorio y de infertilidad porcino que comprende pasar el virus por una línea celular de simio en condiciones bien definidas.

60 El documento US 4.211.843 desvela un procedimiento para la producción de una cepa atenuada de virus del sarampión, eficaz para la producción de vacuna de virus del sarampión atenuado.

El documento US 4.224.412 desvela una vacuna de cultivo de virus vivo contra el moquillo canino y procedimientos de preparación de dicha vacuna.

65 Ciaccio, G. (1970) [Biology of attenuated, mumps rubella, measles and rabies viruses. Comparative considerations on the methods of attenuation of their virulence] Rivista di biologia 63 (1), 87-129 describe la biología de diferentes virus atenuados.

## ES 2 348 159 T3

Kawai y Masumoto (1977) *Virology* 76, 60-71 describen partículas interferentes y no interferentes generadas por un virus variante de placas pequeñas de rabia.

Por lo tanto, existe una necesidad indudable en la técnica de una vacuna que confiera una inmunidad eficaz contra cepas de VSRRP, incluyendo cepas de VSRRP atípicas recientemente descubiertas. También existe la necesidad en la técnica de un procedimiento de preparación de dicha vacuna. Por último, lo que se necesita es un procedimiento de pase de un virus que atenúe el virus más eficazmente de lo que hasta ahora se creía posible, con el virus atenuado resultante generando anticuerpos específicos de VSRRP en ganado porcino, confiriendo de este modo una inmunidad eficaz frente a una infección posterior por VSRRP.

### Sumario de la invención

La presente invención se define como sigue: Un procedimiento de pases múltiples para atenuar un virus SRRP capaz de inducir un efecto citopático, que incluye las etapas de replicar sucesivamente dicho virus por inoculación y replicación del virus en cultivos celulares individuales hasta que se consiga su atenuación, caracterizado porque cada etapa de inoculación y replicación sucesiva comprende

- 1) retirar una muestra que contiene virus del cultivo celular mientras que el virus se está replicando a una velocidad logarítmica y antes de la inducción de efectos citopáticos en el cultivo celular,
- 2) inocular el siguiente cultivo celular con una alícuota de dicha muestra de modo que se usa la alícuota más pequeña que mantiene la infección y la replicación logarítmica, y de modo que sólo se transfieren cantidades pequeñas de virus de un pase a otro,
- 3) conservar cada cultivo celular del que se retiró una muestra (de acuerdo con la etapa 1) después de la etapa de retirada y
- 4) observar si se produce inducción de un efecto citopático en cada uno de dichos cultivos celulares conservados.

La etapa de retirada 1) se lleva a cabo aproximadamente 24 horas después de la inoculación de dichos cultivos celulares y los cultivos celulares empleados comprenden una monocapa de células que tienen una confluencia superior a aproximadamente el 70%.

El procedimiento comprende además la etapa de ensayar periódicamente dicho virus progenie para determinar su atenuación y también incluye la etapa de proporcionar un exceso de células inicialmente no infectadas para asegurar que dicho virus pueda replicarse a una velocidad logarítmica.

Además, cada una de las inoculaciones sucesivas que implican el pase antes de que se observe un efecto citopático se lleva a cabo después de que se observe un efecto citopático en un cultivo celular previamente inoculado, siendo dicho cultivo celular previamente inoculado un cultivo parental de las células de las que se retira una alícuota para el pase.

La presente invención supera los problemas resumidos anteriormente. Se describen cepas de VSRRP atípico atenuado y las vacunas vivas modificadas mejoradas correspondientes que confieren una inmunidad eficaz contra cepas de VSRRP atípicas recientemente descubiertas. La expresión "inmunidad eficaz" se refiere a la capacidad de una vacuna para prevenir infecciones por VSRRP en ganado porcino, incluyendo infecciones por VSRRP atípico que dan como resultado signos clínicos importantes de la enfermedad. Es decir, el ganado porcino inmunizado puede o no ser serológicamente positivo para VSRRP, pero no presenta ningún síntoma clínico importante. La expresión "VSRRP atípico" se refiere a estas nuevas cepas de SRRP que son sustancialmente más virulentas que las cepas de VSRRP típicas.

La vacuna descrita en el presente documento incluye virus vivo cuya virulencia se ha atenuado. Se ha demostrado que el virus atenuado resultante es avirulento y confiere una inmunidad eficaz. Se seleccionó una cepa particularmente virulenta de SRRP atípico (denominada JA-142) que causaba síntomas especialmente graves de SRRP y representa la cepa dominante de VSRRP atípico para su atenuación posterior por pase. El virus atenuado resultante se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Rockville, MD el 2 de febrero de 1999 y concordaba con el N° de Acceso de la ATCC VR-2638. Este virus atenuado es un Virus de Semilla Maestra (VSM) preferido que se ha pasado y desarrollado posteriormente como una vacuna de VSRRP eficaz.

El nombre dado al virus no atenuado, JA-142, surge del patrón enzimático de restricción. El 1 representa la incapacidad de la enzima Mlu I para escindir el virus en el marco de lectura abierta 5 (ORF 5). El 4 representa la escisión por Hinc II en las posiciones de pares de bases 118 y 249 de la ORF 5 y secuencias contiguas cortas. El 2 representa la escisión por Sac II en la posición del par de bases 54 de la ORF 5 y secuencias contiguas cortas.

El pase del virus hasta su atenuación se efectuó usando un nuevo procedimiento que daba como resultado una eficacia aumentada. En concreto, el virus se mantuvo en la fase de replicación logarítmica durante todos los múltiples pases de cultivo celular para acortar sustancialmente el tiempo hasta la atenuación. Esto se consigue asegurándose

## ES 2 348 159 T3

de que en cada cultivo celular exista un exceso sustancial de células inicialmente no infectadas respecto al número de virus presente. Así, transfiriendo sólo pequeñas cantidades de virus de un pase a otro, se asegura una replicación logarítmica.

5 En la práctica, el procedimiento se inicia normalmente por inoculación de varios cultivos celulares distintos con  
alícuotas virales progresivamente más pequeñas (es decir, menor cantidad de virus en cada cultivo). Por ejemplo, los  
cultivos de partida podrían contener alícuotas virales de 200  $\mu$ l, 20  $\mu$ l y 2  $\mu$ l. Después de un periodo de incubación corto  
inicial (por ejemplo, ~24 horas), las mismas alícuotas virales (en el ejemplo, de 200  $\mu$ l, 20  $\mu$ l y 2  $\mu$ l) de cada cultivo  
10 celular se transfieren a cultivos individuales recién preparados (previamente no infectados), mientras que los cultivos  
de partida se controlan hasta que se observa o no un efecto citopático (ECP). Este procedimiento se continúa en un  
orden en serie durante múltiples pases, usando las mismas alícuotas virales en cada caso y conservando los cultivos  
para la observación del ECP. Si todos los pases de cultivo en serie presentan ECP después de que se completen un  
número seleccionado de pases, puede terminarse la serie de mayor alícuota viral (en el ejemplo, de 200  $\mu$ l y 20  $\mu$ l),  
15 después de lo cual se emplea otra serie de alícuotas virales progresivamente más pequeñas (por ejemplo, de 2  $\mu$ l,  
0,2  $\mu$ l y 0,02  $\mu$ l) y el procedimiento se repite de nuevo, manteniendo de nuevo los cultivos celulares después de la  
transferencia para la observación del ECP.

En algún punto en este procedimiento de inoculación de alícuotas virales sucesivamente más pequeñas no se  
observará ECP en un cultivo celular dado. Cuando esto ocurre, el siguiente mayor nivel de alícuota viral que muestra  
20 ECP sustituye al pase en el que no se observó ECP, después de lo cual se inoculan pases posteriores usando las  
alícuotas virales previamente empleadas.

En vista de que un virus tenderá a volverse más eficaz en la infección de células y también a replicarse hasta un  
mayor título de infectividad para cultivos celulares con el tiempo (lo que es especialmente cierto con virus de ARN  
tales como el VSRPP), se observará que son necesarias alícuotas virales cada vez más pequeñas para mantener la  
25 infección durante la transferencia en serie. El uso de la alícuota más pequeña que mantiene la infección contribuye a  
asegurar que la replicación viral permanece en una fase logarítmica durante todo el procedimiento.

La secuencia de ADN del virus pasado atenuado del pase 201 se determinó después usando procedimientos con-  
30 vencionales. La secuencia de este virus atenuado se designó como VSM JA-142 Pase N° 201, y cuya secuencia se  
proporciona como SEC ID N°: 1. La secuencia del virus virulento, JA-142, se proporciona como SEC ID N°: 2.

Como se usan en el presente documento, serán aplicables las definiciones siguientes: La "identidad de secuencia",  
como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias  
35 polinucleotídicas, en concreto una secuencia de referencia y una secuencia dada que se comparará con la secuencia  
de referencia. La identidad de secuencia se determina por comparación de la secuencia dada con la secuencia de  
referencia después de que las secuencias se hayan alineado óptimamente para producir el mayor grado de similitud  
de secuencia, según se determina por el emparejamiento entre hebras de dichas secuencias. Tras dicho alineamiento,  
se determina la identidad de secuencia en base a posición por posición, por ejemplo, las secuencias son "idénticas"  
40 en una posición particular si, en esa posición, los nucleótidos o restos aminoacídicos son idénticos. El número total  
de dichas identidades de posición se divide después entre el número total de nucleótidos o restos en la secuencia  
de referencia para dar el % de identidad de secuencia. La identidad de secuencia puede calcularse fácilmente por  
procedimientos conocidos, incluyendo, pero sin limitación, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk,  
A. N., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988), Biocomputing: Informatics y Genome Projects, Smith, D.  
45 W., ed., Academic Press, Nueva York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M. y Griffin,  
H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic  
Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York (1991); y  
Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988).

50 Los procedimientos preferidos para determinar la identidad de secuencia están diseñados para dar el mayor empa-  
rejamiento entre las secuencias ensayadas. Los procedimientos para determinar la identidad de secuencia están codifi-  
cados en programas informáticos disponibles públicamente que determinan la identidad de secuencia entre secuencias  
dadas. Los ejemplos de dichos programas incluyen, pero sin limitación, el paquete de programas GCG (Devereux, J.  
y col., Nucleic Acids Research, 12 (1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. y col., J. Molec.  
55 Biol., 215: 403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente en el NCBI y otras fuentes (BLAST  
Manual, Altschul, S. y col., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. y col., J. Molec. Biol., 215: 403-  
410 (1990)). Estos programas alinean óptimamente secuencias usando pesos de huecos por defecto para producir el  
mayor nivel de identidad de secuencia entre las secuencias dada y de referencia. Como ilustración, por un polinu-  
cleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene una "identidad de secuencia" de al menos, por ejemplo, el  
60 95% con una secuencia de nucleótidos de referencia se entiende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido  
dado es idéntica a la secuencia de referencia excepto por que la secuencia polinucleotídica dada puede incluir hasta  
5 mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, en  
un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 95% respecto a la  
secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden dele-  
65 cionarse o sustituirse con otro nucleótido, o un número de nucleótidos de hasta el 5% de los nucleótidos totales en la  
secuencia de referencia pueden insertarse en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia  
pueden aparecer en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia, o en cualquier parte  
entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los nucleótidos de la secuencia de referencia o

en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. De forma análoga, por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos dada que tiene, por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos el 95% con una secuencia de aminoácidos de referencia, se entiende que la secuencia de aminoácidos dada del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia excepto por que la secuencia polipeptídica dada puede incluir hasta 5 modificaciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia polipeptídica dada que tenga una identidad de secuencia de al menos el 95% con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta el 5% de los restos aminoacídicos en la secuencia de referencia pueden deletionarse o sustituirse con otro aminoácido, o un número de aminoácidos de hasta el 5% del número total de restos aminoacídicos en la secuencia de referencia pueden insertarse en la secuencia de referencia. Estas modificaciones de la secuencia de referencia pueden aparecer en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia, o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los restos de la secuencia de referencia o en el uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferentemente, las posiciones de restos que no son idénticos difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas. Sin embargo, las sustituciones conservativas no se incluyen como un emparejamiento cuando se determina la identidad de secuencia.

De forma similar, la “homología de secuencia”, como se usa en el presente documento, también se refiere a un procedimiento para determinar el grado de relación de dos secuencias. Para determinar la homología de secuencia, dos o más secuencias se alinean óptimamente como se ha descrito anteriormente y se introducen huecos si es necesario. Sin embargo, al contrario que la “identidad de secuencia”, se cuentan las sustituciones de aminoácidos conservativas como emparejamiento cuando se determina la homología de secuencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido o polinucleótido que tenga una homología de secuencia del 95% con una secuencia de referencia, el 95% de los restos aminoacídicos o nucleótidos en la secuencia de referencia deben coincidir, o comprender una sustitución conservativa, con otro aminoácido o nucleótido, o un número de aminoácidos o nucleótidos de hasta el 5% de los restos aminoacídicos o nucleótidos totales, sin incluir sustituciones conservativas, en la secuencia de referencia pueden insertarse en la secuencia de referencia.

Una “sustitución conservativa” se refiere a la sustitución de un resto aminoacídico o nucleótido con otro resto aminoacídico o nucleótido que tiene características similares o propiedades que incluyen tamaño, hidrofobicidad, etc., de modo que la funcionalidad global no cambia significativamente.

El término “aislado” significa alterado “por la mano del hombre” de su estado natural, es decir, si aparece en la naturaleza, se ha modificado o retirado de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido presente de forma natural en un organismo vivo no está “aislado”, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está “aislado”, según se emplea el término en el presente documento.

Preferentemente, las secuencias que comparten una homología de secuencia de al menos aproximadamente el 75%, más preferentemente de al menos aproximadamente el 85%, aún más preferentemente de al menos aproximadamente el 90% y, más preferentemente, de al menos aproximadamente el 95% con la SEC ID N°: 1, son eficaces para conferir inmunidad a animales vacunados con virus atenuados que contienen dichas secuencias homólogas. Como alternativa, las secuencias que comparten una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 65%, más preferentemente de al menos aproximadamente el 75%, aún más preferentemente de al menos aproximadamente el 85% y, más preferentemente, de al menos aproximadamente el 95% con la SEC ID N°: 1, también son eficaces para conferir inmunidad a animales vacunados con virus atenuados que contienen dichas secuencias idénticas.

### Descripción detallada de la realización preferida

Los ejemplos siguientes exponen realizaciones preferidas de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y que nada en los mismos debe tomarse como una limitación del ámbito global de la invención.

#### 55 Ejemplo I

##### *Materiales y Procedimientos*

Este ejemplo describe un procedimiento de pase para atenuar virus que maximiza la eficacia de atenuación asegurando que el virus esté preferentemente en una fase de replicación logarítmica. El virus se pasó (es decir, una alícuota de medio nutritivo que incluía el virus, células no unidas y residuos celulares de un cultivo celular infectado por virus se añadió al medio nutritivo de un cultivo no infectado) a intervalos diarios. Se añadieron diferentes cantidades de virus a cada intervalo usando múltiples cultivos. Por ejemplo, al principio, se transfirieron 200  $\mu$ l a un cultivo no infectado, se añadieron 20  $\mu$ l a un segundo cultivo no infectado y 2  $\mu$ l a un tercer cultivo no infectado. El objetivo era tener una cantidad suficiente de células susceptibles de modo que los ciclos de replicación pudieran continuar hasta la transferencia siguiente. El procedimiento se consideraba exitoso si las células mostraban finalmente ECP. Sin embargo, debido a que el ECP inducido por VSRRP no aparece hasta cierto tiempo después de la fase de crecimiento logarítmica, los pases se realizaron antes de que se supiera si serían o no finalmente exitosos (“pases a ciegas”). Se

## ES 2 348 159 T3

decía que los pases que daban como resultado ECP inducido por virus habían dado como resultado una “toma”. Si un pase no daba como resultado una toma, el pase se reiniciaba la mayor dilución del último pase que daba como resultado una toma. A medida que se realizaban más y más pases, el virus se adaptaba más a replicarse en la línea celular y era menos capaz de producir síntomas de enfermedad en su huésped original. Estos cambios se producen por mutaciones aleatorias que se producen durante la replicación.

Usando este procedimiento, se usaron los procedimientos siguientes para pasar un virus ejemplar de acuerdo con la presente invención, VSM, JA-142. Esta cepa se pasó en cultivos celulares MARC-145 a intervalos diarios. Se usaron placas de veinticuatro pocillos para el procedimiento para minimizar la cantidad de células y de medio nutritivo necesaria y para simplificar la técnica de pase de múltiples alícuotas. Se añadieron células y medio nutritivo a cada pocillo y se dejó que las células formaran o casi formaran (más de aproximadamente el 70%) una monocapa confluyente. El medio nutritivo comprendía medio esencial mínimo (MEM) de solución salina equilibrada de Earle a aproximadamente el 90%, suero fetal de ternera al 10% y 0,05 mg/ml de sulfato de gentamicina. El volumen de medio nutritivo usado era de aproximadamente 1 ml. Habitualmente se usaron tres pocillos de una columna para cada cantidad de virus que se transfirió. Una alícuota de medio nutritivo del pase anterior se transfirió al primer pocillo de la columna a las 48 ó 72 horas, después de que se hubieran preparado los cultivos celulares, medio nutritivo del primer pocillo se transfirió al segundo pocillo de la misma columna a las 72 ó 96 horas y al tercer pocillo de la misma columna a las 96 ó 120 horas. Las placas se preparaban habitualmente dos veces por semana, de modo que a veces se usaba el cuarto pocillo de la columna y a veces no se usaba. Las condiciones de pase se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda que contenía CO<sub>2</sub> al 5%.

