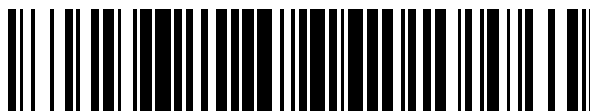


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 909**

51 Int. Cl.:
C07K 14/08 (2006.01)
C12N 7/08 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10169336 .4**
96 Fecha de presentación: **21.04.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **2251419**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2010**

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

30 Prioridad:
22.04.1999 US 298110
15.12.1999 US 461879

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.10.2012

73 Titular/es:
**The United States of America, as Represented
by the Secretary of Agriculture
1400 Independence Avenue SW
Washington, DC 20250-0302 , US y
Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.**

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

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 388 909 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).

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino basada en aislado JA-142 aislada

Antecedentes de la invención

Campo de la Invención

- 5 La presente invención se refiere, en general, 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.

Descripción de la técnica anterior

- 10 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 conferirían inmunidad a las cepas de VSRRP existentes entonces.

- 15 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 VSRRP y la necesidad de una nueva generación de vacunas contra SRRP.

- 20 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.

- 25 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.

- 30 Murtaugh y col. (1995) Archives Virol. 40, 1451-1460 compara las secuencias que codifican proteínas estructurales de las cepas víricas VR-2332 y Lelystad del virus de SRRP. El análisis comparativo de secuencias indica que había grados de identidad de aminoácidos con los marcos de lectura abiertos del virus Lelystad que variaban del 55 % en ORF5 al 79 % en ORF6.

- 35 Mengelin y col. (1999) A. J. V. 60(3), 334-340 describe la identificación y evaluación clínica de cepas silvestres relacionadas con vacuna sospechosas de virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino. Se concluyó que en piaras de ganado porcino, la cepa de la vacuna puede haber persistido y mutado a una forma menos atenuada.

- 40 El documento EP 0835929 A1 describe una nueva cepa atenuada (CNCM Institut Pasteur 1-1642) de virus del SRRP, junto con un procedimiento de replicación de atenuación de la misma usando un clon obtenido a partir de células de hígado de mono MA-104 (CNCM Institut Pasteur 1-1643).

45 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.

5 El documento US 5.587.164 divulga un procedimiento para cultivar virus del SRRP en un cultivo hístico que es susceptible a la infección para replicar el virus en una cantidad suficiente para proteger animales contra el SRRP o puede usarse para diagnosticar SRRP o identificar la estructura molecular de virus del SRRP para desarrollar productos recombinantes, comprendiendo dicho procedimiento inocular los virus en el tejido hístico y recolectar el virus replicado

10 Por lo tanto, existe la 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 refiere a las realizaciones (1) a (21) siguientes:

15 (1) Un virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (SRRP) que comprende una secuencia representada por SEC ID N°:1 o por una secuencia que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con SEC ID N°:1.

(2) El virus de la realización (1), comprendiendo el virus la secuencia representada por SEC ID N°:1.

(3) Un virus del SRRP que tiene el número de acceso ATCC VR-2638.

(4) El virus de la realización (1), comprendiendo el virus la secuencia representada por SEC ID N°:2.

20 (5) El virus de una cualquiera de las realizaciones (1) a (3), atenuado por un procedimiento para atenuar un virus que incluye las etapas de replicar sucesivamente dicho virus mediante inoculación y replicación del virus en cultivos celulares individuales respectivos hasta lograr la atenuación, retirar las muestras que contienen virus de al menos determinados de dichos cultivos celulares mientras el virus se está replicando a una velocidad logarítmica y antes de la inducción de efectos citopáticos en dichos determinados cultivos celulares e inocular el siguiente pase de cultivo celular respectivo con dichas muestras.

25 (6) El virus de la realización (5), produciéndose dicha etapa de retirada aproximadamente 24 horas después de la inoculación de dichos cultivos celulares.

(7) El virus de la realización (5), comprendiendo dicho cultivo celular una monocapa de células que tiene una confluencia superior a aproximadamente el 70 %.

30 (8) El virus de la realización (5), que además comprende la etapa de analizar periódicamente dicho virus progenie para evaluar la atenuación.

(9) El virus de la realización (5), que además comprende las etapas de conservar dichos determinados cultivos celulares después de dicha etapa de retirada y observar si la inducción de efectos citopáticos tiene lugar en dichos cultivos celulares conservados.

35 (10) El virus de la realización (5), comprendiendo dicha inoculación el número más pequeño de virus que da como resultado en última instancia ECP.

(11) El virus de una cualquiera de las realizaciones precedentes, habiéndose pasado dicho virus un mínimo de 200 veces en cultivo celular.

(12) El virus de una cualquiera de las realizaciones precedentes, estando dicho virus atenuado.

(13) El virus de una cualquiera de las realizaciones precedentes, siendo dicho virus avirulento.

40 (14) El virus de una cualquiera de las realizaciones precedentes, siendo dicho virus capaz de generar respuestas de anticuerpos en ganado porcino.

(15) El virus de la realización (14), siendo dicha respuesta de anticuerpos específica para cepas de virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.

45 (16) El virus del SRRP atenuado de una cualquiera de las realizaciones (5) a (10), obtenido mediante atenuación de un virus que tiene una secuencia de ácido nucleico representada por SEC ID N°:2.

(17) Una vacuna que comprende el virus según una cualquiera de las realizaciones precedentes.

(18) La vacuna de la realización (17), que además comprende un agente vehículo farmacológicamente compatible.

(19) Una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende al menos el 95 % de identidad de secuencia con SEC ID N°:1.

(20) Una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia tal como se muestra en SEC ID N°:1.

5 (21) La vacuna tal como se define en la realización (17) o (18) para su uso en la inmunización de ganado porcino contra el síndrome respiratorio y reproductivo porcino, en la que dicha inmunización comprende administrar dicha vacuna a dicho ganado porcino.

10 La presente invención supera los problemas resumidos anteriormente y proporciona 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.

15 En formas preferentes, 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.

20 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.

25 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 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.

30 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 µl, 20 µl y 2 µl. Después de un período de incubación corto inicial (por ejemplo, ~24 horas), las mismas alícuotas virales (en el ejemplo, de 200 µl, 20 µl y 2 µl) de cada cultivo 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 completan un número seleccionado de pases, puede terminarse la serie de mayor alícuota viral (en el ejemplo, de 200 µl y 20 µl), después de lo cual se emplea otra serie de alícuotas virales progresivamente más pequeñas (por ejemplo, de 2 µl, 0,2 µl y 0,02 µl) y el procedimiento se repite de nuevo, manteniendo de nuevo los cultivos celulares después de la transferencia para la observación del ECP.

35 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 ECP sustituye al pase en el que no se observó ECP, después de lo cual se inocularán pases posteriores usando las alícuotas virales previamente empleadas.

40 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 VSRRP), se observará que son necesarias alícuotas virales cada vez más pequeñas para mantener la 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 convencionales. 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.

Tal 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 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" 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. 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). Los procedimientos preferidos para determinar la identidad de secuencia están diseñados para dar el mayor emparejamiento entre las secuencias ensayadas. Los procedimientos para determinar la identidad de secuencia están codificados 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. 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 polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene una "identidad de secuencia" de al menos, por ejemplo, el 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 delecionarse 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 delecionarse 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", tal 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.

5 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.

10 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.

15 Preferentemente, las secuencias que comparten una identidad de secuencia de al menos el 95 % con la SEC ID N^o: 1 son eficaces para conferir inmunidad a animales vacunados con virus atenuados que contienen dichas secuencias homólogas.

Descripción detallada de la realización preferente

Los ejemplos siguientes exponen realizaciones preferentes de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos se proporcionan a modo de ilustración.

Ejemplo 1

Materiales y Procedimientos

20 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 μ l a un cultivo no infectado, se añadieron 20 μ l a un segundo cultivo no infectado y 2 μ 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 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.

35 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 CO₂ al 5 %.