Se ensayaron alícuotas de diferentes tamaños (que tenían diferentes cantidades de virus) para cada pase para determinar si la cantidad de virus era suficiente para inducir el ECP. Por ejemplo, se usó una serie distinta de transferencias de alícuotas (pases) de 200  $\mu$ l, 20  $\mu$ l y 2  $\mu$ l, respectivamente, hasta que las alícuotas más pequeñas presentaban sistemáticamente ECP, siendo el objetivo transferir la alícuota más pequeña que producía ECP. Cuando la alícuota más pequeña (por ejemplo, de 2  $\mu$ l) del grupo de alícuotas que se estaba ensayando daba como resultado sistemáticamente ECP, se ensayaban cantidades menores (por ejemplo, de 0,2  $\mu$ l y 0,02  $\mu$ l). Cuando una dilución determinada no presentaba ECP, esa serie de cultivos se reiniciaba con la siguiente menor cantidad que daba como resultado ECP a ese pase (es decir, si la transferencia de 2  $\mu$ l no tenía éxito produciendo ECP en el pase 25 pero la transferencia de 20  $\mu$ l en el pase 25 tenía éxito, la transferencia de 2  $\mu$ l se repetía usando 20  $\mu$ l, reanudando las transferencias de 2  $\mu$ l para el pase 26).

Usando este procedimiento, se determinaba la menor cantidad de virus que era necesario transferir para obtener ECP. El virus se pasaba con éxito a intervalos diarios usando las cantidades siguientes de medio nutritivo infectado por virus (que reflejan la mayor dilución [es decir, la alícuota más pequeña] que daba como resultado ECP, teniendo presente que también funcionarían otras diluciones):

(Tabla pasa a página siguiente)

## ES 2 348 159 T3

	Número de Pase	Cantidad Transferida
5	3-21	200 $\mu$ l
	22, 23	20 $\mu$ l
	24-41	200 $\mu$ l
10	42-83	20/200 $\mu$ l (con alternancia)
	84-90	20 $\mu$ l
	91-112	2 $\mu$ g
15	113	0,2 $\mu$ l
	114-116	2 $\mu$ l
	117	0,2 $\mu$ l
20	118-120	2 $\mu$ l
	121	0,2 $\mu$ l
	122-124	2 $\mu$ l
25	125-167	0,2 $\mu$ l
	168	0,02 $\mu$ l
	169-171	0,2 $\mu$ l
30	172	0,02 $\mu$ l
	173-175	0,2 $\mu$ l
	176	0,02 $\mu$ l
35	177-179	0,2 $\mu$ l
	180	0,02 $\mu$ l
40	181-183	0,2 $\mu$ l
	184	0,02 $\mu$ l
	185-187	$\mu$ l
45	188	0,02 $\mu$ l
	189-191	0,2 $\mu$ l
	192	0,02 $\mu$ l
50	193-195	0,2 $\mu$ l
	196	0,02 $\mu$ l
	197	0,2 $\mu$ l
55		

### *Resultados y Discusión*

60 El pase de los virus usando el procedimiento anterior daba como resultado un VSRRP atenuado, JA-142. Como es evidente, el virus se adaptaba más a replicarse en el cultivo celular y por lo tanto requería que se transfiriera una menor cantidad de medio nutritivo infectado por virus a medida que continuaban los pases. Para transferencias usando una cantidad muy pequeña de medio nutritivo infectado por virus (por ejemplo, de 0,2  $\mu$ l o 0,02  $\mu$ l) era necesaria una dilución distinta. Esta dilución se efectuaba añadiendo una pequeña cantidad de medio nutritivo infectado por virus a una mayor cantidad de medio nutritivo. Por ejemplo, para obtener una transferencia de 0,2  $\mu$ l, se añadían 2  $\mu$ l de medio nutritivo infectado por virus a 20  $\mu$ l a medio nutritivo y se añadían 2  $\mu$ l de esta dilución al siguiente cultivo en la serie. Usando esta estrategia, se usaba la mayor dilución que daba como resultado un ECP y se minimizaba el tiempo necesario para pasar el virus. El pase a intervalos diarios aseguraba que el virus estaba siempre en una fase de

## ES 2 348 159 T3

replicación logarítmica. La transferencia diaria también aseguraba que hubiera un número adecuado de células para la replicación del virus.

Debido a que las mutaciones (que probablemente son acumulativas) que probablemente dan como resultado la atenuación sólo se producen durante la replicación, no supone una ventaja tener sustancialmente todas las células infectadas ni que la replicación se desarrolle a una velocidad más lenta o se detenga antes de la siguiente transferencia. Basándose en estudios previos del VSRRP, se sabía que el ciclo de replicación es de aproximadamente 8 horas, por lo tanto, transferir una cantidad mínima de virus de medio nutritivo infectado por virus a medio nutritivo no infectado a intervalos diarios da como resultado que el virus tenga siempre muchas células en las que replicarse.

Como puede apreciarse fácilmente, el pase usando este procedimiento da como resultado ahorros de tiempo que hasta ahora se creían imposibles (es decir, cada pase requería menos tiempo). Esto es especialmente importante cuando son necesarios un alto número de pases para una atenuación viral adecuada. Si cada pase, usando los procedimientos antiguos, se realizaba a un intervalo de 3 días, un procedimiento que requiera 200 pases llevaría 400 días menos usando el procedimiento de la presente invención.

### Ejemplo 2

#### 20 *Materiales y Procedimientos*

Este ejemplo determinaba si el pase 200 del virus SRRP, JA-142, revertiría a virulento cuando se pasase en el animal huésped seis veces. Este estudio estaba constituido por seis grupos. Cinco cerdos del grupo 1 (grupo principal) se inocularon por vía intranasal con VSM de SRRP, JA-142 pase 200, mientras que tres cerdos del grupo 1A (grupo de control) se inocularon por vía intranasal con diluyente estéril. A los animales se les suministró pienso comercial y agua *ad libitum* durante todo el estudio. Los cerdos de ambos grupos de tratamiento se controlaron diariamente para determinar los signos clínicos (aspecto, signos respiratorios, heces, etc.). Después de seis días, los animales se pesaron, se les extrajo sangre y se sacrificaron. Después de puntuar los pulmones para las lesiones, se recogieron lavados pulmonares de cada animal. Los lavados pulmonares se congelaron y se descongelaron una vez, y se preparó una combinación usando 2,0 ml de suero y 2,0 ml de lavado pulmonar de cada animal dentro de un grupo para preparar los Retropases 1 y 1A, respectivamente. Esta combinación se usó para exponer (por vía intranasal) a los animales del grupo 2 y del grupo 2A, respectivamente. Este procedimiento se repitió para los grupos 3 y 3A a 6 y 6A. Los animales de cada grupo se alojaron por separado pero en condiciones idénticas.

Después de la inoculación, se recogieron muestras de sangre y se controlaron las temperaturas corporales. Se midieron las temperaturas rectales para cada animal periódicamente desde -1 DPE (días post-exposición) a 6 DPE y se calculó el promedio junto con las temperaturas de otros animales del mismo grupo. El estado de salud de cada animal se controló diariamente durante la duración del estudio. Los resultados se recopilaban y se puntuaban en forma de observación diaria. Los parámetros de puntuación son los siguientes:

1. Aspecto  
normal = 0; deprimido = 1; excitado = 2; comatoso/muerto = 30.
2. Respiración  
normal = 0; estornudos = 1; tos = 1; rápida/lenta = 2; con dificultad = 3.
3. Heces  
normales = 0; secas = 1; sueltas = 2; líquidas = 3.
4. Ojos  
normales = 0; llorosos = 1; apagados = 2; hundidos = 3.
5. Orificios nasales  
normales = 0; exudado seroso = 1; enrojecidos/inflamados = 2; úlceras con costras = 3.
6. Boca  
normal = 0; balas = 2; úlceras = 3.
7. Actividad  
NA

## ES 2 348 159 T3

8. **Apetito**

normal = 0; disminuido = 1; anoréxicos (ninguno) = 3.

5 9. **Otros**

10 Los animales también se pesaron antes de la inoculación y en la necropsia. Se calculó el promedio del aumento de peso para cada grupo para su comparación. Se realizaron ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) y ensayos de neutralización de suero (NS) de SRRP después de las exposiciones de los animales a artículos de ensayo y de control. Se realizaron intentos para aislar VSRRP de muestras de suero en células MA-104. Antes y después de la vacunación, se determinaron los recuentos de leucocitos totales usando un COULTER COUNTER MODEL Z1, Coulter Corp., Miami, FL. En la necropsia, se puntuaron los pulmones de cada animal. La puntuación del pulmón se realizó separando el pulmón en 7 secciones y determinando el porcentaje de implicación pulmonar (el porcentaje del área pulmonar afectada como se muestra por lesiones o enrojecimiento para cada sección y multiplicando por el área aproximada de pulmón total) del porcentaje de área pulmonar total que abarca la sección. Los parámetros para la puntuación pulmonar son los siguientes:

20	% de Implicación del Lóbulo Apical Izquierdo	X	0,10	=	_
	% de Implicación del Lóbulo Cardíaco Izquierdo	X	0,10	=	_
	% de Implicación del Lóbulo Diafragmático Izquierdo	X	0,25	=	_
25	% de Implicación del Lóbulo Apical Derecho	X	0,10	=	_
	% de Implicación del Lóbulo Cardíaco Derecho	X	0,10	=	_
	% de Implicación del Lóbulo Diafragmático Derecho	X	0,25	=	_
30	% de Implicación del Lóbulo Intermedio del Pulmón Derecho	X	0,10	=	_
	<b>Total (Suma de los valores en la columna más a la derecha)</b>			=	_

35

*Resultados y Discusión*

40 Cada grupo de cerdos se controló durante seis días después de la vacunación. Las puntuaciones clínicas eran bajas en todos los grupos. Los resultados de las puntuaciones clínicas se proporcionan en la Tabla 1.

TABLA 1

45

Puntuaciones Clínicas Diarias										
Tratamiento	Grupo 1 Nº de Cerdo	Día -1	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Promedio
JA-142 pase 200	545	0	0	2	0	0	0	0	0	0,25
	551	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	561	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	565	0	0	0	0	0	0	0	0	0

60

65

ES 2 348 159 T3

Puntuaciones Clínicas Diarias											
5		806	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Promedio	0	0	0,4	0	0	0	0	0,05	
10	Solución salina	550	0	0	0	0	0	0	0	0	
		568	0	0	0	0	0	0	0	0	
		801	0	0	0	0	0	0	0	0	
15		Promedio	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<b>Tratamiento</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Día -1</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día 4</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 6</b>	<b>Promedio</b>
		<b>Nº de Cerdo</b>									
20	Retropase 1	546	0	0	0	0	0	0	0	0	
		553	0	0	0	0	0	0	0	0	
25		562	0	0	0	0	0	1	0	0,125	
		572	0	0	0	0	0	0	0	0	
		573	0	0	0	0	2	0	0	0,25	
30		Promedio	0	0	0	0	0,4	0,2	0	0,075	
35	Retropase 1	556	0	0	0	0	0	0	0	0	
		566	0	0	0	0	0	0	0	0	
		802	0	0	0	0	0	0	0	0	
40		Promedio	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<b>Tratamiento</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Día -1</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día 4</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 6</b>	<b>Promedio</b>
		<b>Nº de Cerdo</b>									
45	Retropase 2	548	0	0	0	0	0	0	0	0	
		567	0	0	0	0	0	0	0	0	
50		569	0	0	0	0	1	1	0	0,25	
		574	0	0	0	0	0	0	0	0	
		804	0	0	0	0	0	0	0	0	
55		Promedio	0	0	0	0	0,2	0,2	0	0,05	
60	Retropase 2A	547	0	0	0	0	0	0	0	0	

65

ES 2 348 159 T3

Puntuaciones Clínicas Diarias											
5		5564	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		805	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Promedio	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	<b>Tratamiento</b>	<b>Grupo 4</b>	<b>Día -1</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día 4</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 6</b>	<b>Promedio</b>
		<b>Nº de Cerdo</b>									
	Retropase 3	549	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15		554	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		563	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		570	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20		803	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Promedio	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25											
	Retropase 3A	560	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		571	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30		575	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Promedio	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	<b>Tratamiento</b>	<b>Grupo 5</b>	<b>Día -1</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día 4</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 6</b>	<b>Promedio</b>
		<b>Nº de Cerdo</b>									
	Retropase 4	1	0	2	0	0	2	0	2	2	1
40		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	2	0	2	2	2	2	2	2	1,75
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Promedio	0,4	0,4	0,4	0,4	0,8	0,4	0,8	0,8	0,55
50											
	Retropase 4A	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		7	0	0	2	2	2	2	2	2	1,5
55		8	0	0	0	0	0	0	0	0	90
		Promedio	0	0,08	0,48	0,48	0,56	0,48	0,56	0,56	0,4
60	<b>Tratamiento</b>	<b>Grupo 6</b>	<b>Día -1</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día 4</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 6</b>	<b>Promedio</b>
		<b>Nº de Cerdo</b>									

65

## ES 2 348 159 T3

Puntuaciones Clínicas Diarias											
5	Retropase 5	10	0	0	0	0	2	0	0	2	0,5
		12	0	0	0	2	2	0	0	2	0,75
		14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10		15	2	2	2	0	0	0	0	0	1
		16	2	2	2	0	0	1	1	2	1,25
	Promedio		0,8	0,8	0,8	0,4	0,8	0,2	0,2	1,6	0,7
15											
	Retropase 5A	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20		11	2	2	0	0	0	0	0	0	0,5
		13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Promedio		0,666667	0,56	0,16	0,08	0,16	0,04	0,04	0,12	0,253333
25											

No había diferencias significativas entre grupos para las temperaturas rectales o los aumentos de peso diarios. Todas las puntuaciones pulmonares eran negativas.

Serológicamente, las proporciones de S/P de ELISA y títulos de NS eran negativos durante todo el periodo de ensayo de cada grupo. Se intentó el aislamiento de virus en todas las muestras de suero y lavados pulmonares. El día 6, el 60-100% de las muestras de suero de los grupos a los que se les administró JA-142, pase 200, y retropasses posteriores eran positivos. Los grupos a los que se les administró solución salina eran negativos. En los tres primeros pases se recuperó virus en los lavados pulmonares de sólo el 20-40% de los cerdos, pero en los últimos tres pases, el virus se recuperó del 50-80% de los cerdos.

Basándose en estos datos, el JA-142 pase 200 no revertía a virulento cuando se pasaba por cerdos seis veces.

### 40 Ejemplo 3

#### *Materiales y Procedimientos*

Este ejemplo demostraba que el nivel de atenuación de seguridad de VSM, JA-142, pase 200 no cambiaba significativamente durante seis retropasses en el animal huésped. La evaluación del nivel de atenuación o seguridad se realizó usando el modelo de cerda gestante y controlando el efecto sobre el rendimiento reproductivo. Este modelo es el sistema de ensayo más sensible y no depende de factores subjetivos para el ensayo de la virulencia. Este ejemplo estaba constituido por cuatro grupos (A, B, C y D) que tenían siete cerdas por grupo. El grupo A se inoculó por vía intranasal con VSM de SRRP, JA-142 pase 200. El grupo B se inoculó por vía intranasal con JA-142 pase 200, retroparse 6. El grupo C se inoculó por vía intranasal con diluyente estéril, para que actuaran como controles normales. El grupo D se inoculó por vía intranasal con VSRRP JA-142 pase 4. Los artículos de ensayo (exposición a JA-142, pase 4) se administraron a aproximadamente 93 días de gestación. Se controlaron las temperaturas corporales de las cerdas durante los siete primeros días después de la vacunación. Se recogieron muestras de sangre de las cerdas una vez por semana y en el momento del parto. Se recogieron muestras de sangre y se registraron los pesos de los lechones al nacimiento, a los 7 y 14 días de edad. El estado de salud de cada animal se controló diariamente durante la duración del estudio hasta y después del parto durante 14 días. El rendimiento del parto se evaluó observando el estado de salud de los lechones nacidos.

Se realizaron ensayos de ELISA de SRRP después de las exposiciones de las cerdas al artículo de ensayo. También se realizaron ensayos de ELISA de SRRP en los sueros de lechones semanalmente después del parto. Después de la exposición al artículo de ensayo, se realizaron intentos para aislar VSRRP de muestras de suero en células MA-104. Se midieron las temperaturas rectales periódicamente desde 0 días post-vacunación (DPV) a 7 DPV, y se determinó la temperatura promedio de cada grupo. Antes y después de la inoculación, se determinaron los recuentos de leucocitos totales como en el Ejemplo 1. Se realizaron observaciones clínicas de las cerdas como en el Ejemplo 2, desde -1 DPV hasta el parto. Se realizaron observaciones clínicas de los lechones desde el parto hasta los 14 días de edad. Por último, en la necropsia se puntuaron los pulmones de cada lechón para determinar el porcentaje de implicación pulmonar.

## ES 2 348 159 T3

### Resultados

Los resultados de ELISA indican que los animales usados en el presente estudio no habían recibido una exposición previa a VSRRP. Los animales que recibieron inóculos de virus, los grupos A, B y D, presentaban seroconversión a los 14 días post-tratamiento. Tres cerdas del grupo B permanecían negativas a los 14 días post-tratamiento. En el momento del parto, las cerdas negativas del grupo B daban positivo en el ensayo para anticuerpos contra VSRRP.

Los resultados de ELISA de los cerdos indicaban que la mayoría de las muestras de lechones nacidos de las cerdas del grupo A y del grupo B se tomaron después de que hubieran mamado. Esos cerdos que eran negativos a cero días post-parto (0 DPP) daban positivo en el ensayo a 7 DPP. Todos los cerdos nacidos de cerdas del grupo C eran seronegativos en el ensayo durante todo el estudio. Sólo se ensayaron unos pocos cerdos del grupo D, puesto que la mayoría eran mortinatos o estaban momificados. La mitad de esos cerdos que se ensayaron eran seropositivos. Esto indicaba que se tomaron muestras de los cerdos seronegativos antes de que mamaran, o que no fueron capaces de mamar. Todos los lechones nacidos de cerdas del grupo D murieron antes de 7 DPP. Los aislamientos de VSRRP de las cerdas de los grupos A y B eran esporádicos. Aunque los resultados del ensayo de ELISA indicaban que estas cerdas se inocularon con éxito con los artículos de ensayo virales, muchas permanecían negativas para aislamiento de virus a partir de suero.

La mayoría de los cerdos nacidos de cerdas de los grupos A y B daban positivo en el ensayo para aislamiento de virus durante la realización del estudio. La camada nacida de una cerda del grupo A nunca dio positivo en el ensayo y en la camada nacida de una cerda del grupo B sólo dos de ocho lechones dieron positivo en el ensayo para aislamiento de virus. No se recuperó virus de los lechones nacidos de cerdas del grupo C. Se recuperó virus de la mayoría (71%) de los lechones nacidos de cerdas del grupo D.

Las temperaturas rectales post-tratamiento eran corrientes. Los grupos que se trataron con VSM, retropase 6 o diluyente estéril no tuvieron mediciones que superasen los 38,72°C (101,7°F). El grupo D, tratado con JA-142, pase 4, tenía cuatro (de siete) cerdas que sufrieron temperaturas que superaban los 38,89°C (102°F), alcanzando una cerda 39,67°C (103,4°F) durante uno de los días. El comportamiento de aumento de peso de los lechones nacidos de cerdas de los grupos A (tratado con VSM) y B (tratados con VSM, retropase 6) era superior que el de los cerdos nacidos de cerdas de control del grupo C. El promedio de aumento de peso para el periodo de observación de 14 días era de 3,58 kg (7,9 lb). Para el grupo A era de 3,49 kg (7,7 lb); para el grupo B y el grupo C era de 3,13 kg (6,9 lb). La diferencia en el aumento de peso no estaba relacionada con el tamaño de la camada restante a los 14 días. Los tamaños de camada promedios a los 14 días post-parto (DPP) eran de 9 para el grupo A, 7 para el grupo B y 10 para el grupo C. Ningún cerdo nacido de las cerdas del grupo D sobrevivió más allá de 3 DPP.

Los recuentos de leucocitos (WBC) para las cerdas de los grupos A, B y C permanecían relativamente constantes. Los porcentajes promedios de los valores pre-exposición eran equivalentes a o superiores al 92% durante la duración del periodo de observación. Tres cerdas del grupo D tenían recuentos de WBC que eran inferiores al intervalo normal esperado ( $7-20 \times 10^6/\text{ml}$ ).

Las puntuaciones clínicas post-inoculación eran corrientes para las cerdas de los grupos A y B. Se observó que varias cerdas del grupo C experimentaban signos clínicos durante un periodo de varios días. La mayoría de los síntomas clínicos observados estaban en la categoría de apetito disminuido, síntomas respiratorios y depresión. Una cerda del grupo C murió el día 31 del ensayo de neumonía bacteriana crónica. Se observó que seis de las siete cerdas del grupo D tenían signos clínicos, principalmente de grados variables de gravedad, de pérdida de apetito, que variaban desde disminuido hasta anoréxico. Los resultados de la puntuación clínica se proporcionan en la Tabla 2.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

Puntuaciones Clínicas de Cerdas																	
Tratamiento	Nº Cerdas	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Grupo A	98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JA-142 VSM	133	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pase 200	147	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	178	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	215	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	233	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	243	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prom.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Grupo A	98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JA-142 VSM	133	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pase 200	147	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	178	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	215	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	233	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	243	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prom.	0	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Grupo A	98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JA-142 VSM	133	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

ES 2 348 159 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

		Puntuaciones Clínicas de Cerdas																
Pase 200	147	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	178	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	215	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	233	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	243	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prom.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Tratamiento</b>	<b>Nº Cerdas</b>	<b>-3</b>	<b>-2</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	
Grupo B	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Retropase 6	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2
	209	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	212	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	226	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prom.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	
Grupo B	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Retropase 6	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	149	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	209	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	212	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



ES 2 348 159 T3

Puntuaciones Clínicas de Cerdas														
	117	0	0	0	1	5	5	5	5	5	2	4	1	1
	144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	156	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	166	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prom.	0,8	0,5	0,5	0,8	1,5	1,5	1,5	1,8	1,8	0,7	1,3	0,5	0,5
		<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>43</b>
Grupo C	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diluyente Estéril	113	2	2	30										
	117	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	144	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	156	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	166	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prom.	0,7	0,7	6	0	0	0	0	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<b>Tratamiento</b>	<b>Nº Cerda</b>	<b>-3</b>	<b>-2</b>	<b>-1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
Grupo D	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
JA-142	106	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Pase 4	159	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1	1	1	1
	190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	206	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	232	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	234	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	Prom.	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7

ES 2 348 159 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Puntuaciones Clínicas de Cerdas																
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Grupo D	2	1	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JA-142	106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pase 4	159	1	1	1	3	4	2	3	3	3	2	0	0	2	0	0
	190	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	232	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	234	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Prom.	0,4	0,3	0,6	0,6	0,6	0,6	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0	0	0,3	0	0
	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>						
Grupo D	2	0	0	1	1	1	3	3	1	1						
JA-142	106	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
Pase 4	159	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
	190	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
	206	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
	232	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
	234	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
Prom.	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,4	0,4	0,1	0,1						

## ES 2 348 159 T3

Las observaciones clínicas de los lechones se incluían en dos categorías principales, muerte y apetito reducido. No había diferencias significativas entre los grupos A, B y C en el área del promedio de muertes por camada (MPC). El grupo A tenía un promedio de 1,3 MPC, el grupo B tenía un promedio de 2,4 MPC, el grupo C tenía un promedio de 2,0 MPC y ningún cerdo del grupo D sobrevivió más allá de tres días post-parto. Las puntuaciones clínicas para los lechones se proporcionan en la Tabla 3.

10

(Tabla pasa a página siguiente)

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 348 159 T3

TABLA 3

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Grupo A	98	813	0	0	1	30										
JA-142		814	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pase 200		815	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		816	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		817	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		818	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		819	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		820	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		821	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		822	1	30												
		Prom.	0,3	3	0,2	3,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	133	720	30													
		721	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		722	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		723	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		724	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		725	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		798	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ES 2 348 159 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		799	30													
		800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		807	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
		809	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		810	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		812	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prom.	4,6	0,2	0	0,1	0	0,1	0	0	0	0	0	0,1	0	0
	147	823	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		824	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
		825	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		845	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		846	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		847	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		848	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		849	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
		850	30													
		976	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		977	0	0	0	0	1	1	3	30						
		978	30													
		Prom.	5	0	0	0	0,1	0,1	0,4	3,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3

ES 2 348 159 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	178	486	30													
		487	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
		488	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		489	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		490	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		491	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		492	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		493	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		494	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prom.	3,3	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0
Grupo A	215	495	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JA-142		496	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pase 200		497	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		498	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		499	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		808	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prom.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	233	476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		477	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ES 2 348 159 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		478	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		479	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		481	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		482	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		483	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		484	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		485	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prom.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	243	707	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		708	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		709	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		710	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		711	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		713	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	30	0	0	0
		714	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		715	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		716	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		717	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

ES 2 348 159 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		718	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
		719	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prom.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	2,3	0,2	0	0
Grupo B																
Retropase 6	49	430	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		431	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		432	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		433	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		434	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		435	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		436	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		437	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		438	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prom.	3,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	459	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		460	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
		461	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
		462	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		463	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		464	0	0	0	1	1	1	30							

ES 2 348 159 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		465	0	30												
		Prom.	0	4,3	0,2	0,2	0,3	0,3	5,3	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	135	439	0	0	0	0	0	0	0	30						
		440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		441	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		442	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	30
		443	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		444	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
		445	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		446	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		447	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prom.	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,2	3,6	0,1	0,1	0,4	0,4	0,4	3,8
	149	231	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		232	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		233	0	0	0	0	0	0	30							
		234	0	0	0	0	0	0	3	1	1	3	1	1	1	1
		235	0	0	0	0	0	0	3	2	3	3	0	0	0	0
		236	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		237	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
		238	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0

ES 2 348 159 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		239	0	0	30											
		240	30													
		241	3	30												
		242	0	0	0	0	0	2	3	3	30					
		Prom.	2,8	2,7	3	0	0	0,4	4,4	0,9	4,4	1	0,3	0,3	0,3	0,3
Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Grupo B	209	448	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Retropase 6		449	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		451	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
		452	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		453	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		454	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
		455	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
		456	30													
		457	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	1	1
		458	30													
		Prom.	5,5	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
	212	243	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		244	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ES 2 348 159 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		245	0	0	0	0	3	1	30							
		246	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		247	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		248	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		249	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	2	0	0	0
		250	0	0	0	3	30									
		426	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		427	0	0	0	1	3	1	1	30						
		428	0	0	0	1	3	3	30							
		429	0	0	0	0	2	3	3	3	3	3	3	1	30	
		Prom.	0	0	0	0,4	3,6	0,9	6,2	3,9	0,4	0,4	0,6	0,1	3,8	0
	226	No gest.														
Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Grupo C																
Diluyente Estéril	58	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ES 2 348 159 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		51	0	0	0	2	2	1	1	1	30					
		Prom.	0	0	0	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	3,8	0	0	0	0	0
	113	17	30													
		18	30													
		19	30													
		20	30													
		21	0	30												
		22	30													
		23	30													
		Prom.	25,7	30												
	117	52	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		56	1	0	0	0	30									
		57	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ES 2 348 159 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
		61	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
		62	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prom.	0,5	0	0	0	2,7	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0
	144	146	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		147	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		150	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
		221	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0
		222	0	0	0	0	0	2	2	1	1	1	1	1	0	1
		223	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		224	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		225	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		970	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		971	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prom.	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1

ES 2 348 159 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Grupo C	156	63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diluyente Estéril		64	0	0	1	0	30									
		65	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
		66	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		67	0	0	0	0	1	0	1	1	30					
		68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		69	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		71	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	1	0
		72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		74	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prom.	0	0	0,1	0	2,5	0,2	0,3	0,3	2,6	0,1	0,1	0,1	0,1	0
	166	76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ES 2 348 159 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		81	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		141	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		143	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		145	1	30												
		Prom.	0,2	2,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Grupo D																
JA-142	2	891	1	3	30											
Pase 4		892	1	30												
		Prom.	1	16,5	30											
	106	Abortado	NA													
	159	883	30													
		884	30													
		Prom.	30													
	190	Abortado	NA													

ES 2 348 159 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	206	890	30													
		Prom.	30													
	232	888	30													
		889	30													
		Prom.	30													
	234	Abortado	NA													

## ES 2 348 159 T3

Los resultados de rendimiento de parto proporcionaban las diferencias y similitudes más espectaculares entre los diversos grupos de tratamiento. Puesto que los tratamientos no tendrían un efecto sobre el tamaño de las camadas, la forma más apropiada de comparar los resultados de partos sería usando valores de porcentaje. El grupo A tenía un porcentaje promedio de vivos/nacidos del 85% (DT +/- 9,6). El grupo B tenía un porcentaje promedio de vivos/nacidos del 89% (DT +/- 11,6). El grupo de control (grupo C) tenía un porcentaje promedio de vivos/nacidos del 83,4% (DT +/- 7,9). Los porcentajes promedios para mortinatos para los grupos A, B y C eran del 8,8 (DT +/- 9,66), 6,6 (DT +/- 9,7) y 14 (DT +/- 11,39), respectivamente. Los porcentajes promedios de momificados nacidos de cerdas de los grupos A, B y C eran del 6,1 (DT +/- 6,01), 3,9 (DT +/- 4,45) y 2,6 (DT +/- 4,01), respectivamente. Los porcentajes promedios de vivos/nacidos, mortinatos y momificados nacidos de las cerdas del grupo D eran del 8,7 (DT +/- 8,92), 10,7 (DT +/- 11,39) y 81,9 (DT +/- 17,18), respectivamente.

Los resultados de este ejemplo demostraban la estabilidad del VSM, JA-142, pase 200, después de pasarse en el animal huésped seis veces. No había diferencias significativas entre el grupo de cerdas tratadas con el VSM (grupo A) y las cerdas que se expusieron al virus del retropase 6 (grupo B) en las categorías de rendimiento de parto, leucopenia, temperaturas rectales y observaciones clínicas de las cerdas o de los lechones. Además, los resultados en estas mismas categorías para los grupos A y B eran comparables a los conseguidos por el grupo C, que se había tratado con diluyente estéril. Por último, el rendimiento de las cerdas que se habían expuesto al virus parental virulento de VSM, JA-142, pase 4, ilustraba claramente el nivel de atenuación del VSM y la ausencia de reversión a virulencia por el virus JA-142 retropase 6.

### Ejemplo 4

#### *Materiales y Procedimientos*

Este ejemplo evaluaba la seguridad y el nivel de atenuación de administrar una concentración 10X de VSM, JA-142, pase 201. El estudio se realizó en el modelo de cerda gestante y se controló el efecto de esta dosificación sobre el rendimiento reproductivo. El estudio estaba constituido por tres grupos, A, C y D. El grupo A se inoculó por vía intranasal con VSM de SRRP, JA-142, pase 200. El grupo C se inoculó por vía intranasal con diluyente estéril para que actuara como grupo de control normal. El grupo D se inoculó por vía intranasal con JA-142 pase 201 10X. Todas las inoculaciones se administraron a aproximadamente 93 días de gestación. Se controlaron las temperaturas corporales de las cerdas durante los primeros siete días después de la inoculación (vacunación). Se recogieron muestras de sangre de las cerdas una vez por semana y en el momento del parto. Antes y después de la inoculación, se determinaron los recuentos de leucocitos totales como en el Ejemplo 2. El estado de salud de cada animal se controló diariamente durante la duración del estudio hasta y después del parto durante 14 días. Se realizaron observaciones clínicas de las cerdas desde -1 DPV hasta el parto. El rendimiento del parto se evaluó por observación del estado de salud de los lechones nacidos. Se realizaron ensayos de ELISA de VSRRP después de las exposiciones de las cerdas al artículo de ensayo. Se realizaron intentos para aislar VSRRP de muestras de suero en células MA-104 después de la exposición al artículo de ensayo. Se realizaron observaciones clínicas de los lechones desde el parto hasta los 14 días de edad. Se recogieron muestras de sangre de los lechones al nacimiento, a los 7 y 14 días de edad. Se realizaron ensayos de ELISA de VSRRP en los sueros de lechones semanalmente después del parto. Los lechones también se pesaron al nacimiento, el día 7 post-parto y en la necropsia. En la necropsia, los pulmones de cada lechón se puntuaron para determinar el porcentaje de implicación pulmonar.

#### *Resultados y Discusión*

No había diferencias significativas entre los grupos a los que se les administró una dosis 10X de VSM, JA-142, pase 201, los grupos a los que se les administró una dosis normal de VSM, JA-142, pase 200, y los grupos a los que se les administró diluyente estéril. Por lo tanto, basándose en la seguridad y la atenuación de VSM, JA-142, pase 200 y en la ausencia de cualquier diferencia significativa en los resultados que comparan estos grupos, se demostró que una dosis 10X de VSM, JA-142, pase 201 era segura, estaba atenuada y era eficaz para inducir anticuerpos contra VSRRP.