50 Se analizaron 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 μ l, 20 μ l y 2 μ 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 μ l) del grupo de alícuotas que se estaba ensayando daba como

ES 2 388 909 T3

5 resultado sistemáticamente ECP, se ensayaban cantidades menores (por ejemplo, de 0,2 μ l y 0,02 μ 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 μ l no tenía éxito produciendo ECP en el pase 25 pero la transferencia de 20 μ l en el pase 25 tenía éxito, la transferencia de 2 μ l se repetía usando 20 μ l, reanudando las transferencias de 2 μ 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):

10

Número de Pase	Cantidad Transferida
3-21	200 μ l
22, 23	20 μ l
24-41	200 μ l
42-83	20/200 μ l (con alternancia)
84-90	20 μ l
91-112	2 μ g
113	0,2 μ l
114-116	2 μ l
117	0,2 μ l
118-120	2 μ l
121	0,2 μ l
122-124	2 μ l
125-167	0,2 μ l
168	0,02 μ l
169-171	0,2 μ l
172	0,02 μ l
173-175	0,2 μ l
176	0,02 μ l
177-179	0,2 μ l
180	0,02 μ l
181-183	0,2 μ l
184	0,02 μ l
185-187	0,2 μ l
188	0,02 μ l

(continuación)

Número de Pase	Cantidad Transferida
189-191	0,2 µl
192	0,02 µl
193-195	0,2 µl
196	0,02 µl
197	0,2 µl

Resultados y Discusión

5 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 µl o 0,02 µl) 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 µl, se añadían 2 µl de medio nutritivo infectado por virus a 20 µl a medio nutritivo y se añadían 2 µl 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 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

Materiales y Procedimientos

30 Este ejemplo determinó si el pase 200 del virus del 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 grupos 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 recopilaron y se puntuaron en

ES 2 388 909 T3

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; fluidas = 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; babas = 2; úlceras = 3.
7. Actividad
NA
8. Apetito
normal = 0; disminuido = 1; anoréxicos (ninguno) = 3.
9. Otros

5 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. 10 Los parámetros para la puntuación pulmonar son los siguientes:

% 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	=	_
% 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	=	_
% de Implicación del Lóbulo Intermedio del Pulmón Derecho	X	0,10	=	_
Total (Suma de los valores en la columna más a la derecha)			=	_

Resultados y Discusión

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

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
	806	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Promedio	0	0	0,4	0	0	0	0	0	0
Solución salina	550	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	568	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	801	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Promedio	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tratamiento	Grupo 2 Nº de Cerdo	Día -1	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Promedio
Retropase 1	546	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	553	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	562	0	0	0	0	0	1	0	0	0,125
	572	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	573	0	0	0	0	2	0	0	0	0,25
	Promedio	0	0	0	0	0,4	0,2	0	0	0,075
Retropase 1	556	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	566	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	802	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Promedio	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ES 2 388 909 T3

(continuación)

Tratamiento	Grupo 3 Nº de Cerdo	Día -1	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Promedio
Retropase 2	548	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	567	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	569	0	0	0	0	1	1	0	0	0,25
	574	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	804	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Promedio	0	0	0	0	0,2	0,2	0	0	0,05
Retropase 2A	547	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	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
Tratamiento	Grupo 4 Nº de Cerdo	Día -1	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Promedio
Retropase 3	549	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	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
	803	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Promedio	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Retropase 3A	560	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	571	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	575	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Promedio	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tratamiento	Grupo 5 Nº de Cerdo	Día -1	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Promedio
Retropase 4	1	0	2	0	0	2	0	2	2	1
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	2	0	2	2	2	2	2	2,0	1,75

(continuación)

Tratamiento	Grupo 5 Nº de Cerdo	Día -1	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Promedio
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	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
Retropase 4A	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	2	2	2	2	2	2	1,5
	8	0	0	0	0	0	0	0	00	0
	Promedio	0	0,08	0,48	0,48	0,56	0,48	0,56	0,56	0,4
Tratamiento	Grupo 6 Nº de Cerdo	Día -1	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Promedio
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
	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
Retropase 5A	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	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	0,32	0,253333

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

10 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 retropases 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.

Ejemplo 3

Materiales y Procedimientos

Este ejemplo demostró que el nivel de atenuación de seguridad de VSM, JA-142, pase 200 no cambiaba significativamente durante seis retropases 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, retropase 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.

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.

ES 2 388 909 T3

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 ($7-20 \times 10^6/\text{ml}$).