### Ejemplo 5

#### *Materiales y Procedimientos*

Este ejemplo demostró que una dosis de vacuna mínima de VSRRP, JA-142, pase 205 que representa VSM+5 es eficaz en un modelo de exposición respiratoria experimental en cerdos de engorde. Se dividieron los cerdos en tres grupos. El grupo 1 se inoculó por vía intramuscular con VSM de SRRP, JA-142 pase 205 a un título de 2,0 log/dosis. El grupo 2 se inoculó por vía intramuscular con diluyente estéril. El grupo 3 actuó como control normal. Los cerdos de los grupos 1 y 2 se expusieron a un aislado de VSRRP con un patrón de RFLP de 144 a día 28 post-vacunación. Se controlaron las temperaturas corporales de los cerdos durante los siete primeros días después de la vacunación y diariamente después de la exposición. Cada animal se pesó en la vacunación, en la exposición, semanalmente durante todo el estudio y en la necropsia. Se recogieron muestras de sangre semanalmente después de la vacunación y cada dos días después de la exposición. Se controló el estado de salud de cada animal diariamente durante la duración del estudio. En la necropsia, se sacrificó cada animal y los pulmones se puntuaron para determinar el porcentaje de

## ES 2 348 159 T3

implicación pulmonar como en el Ejemplo 2. Se realizaron ensayos de ELISA de VSRRP después de las exposiciones de los cerdos a los artículos de ensayo y exposición. Después de la exposición a los artículos de ensayo, se realizaron intentos para aislar VSRRP de muestras de suero en células MA-104. Se analizaron los resultados de aislamiento de virus y ELISA usando un análisis de  $\chi^2$  que ensaya si el porcentaje de animales positivos es el mismo en cada grupo.  
5 Se realizaron recuentos de leucocitos como en el Ejemplo 2.

### Resultados y Discusión

10 A los cerdos del grupo 1 (cerdos vacunados) les fue mejor en todos los aspectos de este ejemplo de lo que les fue a los cerdos del grupo 2 (cerdos a los que se administró diluyente estéril). Las puntuaciones clínicas, temperaturas rectales y porcentaje de implicación pulmonar eran todos superiores para los cerdos a los que se administró diluyente estéril. Los recuentos de leucocitos y el aumento de peso eran inferiores para los cerdos que recibieron el diluyente estéril. También había una reducción significativa de la viremia, que comenzaba el día 4 post-exposición en el grupo al  
15 que se administró vacuna. Los días 10 y 11 post-exposición, el número de animales positivos para viremia disminuyó adicionalmente en el grupo vacunado, pero continuaba siendo el mismo en el grupo que recibió diluyente estéril.

Se usó un ELISA para controlar el estado serológico anti-VSRRP antes de y después de la vacunación y de la exposición. Todos los cerdos eran negativos (proporción S/P <0,4) en el momento de la vacunación. Todos los cerdos, incluyendo los vacunados, eran negativos a 7 DPV (días post-vacunación). Siete días después, 21 de 22 cerdos vacunados dieron positivo en el ensayo para anticuerpo contra VSRRP. Dos cerdos del grupo 1 continuaron siendo negativos durante el periodo pre-exposición y presentaron seroconversión a los 8 días post-exposición (8 DPE). Todos los cerdos del grupo 2 eran negativos a día de ensayo 0 y continuaron siendo negativos durante todo el periodo de pre-exposición. El día de ensayo 39 (8 DPE), 17 de los 22 cerdos expuestos no vacunados (Grupo 2) fueron seropositivos en el ensayo.  
20 Todos los cerdos del grupo 3 (controles normales) continuaron siendo seronegativos durante todo el estudio.

Se realizaron aislamientos de virus a partir de sueros antes y después de la vacunación. De los 22 cerdos vacunados, 17 eran positivos a 2 DPV, 18 eran positivos a 4 DPV y 19 eran positivos a 7 DPV. Después de la vacunación, no se recuperó en absoluto virus de la vacuna de un cerdo, y no hasta 0 DPE de otro. Estos resultados se corresponden con el estado seronegativo de estos cerdos durante el periodo de observación post-vacunación. En el momento de la  
30 exposición, el 55% de los cerdos vacunados eran positivos para viremia. Después de la exposición, este porcentaje aumentó hasta el 82% (a 2 DPE) y disminuyó gradualmente hasta el 9% a 11 DPE. Todos los cerdos del grupo 2 eran negativos a 0 DPE y aumentaban hasta un 82% de positivos a 2 DPE y 91% a 4 DPE. A 6 y 10 DPE, el grupo 2 era aproximadamente el 82% positivo a virus y el 73% de este grupo era positivo a 11 DPE. Los controles normales, el grupo 3, continuaron siendo negativos durante la duración del estudio.

El control de la temperatura rectal mostraba un aumento de grupo global experimentado por el grupo 2. La mitad de los cerdos de este grupo experimentaban un aumento de  $\sim 0,55^{\circ}\text{C}$  ( $1^{\circ}\text{F}$ ) sobre el promedio pre-exposición durante 2 o más días durante el periodo de observación de 11 días. En comparación, sólo cuatro de los 22 cerdos en el grupo vacunado experimentaron temperaturas de  $\sim 0,55^{\circ}\text{C}$  ( $1^{\circ}\text{F}$ ) sobre su promedio pre-exposición. La duración promedio del periodo durante el que esos animales experimentaban temperaturas elevadas durante dos o más días era de 2,2 días para el grupo 1 y de 4 días para el grupo 2. Ninguno de los cerdos del grupo 3 experimentó aumentos de  $\sim 0,55^{\circ}\text{C}$  ( $1^{\circ}\text{F}$ ) sobre su promedio pre-exposición durante dos días o más tiempo.  
40

Se controló el aumento de peso durante el periodo de observación de 11 días. Los cerdos del grupo 3 aumentaron un promedio de 0,48 kg/día (1,06 libras/día), los cerdos del grupo 2 aumentaron un promedio de 0,43 kg/día (0,94 libras/día) y los cerdos del grupo 1 aumentaron un promedio de 0,24 kg/día (0,53 libras/día). Por lo tanto, los cerdos expuestos no vacunados aumentaron sólo aproximadamente el 57% tanto peso como lo hicieron los cerdos expuestos vacunados y sólo el 50% tanto peso como el grupo de control.  
45

Se controló la leucopenia (recuentos de leucocitos) durante el periodo de observación post-exposición. El grupo 3 experimentó una reducción del 5% en el promedio de grupo el día de ensayo 33 (2 DPE) en comparación con el promedio pre-exposición. Para el grupo 2, los recuentos de leucocitos disminuyeron un promedio del 41% y no volvieron a los niveles pre-exposición hasta DPE. El grupo vacunado experimentó una disminución promedio de grupo del 12% el día de ensayo 34 (3 DPE). Los recuentos volvieron al nivel pre-exposición al día siguiente y continuaron igual al nivel pre-exposición durante la duración del periodo de observación.  
50  
55

Se realizaron observaciones clínicas diarias desde el día de ensayo 28 (-4 DPE) al día de ensayo 42 (11 DPE). Todos los cerdos carecían de cualquier signo clínico observable durante el periodo pre-exposición. El grupo 3 permanecía sin ningún signo clínico durante la duración del periodo post-exposición. Se observó que cinco de los cerdos del grupo 2 tenían signos clínicos post-exposición. Estos signos se hicieron evidentes 6 DPE y no se consideró que fueran graves. Los cerdos vacunados tenían 1 sólo signo clínico observado durante el periodo de observación post-exposición de 11 días.  
60

A la finalización del estudio, los pulmones se evaluaron para las lesiones pulmonares observables. El grupo 3 tenía pulmones normales y una puntuación promedio de grupo de 0,02. Las puntuaciones de cerdos individuales para el grupo 2 variaban desde un mínimo de 33 hasta un máximo de 98 para un promedio de grupo de 78,33. Las puntuaciones del grupo vacunado variaban desde 30 hasta un máximo de 90 con un promedio de grupo de 53,20.  
65

## ES 2 348 159 T3

Los datos de este ejemplo demostraron la eficacia de una vacuna viral de SRRP atípico vivo modificado. La vacuna se administró a una dosis mínima de 2,0 log por dosis que contenía el quinto pase más allá del VSM (JA-142, pase 205). La eficacia de la vacuna se demostró reduciendo significativamente el alcance de las lesiones pulmonares, la gravedad de la leucopenia post-exposición y la fiebre post-exposición. Además, se mantuvo una tasa de crecimiento normal en cerdos vacunados/expuestos en comparación con la conseguida por los cerdos de control normales, y significativamente mejor que la conseguida por cerdos expuestos/no vacunados.

### Ejemplo 6

#### *Materiales y Procedimientos*

Este ejemplo comparaba cuatro grupos, los grupos 1, 2 y 3, que tenían veinte cerdos cada uno, y el grupo 4, que tenía 10 cerdos. El grupo 1 se inoculó por vía intramuscular (IM) con VSM de SRRP, JA-142, pase 205, a un título de aproximadamente 2,5 log/dosis. El grupo 2 se inoculó por vía intranasal con VSM de SRRP, JA-142, pase 205, a un título de aproximadamente 5,0 log/dosis. El grupo 3 se inoculó IM con diluyente estéril. El grupo 4 actuaban como controles estrictos. Los cerdos se expusieron a un aislado de VSRRP de la South Dakota State University (SDSU) con un patrón de RFLP de 144 el día 28 post-vacunación. Se controlaron las temperaturas corporales de los cerdos diariamente después de la exposición. Cada animal se pesó en la vacunación, en la exposición, semanalmente durante la duración del estudio y en la necropsia. Se recogieron muestras de sangre semanalmente después de la vacunación y cada dos días después de la exposición. El estado de salud de cada animal se controló diariamente durante la duración del estudio. A la finalización del estudio, los animales se sacrificaron y sus pulmones se puntuaron para determinar el porcentaje de implicación pulmonar.

Se realizaron ensayos de ELISA de VSRRP después de las exposiciones de los cerdos a los artículos de ensayo y exposición. También se realizaron intentos para aislar VSRRP a partir de muestras de suero en células MA-104 después de la exposición a los artículos de ensayo. Se determinaron los recuentos de WBC y las observaciones clínicas post-inoculación como en el Ejemplo 2.

#### *Resultados y Discusión*

A cero días post-vacunación (DPV), todos los cerdos de este ejemplo eran serológicamente negativos para VSRRP, como se indica por que tenían una proporción de S/P <0,4. A 14 DPV, el 70% de los cerdos del grupo 1 y el 95% de los cerdos del grupo 2 dieron positivo en el ensayo para la presencia de anticuerpo anti-VSRRP. Sólo un cerdo vacunado del grupo 1 continuaba siendo seronegativo durante todo el periodo de pre-exposición. Este cerdo se volvió seropositivo a los siete días post-exposición (DPE). Todos los cerdos de los grupos 3 y 4 continuaron siendo negativos durante todo el periodo pre-exposición. A nueve DPE, todos los cerdos del grupo 3, el grupo tratado con diluyente estéril, dieron positivo en el ensayo por ELISA para anticuerpo contra VSRRP. Los controles normales, el grupo 4, continuaron siendo negativos durante la duración del estudio.

Los resultados de aislamiento de virus estaban bien correlacionados con los resultados serológicos. Sólo un cerdo continuaba siendo negativo para el aislamiento de virus a partir de suero y esto correspondía al estado seronegativo durante el periodo post-vacunación. Estos resultados indican una relación entre la viremia post-vacunación y la conversión serológica con la dosificación de vacuna. El grupo 2 era el 100% seropositivo a 14 DPV en comparación con el 70% para el grupo 1. El grupo de alta dosis (grupo 2) era el 85% y el 90% positivo a viremia a 14 y 21 DPV, respectivamente. En comparación, el grupo de baja dosis (grupo 1) era el 55% y el 85% positivo para los mismos días de ensayo.

Después de la exposición, el 89% de los animales del grupo 3 experimentaron temperaturas que eran ~0,55°C (1°F) o más superiores a los valores pre-exposición durante dos o más días. En el grupo 1, el 75% de los animales experimentaron temperaturas de un grado o más superiores durante dos o más días. Mientras que sólo el 45% de los animales del grupo 2 experimentó temperaturas elevadas. En comparación, el 30% de los animales del grupo de control normal (grupo 4) experimentó temperaturas elevadas durante dos o más días durante el periodo de observación de 11 días.

El tratamiento con la alta dosis de vacuna o la baja dosis de vacuna parecía no tener un efecto perjudicial sobre el rendimiento del crecimiento durante el periodo post-vacunación (-3 DPV a 28 DPV). El aumento de peso diario promedio para los grupos 1 y 2 era de 0,35 kg/día (0,77 lb/día) y de 0,34 kg/día (0,76 lb/día), respectivamente. Para una comparación, los grupos 3 y 4 tenían aumentos de peso diarios promedio de 0,35 kg (0,77 lb) y 0,354 kg (0,78 lb), respectivamente. Después de la exposición, los grupos vacunados tenían un aumento de peso diario promedio de 0,02 kg/día (0,05 lb/día) (grupo 1) y 0,07 kg/día (0,15 lb/día) (grupo 2) más que el grupo tratado con diluyente estéril. Los controles normales tenían un promedio de 0,18 a 0,23 kg/día (0,4 a 0,5 lb/día) más de aumento de peso diario que los vacunados durante el mismo periodo de tiempo.

El ochenta y cuatro por ciento (16 de 19) del grupo 3, el grupo de tratamiento con diluyente estéril, experimentó una disminución del 25% o superior en su recuento de WBC durante uno o más días después de la exposición. En los controles normales, 3 de 10 (el 30%) habían experimentado disminuciones similares. Después de la exposición, en

los grupos vacunados, el de baja dosis (grupo 1) y el de alta dosis (grupo 2), 11 de 20 (55%) y 3 de 20 (15%) habían experimentado una leucopenia del 25% durante uno o más días.

Las observaciones clínicas realizadas antes de la exposición indicaban que los cerdos estaban en buen estado de salud. Después de la exposición, el nivel de estado de salud no cambiaba significativamente para aquellos cerdos que se expusieron (grupos 1, 2 y 3). La letargia, los signos respiratorios y la pérdida de apetito eran los signos clínicos observados y estos se describieron como de gravedad leve. Los signos clínicos descritos para un cerdo del grupo 2 podían atribuirse a la neumonía bacteriana (véase la discusión a continuación sobre lesiones pulmonares) que estaba experimentando. El grupo de control normal (grupo 4), no tenía ningún signo clínico observable durante el periodo de observación de 11 días.

A la finalización del estudio, los cerdos se sacrificaron y los pulmones se observaron para lesiones tipo SRRP para puntuar el grado de implicación pulmonar. El porcentaje de implicación se puntuó para cada lóbulo, y después se multiplicó por el porcentaje de pulmón representado por la capacidad pulmonar total. Por ejemplo, un 50% de implicación pulmonar para un lóbulo diafragmático se multiplicaba después por 25% para que equivalga al 12,5% de la capacidad pulmonar total. La puntuación máxima que podía obtenerse era de 100. La puntuación pulmonar promedia de grupo para los controles normales (grupo 4) era de cero. La puntuación promedia de grupo para el grupo de tratamiento con diluyente estéril (grupo 3) era de 70,08. Las puntuaciones promedias de grupos de tratamiento vacunados eran de 48,83 para el grupo de baja dosis (grupo 1) y de 17,76 para el grupo de alta dosis (grupo 2). Se observó que un cerdo tenía una puntuación pulmonar de 62,5, la mayor puntuación dentro del grupo 2. Se describió que las lesiones observadas en los pulmones de este cerdo estaban asociadas con neumonía bacteriana.

A partir de los resultados de este estudio, ambos niveles de dosificación de la vacuna de VSM de SRRP atípico reducían la gravedad de los signos clínicos asociados con la enfermedad respiratoria causada por el VSRRP. Una dosis de campo completa se comportaba mejor que la dosis mínima según se indicó por la reducción significativa de las puntuaciones de lesiones pulmonares.

#### Ejemplo 7

##### *Materiales y Procedimientos*

Este ejemplo determinó la secuencia del VSM, JA-142, del pase 201 atenuado, así como la secuencia del pase 3 del virus del aislado de campo, JA-142. El aislado de virus atenuado se obtuvo de la reserva de semilla maestra que representa el pase 201 en células de simio MA-104 de un aislado de VSRRP de cerdos afectados con SRRP.

El virus se cultivó en células 2621, una línea celular de riñón de mono, también denominada MA-104 y USU-104 (Gravell y col., 181 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112-1-19 (1986), Collins y col., Isolation of Swine Infertility and Respiratory Syndrome Virus (Isolate ATCC VR-2332) in North America and Experimental Reproduction of the Disease in Gnotobiotic Pigs, 4 J. Vet. Diagn. Invest. 117-126 (1992)) (cuyos contenidos se incorporan por la presente por referencia). Las células se cultivaron en 50 ml de medio MEM de Eagle modificado por Dulbecco (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), complementado con suero fetal de ternera al 10% y gentamicina 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% humidificada a 37°C en matraces de cultivo de tejidos de plástico de 75  $\text{cm}^2$ . Las células se mantuvieron por pase a intervalos de 5-7 días. Las células se desprendieron de la superficie con tripsina-verseno y se dividieron 1:4. Para infectar las células, se decantaron los medios y se añadió 1 ml de sobrenadante de células que contenía virus a un título de aproximadamente  $10^5$ - $10^6$  dosis infecciosas en cultivo de tejidos (DICT<sub>50</sub>) durante 30 min. Se añadieron treinta ml de medio recién preparado que contenía suero fetal de ternera al 4%. Las células se incubaron como se ha descrito anteriormente durante 5 días, momento en el que era evidente un efecto citopático en el cultivo. Se centrifugó el medio de cultivo que contenía virus a 2000 rpm en una centrifuga Beckman TJ6 para sedimentar el residuo celular.

Se purificó ARN genómico viral añadiendo 1120  $\mu\text{l}$  de tampón AVL preparado (kit de aislamiento de ARN Viral QIAamp) (QIAGEN, Inc. Valencia, CA)/ARN transportador a una muestra de 280  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo que contenía virus. La mezcla se agitó vorticialmente y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se añadieron 1120  $\mu\text{l}$  de etanol y la mezcla se invirtió varias veces. Se absorbió ARN a la matriz de una columna de centrifugación QIAamp por centrifugación repetida de alícuotas de 630  $\mu\text{l}$  a 6.000 x g durante 1 min. La columna se lavó con 500  $\mu\text{l}$  de tampón AW y se centrifugó para eliminar todo rastro de solución de lavado. El ARN se eluyó de la columna con 60  $\mu\text{l}$  de agua tratada con dietilpirocarbonato a temperatura ambiente. El ARN purificado se almacenó a -70°C o se usó inmediatamente para la síntesis de ADNc.

Para la síntesis de ADNc, se calentó ARN viral a 67°C durante 7 min, se cebó con hexámeros aleatorios o cebadores específicos de VSRRP y se realizó una transcripción inversa con la transcriptasa inversa Superscript II RNasa H- (RT) (Life Technologies, Inc.). Las reacciones contenían  $\text{MgCl}_2$  5 mM, tampón convencional II 1X (Perkin Elmer Corp. Wellesley, MA), 1 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 1 unidad/ $\mu\text{l}$  de inhibidor de RNasa, 2 unidades de RT y 1  $\mu\text{l}$  de ARN en una reacción de 40  $\mu\text{l}$ . Las mezclas de reacción se incubaron durante 15 min a 42°C, durante 5 min a 99°C y durante 5 min a 5°C.

## ES 2 348 159 T3

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a los fragmentos de ADN obtenidos para secuenciación de la forma siguiente: porciones de 10  $\mu$ l de una mezcla de reacción de ADNc se combinaron con los reactivos siguientes, dando como resultado una reacción de 25  $\mu$ l que contenía MgCl<sub>2</sub> 2 mM, tampón convencional II 1X (Perkin Elmer), 0,2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 0,3  $\mu$ M de cebador específico de VSRRP 5' y 3' y 0,375 unidades de Taq polimerasa AmpliTaq (Perkin Elmer). Se prepararon las reacciones por calentamiento durante 4 min a 93°C en un termociclador, después 35 ciclos constituidos por 50-59°C durante 30 s, 72°C durante 30-60 s y 94°C durante 30 s. Los tiempos y temperaturas específicos variaban dependiendo de las temperaturas de hibridación de los cebadores en cada reacción, y de la longitud esperada del producto amplificado. Se realizó una incubación final durante 10 min a 72°C y las reacciones se pusieron a 4°C. Se purificaron los productos de PCR con un kit Microcon 100 (Amicon, Bedford, MA).

Se realizó una PCR de amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE) para obtener la secuencia terminal del extremo 5' del ARN genómico, basándose en el procedimiento de Frohman, MA., On Beyond Classic RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), 4 PCR Methods and Applications S40-S58 (1994) (cuyo contenido se incorpora por la presente por referencia). Se aisló el ARN viral y se convirtió en ADNc como se ha descrito anteriormente, con hexámeros aleatorios como cebadores. Se purificaron los productos de reacción en una columna Microcon 100 (Amicon). Se añadió una cola poli(dA) al extremo 3' por incubación de 10  $\mu$ l de ADNc en un volumen de 20  $\mu$ l que contenía tampón 4 1X (New England Biolabs, Beverly, MA), CoCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dATP 0,5 mM y 2 unidades de transferasa terminal (New England Biolabs), durante 15 min a 37°C. La reacción se interrumpió por calentamiento durante 5 min a 65°C y después se diluyó hasta 200  $\mu$ l con agua.

Se realizó una PCR usando el Sistema de PCR de Moldes de Gran Tamaño Expand<sup>a</sup> (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) en un volumen de reacción de 50  $\mu$ l que contenía 10  $\mu$ l de ADNc con cola poli(dA) diluido, tampón 3 1X, 0,35 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, MgCl<sub>2</sub> 0,625 mM, cebador Q<sub>0</sub> 0,04  $\mu$ M (Frohman, 1994), cebador Q<sub>6</sub> 0,3  $\mu$ M (Frohman, 1994), 5'-CGCCCTAATTGAATAGGTGAC-3' 0,3  $\mu$ M y 0,75  $\mu$ l de mezcla enzimática. Las reacciones se calentaron a 93°C durante 2 min en un termociclador y se sometieron a 25 ciclos, estando cada ciclo constituido por 93°C durante 10 s, 63°C durante 30 s y 68°C durante 12 min. Después de 25 ciclos, la reacción se incubó a 68°C durante 7 min y se mantuvo a 4°C. Se diluyó una alícuota de la reacción 100 veces y se añadieron 5  $\mu$ l de producto diluido a una segunda reacción de PCR que contenía, en 50  $\mu$ l, tampón 1 1X, 0,35 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, cebador Q<sub>i</sub> 0,3  $\mu$ M (Frohman, 1994), 5'-CCTTCGGCAGGCGGGAGTAGTGTTC GAGGTGCTCAGC-3' 0,63  $\mu$ M y 0,75  $\mu$ l de mezcla enzimática. Las reacciones se calentaron a 93°C durante 2 min en un termociclador y se sometieron a 25 ciclos, estando cada ciclo constituido por 93°C durante 10 s, 63°C durante 30 s y 68°C durante 4 min. Después de 25 ciclos, la reacción se incubó a 68°C durante 7 min y se mantuvo a 4°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y la banda de aproximadamente 1500 pb se purificó usando el kit de purificación en gel QIAgen QXII. El ADN eluido se clonó en el vector pGEM-T (Promega, Madison, WI) usando procedimientos convencionales. Se aislaron clones individuales y se cultivaron para el aislamiento del ADN plasmídico usando kits de aislamiento de plásmidos de QIAgen.

Se combinaron productos de PCR y ADN plasmídico con cebadores apropiados basados en secuencias de VSRRP relacionadas en Genbank o derivados de secuencias conocidas, y se sometieron a reacciones de secuenciación automáticas con kits de secuenciación cíclica con terminadores Taq DyeDeoxy (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un Termociclador PR 2400 (Perkin Elmer) en el University of Minnesota Advanced Genetic Analysis Center. Las reacciones se sometieron a electroforesis en un secuenciador de ADN Applied Biosystems 3700. La lectura automática de nucleótidos y la corrección de errores de secuencias se realizaron principalmente con el programa Phred (University of Washington Genome Center) y el ensamblaje de fragmentos se realizó principalmente con el programa Phrap (University of Washington Genome Center). Se usó un programa informático adicional que incluía el paquete Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI), el paquete Wisconsin versión 9.1 (Genetics Computer Group, Madison, WI) y EuGene (Molecular Biology Information Resource, Houston, TX) para analizar la secuencia. La secuencia genómica viral final se ensambló a partir de aproximadamente 100 reacciones de PCR y 428 reacciones de secuenciación de ADN.

### Resultados

Los resultados del Ejemplo 7 se proporcionan como SEC ID N°: 1 y 2 en las que la SEC ID N°: 1 representa la secuencia del pase 201 del Virus de Semilla Maestra, JA 142, y la SEC ID N°: 2 representa la secuencia del virus virulento aislado de campo, JA 142, después de tres pases.

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento de pases múltiples para atenuar un virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (SRRP) capaz de inducir un efecto citopático, que incluye las etapas de replicar sucesivamente dicho virus por inoculación y replicación del virus en cultivos celulares individuales hasta que se consiga su atenuación,

**caracterizado** porque cada etapa sucesiva de inoculación y replicación comprende

- 10 (1) retirar una muestra que contiene virus del cultivo celular mientras que el virus se está replicando a una velocidad logarítmica y antes de la inducción de efectos citopáticos en el cultivo celular,
- 15 (2) inocular el cultivo celular siguiente con una alícuota de dicha muestra, de modo que se usa la alícuota más pequeña que mantiene la infección y la replicación logarítmica, y de modo que sólo se transfieren pequeñas cantidades de virus de un pase a otro,
- (3) conservar cada cultivo celular del que se ha retirado una muestra (de acuerdo con la etapa 1)) después de la etapa de retirada, y
- 20 (4) observar si se produce inducción de un efecto citopático en cada uno de dichos cultivos celulares conservados.

25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, produciéndose dicha etapa de retirada aproximadamente 24 horas después de la inoculación de dichos cultivos celulares.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo dicho cultivo celular una monocapa de células que tienen una confluencia superior a aproximadamente el 70%.

30 4. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de ensayar periódicamente dicho virus progenie para determinar su atenuación.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, que incluye además la etapa de proporcionar un exceso de células inicialmente no infectadas para asegurar que dicho virus pueda replicarse a una velocidad logarítmica.

35 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que cada una de las inoculaciones sucesivas que implican el pase antes de que se observe un efecto citopático se lleva a cabo después de que se observe el efecto citopático en un cultivo celular previamente inoculado, siendo dicho cultivo celular previamente inoculado un cultivo parental de las células de las que se retira una alícuota para su pase.

40

45

50

55

60

65

# ES 2 348 159 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> MENGELING, WILLIAMS L.  
VORWALD, ANN  
5 LAGER, KELLY  
ROOF, MIKE  
BURKHART, KELLY GORCYCA, DAVID E

<120> VACUNA CONTRA EL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO BASADA EN EL  
10 AISLADO JA-142

<130> 27093a

15 <140>  
<141>

<150> 09/298.110  
20 <151> 22-04-1999

<160> 2

25 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 15424  
30 <212> ADN  
<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

35 <400> 1

tgcgccgggc aggtggtggc tctatgcctt ggcatttgta ttgtcaggag ctgcgacccat 60  
tggcacagcc caaaactagc tgcacagaaa acgcccctct gtgacagccc tcttcagggg 120  
40 agcttagggg tctgtcccta gcacctgtct tccggagttg cactgcttta cgggtctctcc 180  
aaccctttaa ccatgtctgg gatacttgat cgggtgcacgt gcacccccaa tgccaggggtg 240  
tttatggcgg agggccaagt ctactgcaca cgatgtctca gtgcaagggtc tctccttctc 300  
ctgaatctcc aagttcctga gcttggagtg ctgggcctat ttacagggcc cgaagagcca 360  
ctccggtgga cgttgccacg tgcattcccc actggtgagt gctccccgc cggggcctgc 420  
45 tggtcttctg cgatcttctc aattgcacga atgaccagtg gaaacctgaa ctttcaacaa 480  
agaatgggtg gggtcgcagc tgagatttác agagccggcc agctcaccctc tgcagtcttg 540  
aaggctctac aagtttatga acgggggttg cgtggtgacc ctatagtcgg acctgtccct 600  
ggagtggccg attttgccaa ctccctacat gtgagtgata aacctttccc gggagcaact 660  
50 catgtgctaa ccaacctgcc actcccagag aggcctaage ctgaagactt ttgcccttct 720  
gagtgtgcta tggctgacgt ctatgatatt ggccatggcg ccgtcatgta tgtggccaaa 780  
gggaaagtct cctgggcccc tcgtggcggg gatgaggcga aatttgaacc tgtccctagg 840  
gagttgaagt tgatcgcgaa ccaactccac atctccttcc cgccccacca cgcagtggac 900  
atgtctaagt ttgtgttcat agccccctggg agtgggtgtct ctatgcccgg ctgagtgccca 960  
55 cacggctgtc tccccgctaa tactgtccct gaaggtaact gctgggtggcg cttgtttgac 1020  
tcgtccccac tggacgttca gaacaaagaa attegcctgt ccaaccaatt cggctatcaa 1080  
accaagcatg gtgtcgtctg caagtaccta caacggaggc tgcaagctaa tggctctccga 1140  
gcagtgactg atacagatgg acccattgtc gtacagtatt tctctgttag ggagagctgg 1200  
60 atccgccact tcagactggc ggaagagcct agcctccttg ggtttgaaga cctcctcaga 1260  
ataagggtag agcccaatac gtgcgccatt agtgacaagg gtggaaaaat cttccggttt 1320  
ggcagtcaca aatggtagcg tgcctggaaag agagcaagga aagcacgctc tggtatgacc 1380  
accacagtcg ctccaccgct ctgtcccctc cgtgaaatcc agcaagccaa aaagcacgag 1440

65

# ES 2 348 159 T3

```

gatgccggcg ctgataagggc tgtgcatctc aggcactatt ctccgcctgc cgacgggaac 1500
tgtgggtggc actgcatttc cggcatcgcc aaccgaatgg tgaattccaa atttgaaact 1560
actcttcccc agaggggtgag accttcagat gactgggcta ctgacgagga ccttgtgaa 1620
5 accatccaaa ttctcaagct ccttgcggcc ttggacagga acggtgcttg tgttggcgcc 1680
aaatacgtgc ttaagctgga agggagagcat tggactgtct ctgtgaccct tgggatgtcc 1740
ccttctttgc tcccccttga atgtgttcag ggtgtttgtg agcataagag cggacttgg 1800
ccccagatg cggtcgaagt tttcggattt gaccctgect gccttgaccg actggctgag 1860
10 gtaatgcact tgcttagcag tgtcatccca gctgctctgg ccgaaatgtc cggcgacccc 1920
aaccgtcccg ctccccggg cactactgtg tggactgttt cacaattctt tgcccgcac 1980
agaggaggag agcaccctga tcaggtgcgc ttaggaaaaa tcatcagcct ttgtcaagt 2040
gttgaggaat gctgttgcca tcagaataaa accaaccggg ccaccccgga agaggttgcg 2100
15 gcaaggattg atcagtacct ccatggtgca acaagtcttg aagaatgctt gattaggctt 2160
gagagggttt gcccgcgag cgctgcggac accttctttg attggaatgt tgtgctccc 2220
gggggtgggg cttcaactca gacaacccaa cagctccatg tcaaccagtg ccgcgctctg 2280
gttctgtcgt gactcaaga gcttttggac aaagaccag tccctctgac cgccttctcg 2340
ctgtccaatt ctactatcc tgcacaaggt gacgaggtc gtcaccgtga gaggctaaac 2400
20 tccgtactct ctaagctgga gggggttgtt cgtgaggaat atgggctcac gccaaaggga 2460
cctggccccg gaccgcact accgaacggg ctctcgaaac ttaaagacca gatggaggag 2520
gatctgctaa aactagtcaa cgcccaggca acttcagaaa tgatggcctg ggcagccgag 2580
caggttgatc tgaagcttg ggtcaaaaac taccacggt ggacaccgtc accccctcca 2640
ccaagagttc agcctcgaaa aacaaagcct gtcaagagct tgccaggga caaacctgtc 2700
25 cccgctccac gcaggaaggt cagatctgat tgtggcagcc cgatttcgat gggcgacaat 2760
gttctgtacg gtccggaaga tttgactgtt ggtggcccc ttgatctttc gacaccatcc 2820
gagccgatga cacctctgag tgagcctgca cctatgcccg cgttgcaata tatttctagg 2880
ccagtgcac ctttgagtgt gctggcccca gtacctgcac cgcgtagaac tgtgtcccga 2940
30 ccggtgacgc ccttgagtga gccaattttt gtgtctgcac cgcgacacaa atttcagcag 3000
gtggaagaag cgaatctggc ggcaacaatg ctgacgcacc aggacgaacc tctagatttg 3060
tctgcatcct cacagactga atatgaggct tctcccctaa caccactgca gaacatgggt 3120
attctggagg tgggggggca agaagctgag gaagtctga gtgaaaactc ggatacactg 3180
aatgacatca accctgcacc tgtgtcatca agcagctccc tgtcaagtgt taagatcaca 3240
35 cgcccaaac actctgctca agccatcatt gactcggcg ggcctgcag tggcatctc 3300
cgaaaaggaa aagaagcatg cctcagcatc atgctgagg ctgtgtatga ggctaagctt 3360
agtgacctg ccacgcagga atggctttct cgcgtgagg atagggttga tatgctgact 3420
40 tggcgcaaca cgtctgctta ccaggcgttc cgcacttag atggtaggtt tgagtcttc 3480
ccaaagatga tactcgagac accgcccgcc taccctgtg ggttttgtat gctgectcgc 3540
acgectgcac cttccgtggg tgcagagagt gacctacca ttggttcagt cgcactgaa 3600
gatgttccac gcatcctcgg gaaaatagaa aacgcccgca agatgcccac ccaggggctc 3660
ttgacatcct tcggggaaga accgggtgtg gaccaacctg tcaaggactc ctggatgtcg 3720
45 tcgcyggggg ttgacgagag cacaacggct cegtccgctg gtacaggtgg tgctgactta 3780
cccaccgatt tgccaccttc agatggtttg gatgcggacg agtggggggc gttacggacg 3840
gtaagaaaga aagctgaaag gctcttcgac caattgagcc gtcaggtttt taacctcgtc 3900
tccatctcc ctgttttctt ctcacacctc ttcaaactcg acagtggtta ttctccgggt 3960
gattgggggt ttgcagcttt tactttatth tgccctcttt tgtgttacag ctaccattc 4020
50 tttggttttg tccccctctt ggggtgtttt tctgggtctt ctggcgctgt gcgcatgggg 4080
gtttttggct gttggttggc ttttgcctgt ggctgttca agcctgtgtc cgaccagtc 4140
ggcactgctt gtgagtttga ctgcagag ctcttcattc ttttgagctt 4200
ctcaaacctt gggaccctgt tcgcagcctt gttgtgggcc ccgtcggctt cggccttggc 4260
55 attcttggca ggttactggg cggggcagc tacatctggc attttttgc taggcttggc 4320
attgttcgag attgtatctt ggctggagct tatgtgcttt ctcaaggtag gtgtaaaaag 4380
tgctggggat cttgtgtaag aactgctcct aatgaaatcg ccttcaacgt gttcccttt 4440
acgctgtcga ccaggtcgtc actcatcgac ctgtgcgac ggttttgtgc gccaaaaggc 4500
atggaccca ttttctctgc tactgggtgg cgcgggtgct ggaacggccg aagtccatt 4560
60 gagcaaccct ctgaaaaacc catcgcgttc gccagttgg atgaaaagag gatcacggct 4620
agaactgtgg tcgctcagcc ttatgatcct aaccaagccg taaagtgctt gcggtgttta 4680
caggcgggtg gggcgatagt ggccgaggca gtcccaaaag tggtaagggt ttccgctatt 4740