- 5 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
- 10 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 2

		Puntuaciones Clínicas de Cerdas															
Tratamiento	Nº Cerda	-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

(continuación)

	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
JA-142 VSM	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Pase 200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	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
Tratamiento	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Grupo B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Retropase 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	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
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Grupo B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Retropase 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(continuación)

	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
149	0	0	0	0	0	0	0	0	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
212	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
Prom.	0	0	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 B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Retropase 6	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
149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2
209	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
226	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	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Tratamiento	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Grupo C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diluyente Estéril	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	3	5	3	3
117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
156	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(continuación)

		-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	166	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	0,2	0,5	0,5	0,8	0,7	0,7
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Grupo C	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diluyente Estéril	113	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	6	6	2	4	2	2
	117	0	0	0	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	0	0	0
	156	2	0	0	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	0	0	0
	Prom.	0,8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,8	1,5	1,5	1,5	1,8	1,8	0,7	1,3	0,5	0,5
		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Grupo C	58	0	0	0	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	0	0	0
	144	0	0	0	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	0	0	0
	166	0	0	0	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	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tratamiento	Nº Cerda	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Grupo D	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1

(continuación)

		-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
JA-142	106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Pase 4	159	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1	1	1	1	1
	190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	232	0	0	0	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	0	0	1	1	1
	Prom.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Grupo D	2	1	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	0
Pase 4	159	1	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	0
	206	0	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	0
	234	0	2	0	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
		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38						
Grupo D	2	0	0	0	1	1	1	3	3	1	1						
JA-142	106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
Pase 4	159	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						

(continuación)

	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38								
190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
232	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
234	0	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								

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.

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

(continuación)

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		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
		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	3	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	1	0	0	0	0	0	0	0
		849	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
		850	30													

ES 2 388 909 T3

(continuación)

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		976	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		977	0	0	0	0	1	30	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
	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

ES 2 388 909 T3

(continuación)

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		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
		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

(continuación)

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		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			
		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
		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

(continuación)

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		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	1	1	1	1	30							
		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

(continuación)

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		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
		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

(continuación)

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	1	1	1	1	1	1
		455	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	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
		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

(continuación)

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		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
		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					

(continuación)

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		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

(continuación)

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	1	0	0
		148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
		149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	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

(continuación)

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		Prom.	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1
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
		76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(continuación)

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		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
		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											
		Abortado	NA													
	106															

(continuación)

Tratamiento	Nº Cerda	Nº Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	159	883	30													
		884	30													
		Prom.	30													
	190	Abortado	NA													
	206	890	30													
		Prom.	30													
	232	888	30													
		889	30													
		Prom.	30													
	234	Abortado	NA													

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 retrovirus 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 retrovirus 6.

Ejemplo 4

Materiales y Procedimientos

Este ejemplo evaluó 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 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 χ^2 que ensaya si el porcentaje de animales positivos es el mismo en cada grupo. Se realizaron recuentos de leucocitos como en el Ejemplo 2.

Resultados y Discusión

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 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. 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 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°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°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°F) sobre su promedio pre-exposición durante dos días o más tiempo.

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.

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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 **Ejemplo 6**

Materiales y Procedimientos

Este ejemplo comparó 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.

35 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

40 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.

50 Los resultados de aislamiento de virus se correlacionaban bien 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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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.

25 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 promedio de grupo para los controles normales (grupo 4) era de cero. La puntuación promedio de grupo para el grupo de tratamiento con diluyente estéril (grupo 3) era de 70,08. Las puntuaciones promedio 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.

30 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

45 *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.

50 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 µg/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada a 37°C en matraces de cultivo de tejidos de plástico de 75 cm². 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 10⁵-10⁶ dosis infecciosas en cultivo de tejidos (DICT₅₀) 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 µl de tampón AVL preparado (kit de aislamiento de ARN Viral QIAamp) (QIAGEN, Inc. Valencia, CA)/ARN transportador a una muestra de 280 µl de medio de cultivo que contenía virus. La mezcla se agitó vorticialmente y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se añadieron 1120 µl 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 µl a 6.000 x g durante 1 min. La columna se lavó con 500 µl de tampón AW y se centrifugó para eliminar todo rastro de solución de lavado. El ARN se eluyó de la columna con 60 µl 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 MgCl₂ 5 mM, tampón convencional II 1X (Perkin Elmer Corp. Wellesley, MA), 1 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 1 unidad/µl de inhibidor de RNasa, 2 unidades de RT y 1 µl de ARN en una reacción de 40 µl. 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.

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 µl de una mezcla de reacción de ADNc se combinaron con los reactivos siguientes, dando como resultado una reacción de 25 µl que contenía MgCl₂ 2 mM, tampón convencional II 1X (Perkin Elmer), 0,2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 0,3 µM 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 µl de ADNc en un volumen de 20 µl que contenía tampón 4 1X (New England Biolabs, Beverly, MA), CoCl₂ 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 µl con agua.

Se realizó una PCR usando el Sistema de PCR de Moldes de Gran Tamaño Expand^a (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) en un volumen de reacción de 50 µl que contenía 10 µl de ADNc con cola poli(dA) diluido, tampón 3 1X, 0,35 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, MgCl₂ 0,625 mM, cebador Q_t 0,04 µM (Frohman, 1994), cebador Q_o 0,3 µM (Frohman, 1994), 5'-CGCCCTAATTGAATAGGTGAC-3' 0,3 µM y 0,75 µl 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 µl de producto diluido a una segunda reacción de PCR que contenía, en 50 µl, tampón 1 1X, 0,35 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, cebador Q_i 0,3 µM (Frohman, 1994), 5'-

5 CCTTCGGCAGGCGGGGAGTAGTGTGTTGAGGTGCTCAGC-3' 0,63 μ M y 0,75 μ 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.

10 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.

25 También se divulga

30 Punto 1: En un procedimiento de pase múltiple para atenuar un virus que incluye las etapas de replicar sucesivamente dicho virus mediante inoculación y replicación del virus en cultivos celulares individuales respectivos hasta lograr la atenuación, la mejora que comprende retirar las muestras que contienen virus de al menos determinados de dichos cultivos celulares mientras el virus se está replicando a una velocidad logarítmica y antes de la inducción de efectos citopáticos en dichos determinados cultivos celulares e inocular los pases de cultivos celulares respectivos siguientes con dichas muestras.

Punto 2: El procedimiento del punto 1, produciéndose dicha etapa de retirada aproximadamente 24 horas después de la inoculación de dichos cultivos celulares.

35 Punto 3: El procedimiento del punto 1, comprendiendo dicho cultivo celular una monocapa de células que tiene una confluencia superior a aproximadamente el 70 %.

Punto 4: El procedimiento del punto 1, que además comprende la etapa de analizar periódicamente dicho virus progenie para evaluar la atenuación.

40 Punto 5: El procedimiento del punto 1, que además comprende las etapas de conservar dichos determinados cultivos celulares después de dicha etapa de retirada y observar si tiene lugar la inducción de efectos citopáticos en dichos cultivos celulares conservados.

Punto 6: El procedimiento del punto 1, comprendiendo dicha inoculación el número más pequeño de virus que da como resultado en última instancia ECP.

Punto 7: Un virus del SRRP que tiene el número de acceso ATCC VR-2638.

Punto 8: Un virus atenuado mediante el procedimiento del punto 1.

45 Punto 9: El virus del punto 8, habiéndose pasado dicho virus un mínimo de 200 veces en cultivo celular.

Punto 10: El virus del punto 9, siendo dicho virus sustancialmente avirulento.

Punto 11: El virus del punto 10, siendo dicho virus capaz de generar respuestas de anticuerpos en ganado porcino.