```

ES 2 348 159 T3

ccattccgag ctcccttttt tcccaccgga gtgaagggtg atcctgagtg caggatcgtg 4800  
 gtcgaccccg acactttttac tacagctctc cgggtctggtt actccaccac aaacctcgtc 4860  
 cttgggtgtag gggacttttg ccaactgaat ggattaaaaa tcaggcaaat ttccaagccc 4920  
 5 tcgggaggag gcccgcacct cattgctgcc ctgcatgttg cttgctcgat ggcggtgcac 4980  
 atgcttgctg gagtttatgt aactgcagtg gggctctgcg gtaccggcac caacgatccg 5040  
 tggtgcaacta acccattcgc cgtccctggc tacggacctg gctccctctg cacgtccaga 5100  
 ttgtgcaact cccaacatgg cettaccctg ceettgacag cacttggtggc aggattcggg 5160  
 10 ttccaggaaa ttgccctagt cgttttgatt ttogtttcca tcggaggcat ggctcatagg 5220  
 ttgagttgta aggctgatat gctgtgcgct ttaacttgcaa tcgccagcta tgtttgggta 5280  
 cccttacctt ggttgctctg tgtgtttcct tgcctgggtg cgtggttctc tttgcacctt 5340  
 ctcaccattc tatggttggg gtttttcttg atgtctgraa atatgccttc gggaaatctt 5400  
 accggtggtg tattggttgc tctttggctt ctaggccggt atactaatgt tgttggctt 5460  
 15 gttacccctt atgatattca ccattacacc aatggcccc gcggtggtgc cgccttggct 5520  
 accgcaccag atgggactta cttggccgct gtccgcgcgc ctgcgttgac tggccgcacc 5580  
 gtgctgttta ccccgctcca gcttgggtcc cttcttgagg gcgctttcag aactcgaaag 5640  
 cctcactga acaccgtcaa tgtgtcggg tectccatgg gctctggcgg agtgttcact 5700  
 atcgatggga aattaagtg cgtgactgcc gcacatgtcc ttacgggtaa ttcagccagg 5760  
 20 gtttccgggg tcggctttaa tcaaatgctt gactttgatg taaaagggga cttcgccata 5820  
 gctgactgcc cgaattggca agggctgct cctaagacct aattctgcga ggatggatgg 5880  
 actggccgcg cctattggct gacatcctct ggcgtcgaac ccggtgtcat tgggaatgga 5940  
 ttgccttctt gcttcaccgc gtgcggcgat tccgggtccc cagtgatcac cgaagccggg 6000  
 25 gagcttctg gcgttcacac aggatcaaac aaacaaggag gaggcattgt tacgcgcccc 6060  
 tctggccagt ttgcaatgt ggcacccatc aagctgagcg aattaagtga gttctttgct 6120  
 ggacctaaagg tcccgcctcg tgatgtgaag ttggcagcc acataattaa agacatatgc 6180  
 gaggtacctt cagatctttg cgccttgctt gctgccaaac ccgaactgga aggaggcctc 6240  
 tccaccgtcc aacttctgtg tgtgtttttc ctctgtgga gaatgatggg acatgcctgg 6300  
 30 acgccccttg ttgctgttgg gttttttatc ttgaatgagg ttctcccagc tgtactggtc 6360  
 cggagtggtt tctcctttgg aatgtttgtg ctatcttggc tcacaccatg gtctgcgcaa 6420  
 gttctgatga tcaggcttct aacagcagct cttaacagga acagattgtc actcgccttt 6480  
 tacagccttg gtgcagcgac cggttttgtc gcagatctgg cggcaactca agggcaccoc 6540  
 35 ttgcaggcag taatgaattt aagtacctat gecttctctc ctccggataat ggtcgtgacc 6600  
 tcaccagtec cagtgattgc gtgtgggtgt gtgcacctcc ttgccataat tttgtacttg 6660  
 ttaagtacc gctgcctgca caatgtcctt gttggcgatg gtgcgttctc tgcggcttct 6720  
 ttcttgcat actttgccga tggcctcctg atgagactta atgacgagga ttggatttt 6780  
 40 aatcatgagt cgctgactgg tggcctcctg atgagactta atgacgagga ttggatttt 6840  
 cttacgaaat ggactgatlt taagtgtttt tttctgcat ccaacatgag gaatgcggcg 6900  
 ggccagttca tcgaggctgc ctatgctaaa gcacttagaa ttgaacttgc ccagtgggtg 6960  
 caggttgata aggttcgagg tactttggcc aaacttgaag cttttgctga taccgtygca 7020  
 ccccaactct cgcgcgggta catgtttgtt gctcttggcc atacgcctgt tggcggtatc 7080  
 45 ttogaccta aaatgacctt ggcgcgtgtc gttgatccaa cccccacacc cccaccocga 7200  
 gccgggtcca tcccccttcc accgaaagtt ctggagaatg gtcccaacgc ctggggggat 7260  
 gaggatcggt tgaataagaa gaagaggcgc aagatggaag ccgtcggcat ctttgttatg 7320  
 ggtggaagaa aatatcagaa attttgggac aagaactccg gtgatgtgtt ttatgaggag 7380  
 50 gtccatgata acacagacgc gtgggagtgc ctgagagttg acaaccctgc cgactttgac 7440  
 cctgagaagg gaactctgtg cgggcatact accattgaag ataagactta cagtgtctac 7500  
 gcctcccat ctggcaagaa atccttggct cccgctacc cagagagcaa aaaaaaccaa 7560  
 tgggaagctg cgaagctttc cgtggaacag gcccttgca tgatgaatgt cgacggtgaa 7620  
 ctgacagcca aagaagtgga gaaactgaaa agaataattg acaactcca gggcctgact 7680  
 55 aaggagcagt gtttaaactg ctagccgcca gggcttgac ccgctgtggt cgcggcggct 7740  
 tggttattac tgagacagcg gtaaaaatag tcaaatcca caaccggacc ttcaccctag 7800  
 gacctgtgaa tttaaaagtg gccagtgagg ttgagctaaa agacgcggtc gagcataacc 7860  
 aacaccocgg tcaagaccg gttgatgggt gtgtgtgct cctgcgctcc gcagttcctt 7920  
 60 cgcttataga cgtcttaatc tccggcgtg atgcatctcc caagttact gcccgccacg 7980  
 ggcgggaaa cactgggatc gatggcacgc tttgggattt tgaggccgag gccactaaag 8040

65

ES 2 348 159 T3

5 aggaaattgc actcagtgcg caaataatac aggcttgtga cattagggcg ggcgacgcac 8100  
 ctgaaattgg tcttccttat aagctgtacc ctgtcagggg caaccctgag cgggtaaaaag 8160  
 gagttttaca gaatacaagg tttggagata taccttataa aacccccagt gacactggaa 8220  
 gcccagtgca cgcggctgcc tgcctcacgc ccaatgccac tccggtgact gatgggcgct 8280  
 cegtcttggc cacgactatg cectcogggt ttgagttgta tgtaccgacc attccagcgt 8340  
 ctgtccttga ttatcttgat tctaggcctg actgccccaa acagttgaca gagcacggct 8400  
 gtgaggacgc cgcattaaga gacctetcca agtatgactt gtccacccaa ggctttgttt 8460  
 10 tacctggagt tcttcgcctt gtgcgtaagt acctgtttgc tcatgtgggt aagtgcccg 8520  
 cegtccatcg gccttccact taccctgcc aagaattctat ggctggaata aatgggaaca 8580  
 ggtttccaa caaggacatc cagagcgtcc ctgaaatcga cgttctgtgc gcacaggccg 8640  
 ttcgggaaaa ctggcaaac gttaaccctt gtaccctcaa gaaacagtat tgtgggaaga 8700  
 agaagactag gacaatactc ggccaataa acttcattgc gctggctcac cgggcagcgt 8760  
 15 tgagtgggtg caccagggc tcatgaaaa aggcgtttaa ctcgccatt gccctcggta 8820  
 aaaacaaatt taaagagctt cagactccgg tcttaggcag gtgccttgaa gctgatcttg 8880  
 catcctgcga tcgctccaca cctgcaattg tccgctgggt tgccgccaat cttctttatg 8940  
 aacttgctg tgctgaagag caccagccgt cgtacgtgtt gaactgctgc cacgacctac 9000  
 20 tggtcacgca gtccggcgca gtaactaaga gaggtggcct gtcgtctggc gaccgatca 9060  
 cttctgtgtc caacaccatt tacagcttgg tgatatatgc acaacacatg gtgctcagtt 9120  
 actttaaaag tggtcaccct catggccttc tgtttctaca agaccagctg aagtttgagg 9180  
 acatgctcaa ggttcaaccc ctgatcgtct attcggacga cctcgtactg tatgccgagt 9240  
 ctcccacat gccaaaactac cactgggtggg ttgaacatct gaacctgatg ctgggttttc 9300  
 25 agacggacc aaagaagaca gccataacag actcgcctc atttctaggc tgtaggataa 9360  
 taaatggacg ccagctcgtc cctaaccgtg acaggattct cgcggccctc gcctaccata 9420  
 tgaaggcaag caatgtctct gaatactacg cctcggcggc tgcgatactc atggacagct 9480  
 gtgcttgttt agagtatgat cccgaatggg ttgaagagct tgtagtggg atagcgcagt 9540  
 30 gtgcccgcaa ggacggctac agttttccog gcccgccgtt cttcttgtcc atgtgggaaa 9600  
 aactcagatc caatcatgag gggaagaagt ccagatgtg cgggtactgc ggggccccgg 9660  
 ctccgtagc cactgcctgt ggctcgcagc tctgtattta ccacaccac ttccaccagc 9720  
 attgtccagt catcatctgg tgtggccacc cggctggttc tggttcttgt agtgagtga 9780  
 aacccccct agggaaaggc acaagccctc tagatgaggt gttagaacaa gtcccgtata 9840  
 35 agcctecacg gactgtaatc atgcatgtgg agcagggctc caccctctt gaccaggca 9900  
 gataccagac tcgcccggga ttagtctccg ttaggcgtgg cattagagga aatgaggttg 9960  
 atctaccaga cggtgattat gctagcaccg cctactccc tacttgtaaa gagattaaca 10020  
 tggctcgtgt cgcctctaat gtgttgcgca gcaggttcat catcggccc cctgggtgctg 10080  
 40 ggaaaacata ctggctcctt caacaggtcc aggatggtga tgccatttac acgccaaactc 10140  
 accagaccat gctcgatag attagggctt tggggacgtg ccggttcaac gtcccagcag 10200  
 gtacgacgt gcaattccct gccccctccc gtaccggccc ttgggttcgc atcctagccg 10260  
 gcggttggty tccctggcaag aattccttcc tggatgaagc agcgtattgt aatcaccttg 10320  
 atgtcttgag gcttcttagc aaaactaccc tcacctgtct gggagatttc aaacaactcc 10380  
 45 acccagtggg ttttgattct cattgctatg tttttgacat catgcctcag actcaactga 10440  
 agaccatctg gagatttggga cagaatctct gtgaggccat tcagccagat tacagggaca 10500  
 aactgtatc catggtcaac acaaccctg taacctcgt ggaaaaacct gtcaagtatg 10560  
 ggcaagtcc cacccttac cacagggacc gagaggacgg cgcctcaca attgactcca 10620  
 50 gtcaaggcgc cacatttgat gtggttacac tgcatttgc cactaaagat tcaactcaaca 10680  
 ggcaagagc cctgttgcct attaccaggg caagacatgc tgtctttgtg tatgaccac 10740  
 acaggcaact gcagagcatg tttgatcttc ctgcgaaagg cacaccctc aacctcgtg 10800  
 tgcaccgtga cgagcagctg atcgtgctag atagaaataa caaagaatgc acggttgctc 10860  
 aggcctagga caatggggat aaattcagg ccacagacaa gcgcgttgta gattctctcc 10920  
 55 ggcaccattg tgcagatctg gaagggtcga gctccccgt cccaaggct gcacacaact 10980  
 tgggatttta tttctcgcct gatttgacac agtttgctaa actcccggta gaacttgca 11040  
 cccactggcc cgtgggtgaca acccagaaca atgaaaagt gccagaccg ttgggtgcta 11100  
 gccttcgccc cgtccataag tatagcccg cgtgcacatg tgccggctac atgggtggcc 11160  
 cctcagtggt tctgggcacc cctggggttg tgcatacta tctcacaaaa ttgtcaggg 11220  
 60 gcgaggctca aatgcttccg gagacagtct tcagcaccgg ccgaattgag gtagattgcc 11280  
 gtgagtatct cgatgaccgg gagcgagaaa ttgctgagtc cctccccat gctttcattg 11340

ES 2 348 159 T3

gcgacgtcaa aggcactacc gttggaggat gtcaccatgt cacctccaaa taccttccgc 11400  
 gcttccctcc caaggaatca gtcgcggtag tccggggttc aagccccggg aaagccgcaa 11460  
 aagcagtttg cacattaaca gatgtgtatc tcccagatct cgaagettac ctccacccag 11520  
 5 agaccagtc caagtgtcgg aaaatgatgt tggacttcaa ggaagttcga ctgatggtct 11580  
 ggaaggacaa gacggcctat tttcaacttg aaggccgcca tttcacctgg taccagettg 11640  
 caagetatgc ctcgtacatc cgagttcctg ttaactctac ggtgtatttg gacccctgca 11700  
 tgggcccctgc cctttgcaac agaagagttg tccgggtccac tcattgggga gctgacctcg 11760  
 10 cagtcacccc ttatgattac ggtgccaaaa tcatcctgtc tagtgcatac catggtgaaa 11820  
 tgccccctgg gtacaaaatc ctggcgtgcg cggagttctc gottgacgat ccagtgaggt 11880  
 acaaacacac ctggggggttt gaatcggata cagcgtatct gtacgagttc accggaaacg 11940  
 gtgaggactg ggaggattac aatgatgcgt ttctgctcgc ccagaaaggg aaaatttata 12000  
 aggccactgc caccagcatg aggtttcatt ttccccggg cctgtcatt gaaccaactt 12060  
 15 taggcctgaa ttgaaatgaa atgggggtcca tgcaaagcct ctttgacaaa attggccaac 12120  
 tttctgtgga tgctttcacg gaatttttgg tgtccattgt tgatatac acatatttgg 12180  
 ccattctgtt tggctttacc atcgcctggc ggctgggtgg cttctgcac cgattgggtt 12240  
 gctccggcgt actccgtgcg cgcctacca ttcacctga gcaattacag aagatcctat 12300  
 20 gaggcctttc tttctcagtg ccagggtggat attcccacct ggggaactag acatcccctg 12360  
 gggatgcttt ggcaccataa ggtgtcaacc ctgattgatg aaatgggtgc gcgtcggatg 12420  
 taccgcacca tggaaaaagc aggacaggct gcctggaaac aggtgggtgag cgaggccacg 12480  
 ctgtctcgca ttagtgggtt ggatgtggtg gctcatttcc agcatcttgc cgccattgaa 12540  
 gccgagacct gtaaatattt ggctctcctg ctgcccattg tacacaatct gcgcatgaca 12600  
 25 gggtc aaatg taaccatagt gtataatagt actttgaatc aggtggttgc tatttttcca 12660  
 acccctggat cccggccaaa gcttcatgat tttcagcaat ggctaatagc tgtgcactcc 12720  
 tccatatttt cctccgttgc ggcttctgt actcttttgg ttgtgctgtg gttgctgatt 12780  
 ccaatgctac gtactgtttt tggtttccgc tggttagggg caatttttcc ttcgaactca 12840  
 30 cggtgaaata cacggtgtgt ccgccttggc tcacccggca agcagccgct gaggtctacg 12900  
 aaccaggcag gtctctttgg tgcaggatag ggcagaccg atgtagttag gaagaccatg 12960  
 acgatctagg gttcatgggt ccgtctggcc tctccagcga aggccacttg accagtgttt 13020  
 acgcctgggt ggegttctct tccttcaget acacggccca gttccatccc gagatatttg 13080  
 35 ggatagggaa tgtgagtcaa gtttatgttg acatcaagca ccaattcacc tgcgccttcc 13140  
 acgacgggga gaacgccacc ttgcctcctg atgacaatat ttcagccgta taccagctt 13200  
 actaccaaca tcaagtcgac ggccggcaat ggtttcactc agaatggctg cgcctctct 13260  
 tttcctcttg gttggtttca aatgtttctt ggtttctcag gcgttcgcct gcaagccatg 13320  
 tttcagttca agtctttcgg acatcaaac caacacaacc gcagcatcag gctttgttgt 13380  
 40 cctccaggac atcagctgcc ttaggcatgg cgactcgtcc tctcagacga ttcgaaaaag 13440  
 ctctcagtg cgcgcggcga tagggagcgc cgtgtacatc actgtcacag ccaatgtcac 13500  
 agatgagaat tatttacatt cttctgatct ccttatgctt tcttcttggc tttctatg 13560  
 ttctgagatg agtga aaagg gattcaaggat gatgtttggc aatgtgtcag gcatcgtggc 13620  
 45 tgtgtgtgtc aactttacca gctacgtcca acatgtcaag gagtttacc aacgctcctt 13680  
 ggtggctgat catgtgcggc tgcctcattt catgacacct gagaccatga ggtgggcaac 13740  
 cgttttagcc tgttttcttg ccatcttact ggcaatttga atgttcaagt atgttgggga 13800  
 gatgcttgac cgcgggctgt tgcctcogcat tgccttcttt gtggtgtatc gtgccatttt 13860  
 gttttgctgc gctcgtcaac gccaacagca acagcagctc tcatcttcag ttaatttaca 13920  
 50 acttgacgct atgtgagctg aatggcacag attggctgaa agacaaattt gattgggcat 13980  
 tggagacttt tgtcatcttt cccgtgttga ctacattgt ctcatatagt gcactacca 14040  
 ctagccattt ccttgacaca gtcggctctg ttactgtgtc tactgcccgg tctaccacg 14100  
 ggcggtatgt tctgagtagc atctacgcgg tctgcgctct ggcgctactc ttgtaccaga tatactaact 14160  
 55 tcattagget tgcaagaac tgcattgctt ggcgctactc ttgtaccaga tatactaact 14220  
 tcttctgga cactaagggc agactctatc gctggcggtc gcccgttatc atagagaaag 14280  
 ggggtaagggt tgaggctgaa ggtcacctga tccacctcaa aagagttgtg cttgatgggt 14340  
 ccgtggcaac cctttaaacc agagtttcag cgaacaatg gggctcgtct tagacgactt 14400  
 ttgctatgat agcaccgctc cacaaaagg gcttttggcg ttttccatta cctacacgcc 14460  
 60 agtgatgata tatgctctaa aggtaagtcg gccccgactt ttagggcttc tgcacctttt 14520  
 gatctttctg aattgtactt ttacctcgg gtacatgaca tgcgtgcact ttaatagcac 14580  
 aaataaggct gcgctcacta tgggagcagt agttgcactt ctttgggggg tgtactcagc 14640

65

## ES 2 348 159 T3

```

catagaaacc tggaaagttca tcacctccag atgtcgtttg tgcttgctag gccgcaagta 14700
cattctggcc cccgcccacc acgtcgaaag tgccgcgggc tttcatccga tcgcggcaaa 14760
tgataaccac gcatttgtcg tccggcgctcc cggctccact acggttaacg gcacattggt 14820
5 gcccgggttg aaaagcctcg tgttgggtgg cagaaaagct gttaaacagg gagtggtaaa 14880
ccttgtcaaa tatgccaat aacaacggca agcagcaaaa gaaaaagagg gggaatggcc 14940
agccagtcaa tcagctgtgc cagatgctgg gtaagatcat cgcccagcaa aaccagtcca 15000
gaggcaaggg accggggaag aaaattaaga ataaaaacc ggagaagccc cattttcctc 15060
10 tagcgactga agatgacgtc aggcatact tcaccctag tgagcggcaa ttgtgtctgt 15120
cgtcgatcca gactgccttt aaccagggcg ctggaacctg taccctatca gattcaggta 15180
ggataagtta cactgtggag tttagtttg cgacgcata tactgtgctc ctgatccgcg 15240
tcacagcgcc atcatcagcg taatgggctg gcattcctta agcacctcag tgttagaatt 15300
15 ggaagaatgt gtggtgaatg gcactgattg gcactgtgcc tctaagtac ctattcaatt 15360
agggcgaccg tgtgggggtt aagttaatt ggcgagaacc atgcggccga aattaaanaa 15420
aaaa 15424

```

```

20 <210> 2
<211> 15424
<212> ADN
<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
25
<400> 2

```

```

tcgcccgggc aggtgttggc tctatgcctt ggcatttgta ttgtcaggag ctgcgacat 60
30 tggtagagcc caaaactagc tgacacagaaa acgccccttct gtgacagccc tcttcagggg 120
agcttagggg tctgtcccta gcaccttgct tccggagttg cactgcttta cgggtctctcc 180
aaccctttaa ccatgtctgg gatacttgat cgggtgcacgt gcaccccaaa tgccaggggtg 240
35 tttatggcgg agggccaagt ctactgcaca cgatgtctca gtgcacggtc tctccttctc 300
ctgaatctcc aagtccctga gcttggagtg ctgggcctat ttacagggcc cgaagagcca 360
ctccggtgga cgttgccacg tgcatcccc actgttgagt gctccccgc cggggcctgc 420
tggtttctg cgatcttcc aattgcacga atgaccagtg gaaacctgaa ctttcaaaa 480
agaatggtgc gggtcgcagc tgagatttac agagccggcc agctcacccc tgcagtcttg 540
40 aaggctctac aagtttatga acgggggttg cgctggtagc ctatagtcgg acctgtccct 600
ggagtggccc tttttgcaa ctccctacat gtgagtgata aacctttccc gggagcaact 660
catgtgctaa ccaacctgcc actcccgag aggcctaagc ctgaagactt ttgccctttt 720
gagtgtgcta tggtgacgt ctatgatatt ggtcatggcg cogtcatgta tgtggccaaa 780
gggaaagtct cctgggcccc tctgtggcgg gatgagggca aatttgaac tgtccctagg 840
45 gagtgaagt tgatcgcaa ccaactccac atctccttcc cgcaccacca cgcagtggac 900
atgtctaagt ttgtgttcat agcccctggg agtgggtgtct ctatgcccgt cgagtgccca 960
cacggtgtc tccccgtaa taotgtccct gaaggtaact gctgggtggcg cttgtttgac 1020
tegtcccaac tggacgttca gaacaaagaa attcgcccgt ccaaccaatt cggctatcaa 1080
50 accaagcatg gtgtcgctgg caagtaccta caacggaggc tgcaagctaa tggctctccga 1140
gcagtgactg atacagatgg acccattgtc gtacagtatt tctctgttag ggagagctgg 1200
atccgccact tcagactggc ggaagagcct agcctccctg ggtttgaaga cctcctcaga 1260
ataagggtag agcccaatac gtgcgcatgt agtgacaagg gtggaaaaat cttccggttt 1320
55 ggcagtcaca aatggtagcg tgctggaaag agagcaagga aagcacgctc tggtagtacc 1380
accacagtgc ctaccgcgc cttgcccgtc cgtgaaatcc agcaagcaa aaagcacgag 1440
gatgccggcg ctgataaggg tgtgcatctc aggcactatt ctccgcctgc cgacgggaac 1500
tgtggttggc actgcatttc cgccatcgcc aaccgaatgg tgaattcaa atttgaaact 1560
actcttccc agaggggtgag accttcagat gactgggcta ctgacgagga ccttgtgaac 1620
60 accatccaaa ttctcaagct ccttgcggcc ttggacagga acgggtgctt tgttggcgcc 1680
aaatacgtgc ttaagctgga aggcgagcat tggactgtct ctgtgacct tgggatgtcc 1740
ccttctttgc tcccccttga atgtgttcag ggtgtgtgt agcataagag cggacttggg 1800
ccccagatg cggtcgaagt tttcggattt gaccctgctt gccttgacc actggctgag 1860
65 gtaatgcact tgccatgagc tgcataccca gctgctctgg ccgaaatgtc cggcgacccc 1920
aactgtccgg cttccccggg cactactgtg tggactgttt cacaattctt tgcccgcac 1980

```

ES 2 348 159 T3

agaggaggag agcaccctga tcaggtgctc ttaggaaaa tcatcagcct ttgtcaagtt 2040  
 gttgaggaat gctgttgcca tcagaataaa accaacccggg ccacccccgga agaggttgcg 2100  
 gcaaggattg atcagtacct ccatggtgca acaagtcttg aagaatgctt gattaggctt 2160  
 5 gagagggttt gcccgccgag cgtcgggac acctctcttg attggaatgt tgtgctccct 2220  
 ggggttgggg cttcaactca gacaacccaaa cagctccatg tcaaccagtg ccgctctctg 2280  
 gttcctgtcg tgactcaaga gcctttggac aaagactcag tccctctgac cgcttctctg 2340  
 ctgtccaatt gctactatcc tgcacaaggt gacgaggttc gtcaccgtga gaggctaaac 2400  
 10 tccgtactct ctaagctgga ggggttgtt cgtgaggaat atgggctcac gccaaactgaa 2460  
 cctggcccgcc gaccgcact accgaacggg ctctgcgaac ttaaagacca gatggaggag 2520  
 gatctgctga aactagtcaa cgtccaggca acttcagaaa tgatggcctg ggcagccgag 2580  
 caggttgatc tgaagccttg ggtcaaaaac taccacgggt ggacaccgcc acccctcca 2640  
 ccaagagttc agcctcgaaa aacaaagtct gtcaagagct tgcaggga caaacctgtc 2700  
 15 cccgctccac gcaggaaggt cagatctgat tgtggcagcc cgattttgat gggcgacaat 2760  
 gttcctgacg gtcgggaaga tttgactgtt ggtggcccc ttgatcttcc gacaccatcc 2820  
 gagccgatga cacctctgag tgagctgca cttatgcccc cgttgcaata tatttctagg 2880  
 ccagtgacat ctttgagtgt gctggcccca gttcctgcac cgcgtagaac tgtgtcccg 2940  
 20 ccggtgacgc ccttgagtga gccaattttt gtgtctgcac cgcgacacaa atttcagcag 3000  
 gtggaagaag cgaatctggc ggcaacaacg ctgacgcacc aggaogaacc tctagatttg 3060  
 tctgcatcct cacagactga atatgaggct tctcccctaa caccactgca gaacatgggt 3120  
 attctggagg tgggggggca agaagctgag gaagttctga gtgaaatctc ggatacactg 3180  
 aatgacatca accctgcacc tgtgtcatca agcagctccc tgtcaagtgt taagatcaca 3240  
 25 cgccccaaac actctgctca agccatcatt gactcggggc ggcctgcag tgggcatctc 3300  
 cgaaggggaaa aagaagcatg cctcagcacc atgctgagg cttgtgatgc ggtaaagctt 3360  
 agtgaccctg ccacgcagga atggctttct cgcattcttag atagggtga catgctgact 3420  
 tggcgcaaca cgtctgctta ccaggcgttc cgcattcttag atggtaggtt tgagtttctc 3480  
 30 ccaagatga tactcgagac accgcccgcc taccctgtgt ggtttgtgat gctgcctcac 3540  
 acgctgcac cttccgtggg tgcagagagt gacctacca ttggttcagt cgcactgaa 3600  
 gatgttccac gcatcctcgg gaaaatagaa aacgcggcg agatgcccaa ccaggggctc 3660  
 ttgacatcct tgggggaaga accggtgtgc gaccaacctg tcaaggactc ctggatgtcg 3720  
 tcgccccggg ttgacgagag cacaacggct ccgtccgctg gtacaggtgg tctgactta 3780  
 35 cccaccgatt tgccaccttc agatggtttg gatgcggacg agtgggggccc gttaccggacg 3840  
 gtaagaaaga aagctgaaag gctcttcgac caattgagcc gtcaggtttt taacctcgtc 3900  
 toccatctcc ctgttttctt ctcaacacct tcaaatctg acagtgttta ttctccgggt 3960  
 gattgggggt ttgcagcttt tactttattt tgctcttttt tgtgttacag ctacccttc 4020  
 40 tttgttttg ttcccccttt ggggtttttt tctgggtctt ctcggcgtgt ggcctgggg 4080  
 gtttttggct gttggttggc ttttctgtt ggcctgttca agcctgtgtc cgaaccagtc 4140  
 ggcactgctt gtagatttga ctgcagagag gtaggaacg tcttcatc ttttgactt 4200  
 ctcaaacctt gggaccctgt tgcagacctt gttgtgggccc cgtcgggtct cggccttgc 4260  
 attcttggca ggttactggg cggggcacgc tacatctggc attttttgct taggcttggc 4320  
 45 attgttgcag attgtatctt ggctggagct tatgtgcttt ctcaaggtag gtgtaaaaag 4380  
 tgctggggat cttgtgtaag aactgctcct aatgaaatcg ccttcaacgt gttccctttt 4440  
 acgctgcga ccaggtcgtc actcatcgac ctgtgcgac ggttttgtgc gccaaaaggc 4500  
 atggacccca ttttctctgc tactgggtgg cgcgggtgct ggaccggccc aagtccatt 4560  
 gagcaaccct ctgaaaaacc catcgcgttc gccagtttg atgaaaagag gattacggct 4620  
 50 agaactgtgg gcgctcagcc ttatgatcct aaccaagccg taaagtgctt gcggtgtt 4680  
 caggcgggtg gggcgatagt ggccgaggca gtcccaaaag tggtaagggt ttccgctatt 4740  
 ccattccgag ctcccttttt tcccaccgga gtgaaggtt atcctgagtg caggatctgt 4800  
 gtcgaccccc acacttttac tacagctctc cggcttgggt actccaccac aaacctcgtc 4860  
 55 cttggtgtgg gggactttgc coactgaat ggattaaaa tcaggcaaat ttccaagccc 4920  
 tcgggaggag ccccgcacct cattgctgce ctgcatgtt ctgtctcgat ggcgttgcc 4980  
 atgcttgcct gagtttatgt aactgcagtg ggtcttgcg gtaccggcac caacgatccg 5040  
 tgggtgacta acccatctgc cgtccctggc tacggacctg gctccctctg cacgtccaga 5100  
 ttgtgcatct cccaacatgg ccttacctg cccttyacag cacttgtggc aggatctgg 5160  
 60 cttcaggaaa ttgcctagt cgttttgatt ttcgtttcca tcggaggcat ggctcatagg 5220  
 ttgagttgta aggctgatat gctgtgcgtc ttacttgcaa tcgcccagcta tgtttgggta 5280

ES 2 348 159 T3

ccccttaacct gggttgcctctg tgtgttttccct tgctgggttgc gctgggttctc tttgcaacct 5340  
 ctcaaccattc tatgggttgggt gtttttctctg atgtctgtaa atatgccttc gggaaatctta 5400  
 accgtgggtgt tattgggttgc tcttttgctt ctaggccgtt atactaatgt tgttgggtctt 5460  
 5 gttacccccct atgatattca tcattacacc aatggccccc gcgggtgttgc cgccttggct 5520  
 accgcaccag atgggactta cttggccgct gtccgcgog ctgctgtgac tggccgcacc 5580  
 gtgctgttta ccccgctca gcttgggtcc cttcttgagg gcgctttcag aactcgaaag 5640  
 ccctcactga acaccgtcaa tgtggctggg tccctccatgg gctctggcgg agtggtcact 5700  
 10 atcgatggga aaattaagt cgtgactgcc gcacatgtcc ttacgggtaa ttcagccagg 5760  
 gtttccgggg tcggettcaa tcaaatgctt gactttgatg taaaagggga cttcgccata 5820  
 gctgattgcc cgaattggca aggggctgct cctaagaccc aattctgcga ggatggatgg 5880  
 actggccgog cctattggct gacatcctct ggctgcgac ccggtgtcat tgggaatgga 5940  
 15 ttgccttct gcttcaccgc gtgcccgat tccgggtccc cagtgateac cgaagccggt 6000  
 gagcttctg cggttcacac aggatcaaac aaacaaggag gaggcattgt tacgcgcccc 6060  
 tctggccagt ttgcaatgt tgatgtgaag gttggcagcc acataattaa agacatatgc 6120  
 ggacctaagg tcccgtcgg tgccttgcct gctgccaaac ccgaactgga aggaggcctc 6240  
 20 gaggtacctt cagatcttgc tgtgtttttc ctccctggga gaatgatggg acatctctgg 6300  
 tccaccgtcc aacttctgtg tgtgtttttc ctccctggga gaatgatggg acatctctgg 6360  
 acgcccctgg ttgctgttgg gttttttatc ttgaatgagg ttctcccagc tgtactggtc 6420  
 cggagtgttt tctccttgg aatgtttgtg ctatcttggc tcacaccatg gtctgcgcaa 6480  
 gttctgatga tcaggcttct aacagcagct cttaacagga acagattgtc actcgccttt 6540  
 25 tacagccttg gtgcagcgac cgtttttgtc gcagatctgg cggcaactca agggcaccog 6600  
 ttgcaggcag taatgaattt aagtacctat gccttctctc ctccgataat ggtcgtgacc 6660  
 tcaccagtc cagtgattgc gtgtgggtgt gtgcacctcc ttgccataat tttgtacttg 6720  
 ttaagtacc getgcctgca caatgtcctt gttggcgatg gtgcgttctc tgcggtttc 6780  
 30 ttcttgcgat actttgcoga ggggaaattg agggaaaggg tgtcgcattc ctgcccggatg 6840  
 aatcatgagt cgtgactgg tgccctcgtc atgagactta atgacgagga cttggatttt 6900  
 cttacgaaat ggactgattt taagtgttt gtttctgcat ccaacatgag gaatgcggcg 6960  
 ggccagttca tcgaggctgc ctatgctaaa gcacttagaa ttgaaactgc ccagttgggtg 6960  
 caggttgata aggttcgagg tactttggcc aaacttgaag cttttgctga taccgtggca 7020  
 35 ccccaactct cgcocggtga ccttgttgt gctcttggcc ataccgctgt tggcgttatc 7080  
 ttcgacctaa aggttggtag caccaagcat accctccaag ccattgagac cagagtctt 7140  
 gccgggtcca aatgaccgt ggcgctgtc gttgatccaa ccccccacacc ccccccgcga 7200  
 cccgtgcta tccccctcc accgaaagt ctggagaatg gtcccaacgc ctgggggggat 7260  
 40 gaggatcgtt tgaataagaa gaagaggcgc aggatggaag ccgtcggcat ctttgttatg 7320  
 ggtggaagaa aatatcagaa attttgggac aagaactccg gtgatgtgtt ttatgaggag 7380  
 gtccatgata acacagacgc gtgggagtg ctcagagttg acaacctgc cgactttgac 7440  
 cctgagaagg gaactctgt cgggcatact accattgaag ataagactta cagtgtctac 7500  
 gcctccccat ctggcaagaa atctctggtc cccgtctacc cagagagcaa aaaaaacca 7560  
 45 tgggaagctg cgaagctttc cgtggaacag gcccttggca tgatgaatgt cgacgggtgaa 7620  
 ctgacagcca aagaagtggaa gaaactgaaa agaataattg acaactcca gggcctgact 7680  
 aaggagcagt gtttaactg ctagccgcca gggccttgc ccgctgtgtt cgcggcggt 7740  
 tggttgttac tgagacagcg gtaaaaatag tcaaatctca caaccggacc ttcaccctag 7800  
 gacctgtgaa tttaaaagt gccagtgagg ttgagctaaa agacgcggtc gagcataacc 7860  
 50 aacaccgggt tgcaagacc gttgatgggt gttgtgtgct cctgcgctcc gcagtctct 7920  
 cgttataga cgtcttaatc tccggcgtc atgcatctcc caagtactc gcccgcaccg 7980  
 ggccgggaaa cactgggatc gatggcacgc tttgggattt tgaggccgag gccactaaag 8040  
 aggaaattgc actcagtgcg caaataatac aggcctgtga cattaggcgc ggcgacgcac 8100  
 55 ctgaaattgg tcttcttat aagctgtacc ctgtcagggg caacctgag cgggtaaaag 8160  
 gagttttaca gaatacaagg tttggagaca taccttataa aacccccagt gacactggaa 8220  
 gccagtgca cgcggctgcc tgctcaccgc ccaatgccac tccggtgact gatgggcgt 8280  
 ccgtcttggc cagcactat cctccgggt ttgagttgta tgtaccgacc attccagcgt 8340  
 ctgtccttga ttatcttgat tctaggcctg actgccccaa acagttgaca gagcaaggct 8400  
 60 gtgaggacgc cgcattaaga gacctctcca agtatgactt gtccacccaa ggctttgttt 8460  
 tacctggagt tcttgcctt gtgctgaagt acctgttgc tcatgtgggt aagtgcocgc 8520  
 ccgttcatcg gccttccact taccctgcca agaattctat ggctggaata aatgggaaca 8580

ES 2 348 159 T3

5 ggtttccaac caaggacatc cagagcgtcc ctgaaatcga cgttctgtgc gcacaggccg 8640  
 tgcgggaaaa ctggcaaaact gttacccctt gtaccctcaa gaaacagtat tgtgggaaga 8700  
 agaagactag gacaatactc ggcaccaata acttcattgc gctggcccac cgggcagcgt 8760  
 10 tgagtgggtg caccagggc ttcataaaaa aggcgtttaa ctgcgccatt gccctcggta 8820  
 aaaacaaatt taaagagctt cagactccgg tcttaggcag gtgccttgaa gctgatcttg 8880  
 catcctgcga tcgctccaca cctgcaattg tccgctgggt tgcgcacaat cttctttatg 8940  
 aacttgcttg tgctgaagag cacctgcccgt cgtacgtggt gaactgctgc cacgacctac 9000  
 15 tggtcacgca gtccggcgca gtaactaaga gaggtggcct gtcgtctggc gaccgatca 9060  
 cttctgtgtc caacaccatt tacagcttgg tgatatatgc acaacacatg gtgctcagtt 9120  
 actttaaaag tggtcaccct catggccttc tgtttctaca agaccagctg aagtttgagg 9180  
 acatgctcaa ggttcaaccc ctgatcgtct attcggacga cctcgtactg tatgcccagt 9240  
 20 ctcccaccat gccaaactac cactgggtgg ttgaacatct gaacctgatg ctgggttttc 9300  
 agacggaccc aaagaagaca gccataacag actcgcacatc atttctaggc tgtaggataa 9360  
 taaatggacg ccagctcgtc cctaaccgtg acaggattct cgcggccctc gcctaccata 9420  
 tgaaggcaag caatgtctct gaatactacg cctcggcggc tgcgatactc atggacagct 9480  
 25 gtgcttgttt agagtatgat cccgaatggt ttgaagagct tgtagtggg atagcgcagt 9540  
 gtgcccgcaa ggacggctac agttttcccg gcccgccggt cttctgtgct atgtgggaaa 9600  
 aactcagatc caatcatgag gggaaagaagt ccagaatgtg cgggtactgc ggggccccgg 9660  
 ctccgtacgc cactgcctgt ggctcgaag tctgtattta ccacacccac tccaccagc 9720  
 attgtccagt catcatctgg tgtggccacc cggctggttc tggttcttgt agtgagtgca 9780  
 30 aacccccct agggaaaggc acaagccctc tagatgaggt gttagaacaa gtcccgtata 9840  
 gactccacg gactgtaatc atgcatgtgg agcagggtct caccctctt gaccaggca 9900  
 gataccaga tcgcccggga ttagtctccg ttaggcgtgg cattagagga aatgaggtg 9960  
 35 atctaccaga cggtgattat gctagcaccg cctactccc tacttgtaaa gagattaaca 10020  
 tggtcgctgt cgcctcta atgttgcgca gcaggttcat catcggcccg cctggtgctg 10080  
 ggaaaacata ctggctcctt caacaggtcc aggatggtga tgtcatttac acgccaactc 10140  
 accagaccat gctcgatatg attagggctt tggggacgtg ccggttcaac gtcccagcag 10200  
 gtacgacgct gcaattccct gcccccctcc gtaccggccc ttgggttcgc atcctagccg 10260  
 40 gcggttggtg tccctggcaag aattccttcc tggatgaagc agcgtattgt aatcacctg 10320  
 atgtcttgag gcttcttagc aaaactacc tcacctgtct gggagatttc aaacaactcc 10380  
 acccagtggg ttttgattct cattgctatg tttttgacat catgcctcag actcaactga 10440  
 agaccatctg gagatttggg cagaatatct gtgatgccat tcagccagat tacagggaca 10500  
 aacttgatc catggtcaac acaaccctg taacctacgt ggaaaaacct gtcaagtatg 10560  
 45 ggcaagtcct cacccttac cacagggacc gagagggacg cgccatcaca attgactcca 10620  
 gtcaaggcgc cacatttgat gtggttacac tgcatttgc cactaaagat tcaactcaaca 10680  
 ggcaagagc ccttgttgct attaccagg caagacatgc tatctttgtg tatgaccac 10740  
 acaggcaact gcagagcatg tttgatcttc ctgcgaaagg cacaccctgc aacctcgtg 10800  
 tgcaccgtga cgagcagctg atcgtgctag atagaaataa caaagaatgc acggttgcctc 10860  
 50 aggctctagg caatggggat aaattcagg ccacagacaa gcgcgttgta gattctctcc 10920  
 ggcaccattg tgcagatctg gaagggtcga gctccccgt cccaaggctc gcacacaact 10980  
 tgggatttta tttctcgcct gatttgacac agtttgctaa actcccggta gaacttgcac 11040  
 cccactggcc cgtggtgaca acccagaaca atgaaaagtg gccagaccgg ttggttgcta 11100  
 55 gccttcgccc cgtccataag tatagcccg cgtgcatcgg tctcacaataa tttgtcagg 11160  
 cctcagtggt tctgggcacc cctgggggtg tgcataacta tctcacaataa tttgtcagg 11220  
 gcgaggctca aatgcttcg gagacagctc tcagcaccgg ccgaattgag gtagattgct 11280  
 gtgagtatct tgatgaccgg gagcgagaaa ttgctgagtc cctcccccat gctttcattg 11340  
 gcgacgtcaa aggcaactacc gttggaggat gtaccatgt cacctccaaa taactcgc 11400  
 60 gcttccctcc caaggaatca gtcgcggtag tccgggtttc aagccccggg aaagccgcaa 11460  
 aagcagttt cacattaaca gatgtgtatc tcccagatct cgaagcttac ctccaccag 11520  
 agaccagtc caagtgtcg aaaatgatgt tggacttcaa ggaagttcga ctgatggtct 11580  
 ggaaggacaa gacggcctat tttcaactg aagcccgcca tttcacctgg taccagctg 11640  
 caagctatgc ctcgtacatc cgagttctct ttaactctac ggtgtatttg gaccctgca 11700  
 65 tgggcccctgc cctttgcaac agaagagttg tccgggtccac tcattgggga gctgacctcg 11760  
 cagtcacccc ttatgattac ggtgccaaaa tcatcctgtc tagtgatac catggtgaaa 11820  
 tgcgccctgg gtacaaaatc ctggcgtgcy cggagtctc gcttgacgat ccagtgaggt 11880

ES 2 348 159 T3

acaaacacac ctggggggtt gaatcggata cagcgtatct gtaocgagttc accggaaaacg 11940  
 gtgaggactg ggaggattac aatgatgcgt ttcgtgcgcg ccagaaaggg aaaatttata 12000  
 aggccactgc caccagcatg aggtttcatt tcccccggg cctgtcatt gaaccaactt 12060  
 5 taggcctgaa ttgaaatgaa atgggggtcca tgcгаагссс сtttgacaaa attggccaac 12120  
 tttttgtgga tgctttcacg gaatTTTTTgg tgtccattgt tgatatcatc atatttttgg 12180  
 ccatTTTgtt tggttttacc atcgcctggct ggctgggtgg cttctgcac c gattgggtt 12240  
 gctccgcggg actccgtgcg cgcctacca ttcacctga gcaattacag aagatcctat 12300  
 10 gaggcctttc tttctcagtg ccagggtggat attcccacct ggggaactag acatccccctg 12360  
 gggatgtttt ggcaccataa ggtgtcaacc ctgattgatg aaatgggtgtc gcgtcggatg 12420  
 taccgcacca tggaaaaagc aggacaggct gcctggaaac aggtgggtgag c gaggccacg 12480  
 ctgtctcgca ttagtgggtt ggatgtgggt gotcattttc agcatcttgc cgccttgaa 12540  
 gccgagacct gtaaatattt ggctctcgg ctgccatgc tacacaatct gcgcatgaca 12600  
 15 gggTcaaatg taacctatgt gtataatagt actttgaatc aggtgtttgc tatttttcca 12660  
 accctggat cccggccaaa gcttcatgat tttcagcaat ggctaatagc tgtgcactcc 12720  
 tccatatttt cctcctgtgc ggttcttgt actcttttg ttgtgctgtg gttgocggatt 12780  
 ccaatactac gtactgtttt tggtttccgc tggtagggg caatttttcc ttcgaactca 12840  
 20 cggTgaatta cacggtgtgt ccgccttgc tccaccgca agcagccgc gaggctcag 12900  
 aaccaggcag gtctcttttg tgcaggatag ggcattgacc atgtagttag gacgaccatg 12960  
 acgatctagg gtctcatggt ccgcctggcc tctccagcga aggcacttg accagtgtt 13020  
 acgcctgggt ggogttctc tcttccagct acacggcca gttccatccc gagatattt 13080  
 25 ggatagggaa tgtgagtcaa gtttatgttg acatcaagca ccaattcctc tgcgcggtt 13140  
 acgacgggga gaacgccacc ttgcctcgtc atgacaatat ttcagccgta tttcagacct 13200  
 actaccaaca tcaagtogac ggcggcaatt ggtttcacct agaatggctg cgcctctct 13260  
 tttctcttg gttggtttta aatgtttctt ggtttctcag gcgttcgctt gcaagccatg 13320  
 tttcagttca agtctttcgg acatcaaaac caacactacc gcagcatcag gctttgttgt 13380  
 30 cctccaggac atcagctgcc ttaggcattg c gactcgtcc tctcagacga ttcgaaaag 13440  
 ctctcagtg cgcgcggcga tagggacgcc cgtgtacatc actgtcacag ccaatgtcac 13500  
 agatgagaat tatttacatt cttctgatct ccttatgctt tcttcttgc tttctatgc 13560  
 ttctgagatg agtgaaaagg gattcaaggT gatatttggc aatgtgtcag gcatcgtggc 13620  
 35 tgtgtgtgtc aactttacca gctacgtcca acatgtcaag gagtttacc aacgctcctt 13680  
 ggtggTcgat catgtgcggc tgcctcattt catgacacct gagaccatga ggtgggcaac 13740  
 cgttttagcc tgtttttttg ccatcttact ggcaatttga atgttcaagt atgttgggga 13800  
 gatgcttgac cgcgggctgt tgcctcggat tgccttcttt gtgggtgtatc gtgccattt 13860  
 gttttgtgc gctcgtcaac gccaacagca acagcagctc tcatcttcag ttgatttaca 13920  
 40 acttgacgt atgtgagctg aatggcacag attggctgaa agacaaattt gattgggag 13980  
 tggagacttt tctgatcttt cccgtgttga ctacattgt ctcatatggt gcactacca 14040  
 ctagcaattt ccttgacaca gtccgtctgg ttaactgttc taccgcggg tctaccaag 14100  
 ggcggtatgt tctgagtagc atctacgcgg tctgcgctct ggccgcattg atttgcctc 14160  
 45 tcattaggct tgcgaagaac tgcattgctt ggcgctactc ttgtaccaga tatactaact 14220  
 tcttctgga cactaagggc agactctatc gctggcggtc gcccgttatc atagagaaag 14280  
 ggggtaaggT tgaggTcgaa ggtcacctga tgcacctcaa aagagtTgtg cttgatgggt 14340  
 ccgtggcaac cctttaacc agagtTtcag cggaaacaatg gggTcgtctt tagacgactt 14400  
 ttgctatgat agcagggctc cacaaaaggT gcttttggcg ttttccatta cctacacgcc 14460  
 50 agtgatgata tatgctctaa aggtaagtgc cggccgactt ttagggcttc tgcaccttt 14520  
 gatctttctg aattgtactt ttacctcgg gtacatgaca ttcgtgcact ttaatagcac 14580  
 aaataaggTc gcgctcacta tgggagcagt agttgcactt ctttgggggg tgtactcagc 14640  
 catagaaacc tggaaagtTca tcaacctcag atgcctgtt tgccttgcag gccgcaagta 14700  
 55 cattctggcc cccgccacc acgtcgaaag tgcgcgggc tttcatccga tgcgggcaaa 14760  
 tgataaccac geatttgtc tccggcgtcc cggctccact acggttaacg gcacattggt 14820  
 gccggggtg aaaagcctc tgttgggtgg cagaaaagct gttaaacagg gagtggtaaa 14880  
 cctgtTcaaa tatgccaat aacaacggca agcagcaaaa gaaaaagagg gggaatggcc 14940  
 60 agccagTcaa tcagctgtgc cagatgctgg gtaagatcat cgcacagcaa aaccagTcca 15000  
 gaggcaaggg accggggaag aaaattaaga ataaaaacc ggagaagccc catttctctc 15060  
 tagcagTga agatgacgtc aggcattcact tcaacctag tgagcggcaa ttgtgtctgt 15120  
 cgtcagTcca gactgcctt aaccagggcg ctggaacctg taccctatca gattcaggta 15180

## ES 2 348 159 T3

ggataagtta cactgtggag tttagtttgc cgacgcatca tactgtgccc ctgatccgcg 15240  
tcacagcgcc atcatcagcg taatgggctg gcattcetta agcacctcag tgttagaatt 15300  
ggaagaatgt gtggatgaatg gcaactgattg gcactgtgcc tctaagtcac ctattcaatt 15360  
5 agggcgaccg tgtggggggt aagtttaatt ggcgagaacc atgcggccga aattaataaa 15420  
aaaa 15424

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65