- Punto 12: El virus del punto 11, siendo dicha respuesta de anticuerpos específica para cepas de virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.
- Punto 13: Una vacuna que comprende el virus del punto 7.
- Punto 14: La vacuna del punto 13, que además comprende un agente vehículo farmacológicamente compatible.
- 5 Punto 15: La vacuna del punto 13, siendo dicho vacuna capaz de generar respuestas de anticuerpos en un animal huésped.
- Punto 16: La vacuna del punto 15, incluyendo dicho animal huésped ganado porcino.
- Punto 17: La vacuna del punto 15, siendo dicha respuesta de anticuerpos específica para cepas de virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.
- 10 Punto 18: La vacuna del punto 17, incluyendo dichas cepas cepas del síndrome respiratorio y reproductivo porcino atípicas.
- Punto 19: Un virus que tiene un patrón de escisión de enzima de restricción de 1-4-2 por las enzimas MLU 1, Hinc II y Sac II, respectivamente, en el marco de lectura abierto cinco.
- Punto 20: El virus del punto 19 que no es escindido por MLU 1 en el marco de lectura abierto cinco.
- 15 Punto 21: Una vacuna que comprende el virus del punto 19.
- Punto 22: La vacuna del punto 21, que además comprende un agente vehículo farmacológicamente compatible.
- Punto 23: La vacuna del punto 21, siendo dicho vacuna capaz de generar respuestas de anticuerpos en un animal huésped.
- Punto 24: La vacuna del punto 23, incluyendo dicho animal huésped ganado porcino.
- 20 Punto 25: La vacuna del punto 23, siendo dicha respuesta de anticuerpos específica para cepas de virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.
- Punto 26: La vacuna del punto 25, incluyendo dichas cepas el síndrome respiratorio y reproductivo porcino atípico.
- Punto 27: Un procedimiento para inmunizar ganado porcino contra cepas del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar a ganado porcino la vacuna del punto 21.
- 25 Punto 28: Una secuencia de ADN aislada que tiene al menos aproximadamente el 65 % de identidad de secuencia con SEC ID N°:1.
- Punto 29: Una secuencia de ADN aislada que tiene al menos aproximadamente el 75% de homología de secuencia con SEC ID N°:1.
- 30 Punto 30: Una secuencia de ADN aislada que tiene al menos aproximadamente el 65% de identidad de secuencia con SEC ID N°:2.
- Punto 31: Una secuencia de ADN aislada que tiene al menos aproximadamente el 75% de homología de secuencia con SEC ID N°:1.
- Punto 32: Un virus del SRRP que incluye la secuencia del punto 28.
- 35 Punto 33: Un virus del SRRP que incluye la secuencia del punto 29.
- Punto 34: El virus del punto 33, estando dicho virus atenuado por el procedimiento del punto 1.
- Punto 35: El virus del punto 33, habiéndose pasado dicho virus un mínimo de 200 veces en cultivo celular.
- Punto 36: El virus del punto 33, estando dicho virus sustancialmente atenuado.
- Punto 37: El virus del punto 33, siendo dicho virus sustancialmente avirulento.

Punto 38: El virus del punto 33, siendo dicho virus capaz de generar respuestas de anticuerpos en ganado porcino.

Punto 39: El virus del punto 38, siendo dicha respuesta de anticuerpos específica para cepas de virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.

Punto 40: Una vacuna que comprende la secuencia de ADN del punto 29.

5 Punto 41: La vacuna del punto 40, que además comprende un agente vehículo farmacológicamente compatible.

Punto 42: La vacuna del punto 40, siendo dicho vacuna capaz de generar respuestas de anticuerpos en un animal huésped.

Punto 43: La vacuna del punto 42, incluyendo dicho animal huésped ganado porcino.

10 Punto 44: La vacuna del punto 43, siendo dicha respuesta de anticuerpos específica para cepas de virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.

Punto 45: La vacuna del punto 44, incluyendo dichas cepas cepas del síndrome respiratorio y reproductivo porcino atípicas.

Punto 46: La secuencia de ADN del punto 29, confiriendo la administración de dicha secuencia a un animal huésped inmunidad eficaz.

15

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MENGELING, WILLIAMS L.

VORWALD, ANN

20 LAGER, KELLY

ROOF, MIKE

BURKHART, KELLY

GORCYCA, DAVID E

25 <120> VACUNA CONTRA EL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO BASADA EN AISLADO JA-142

<130> 27093a

30 <140>

<141>

<150> 09/298.110

<151> 22-04-1999

35

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

5 <211> 15424

<212> ADN

<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

<400> 1

10

```

tcgcccgggc aggtggtggc tctatgcctt ggcatttgta ttgtcaggag ctgcgaccat 60
tggcacagcc caaaactagc tgcacagaaa acgcccttct gtgacagccc tcttcagggg 120
agcttagggg tctgtcccta gcaccttgc tccggagttg cactgcttta cggctctctc 180
aaccctttaa ccatgtctgg gatacttgat cgggtgcacgt gcacccccaa tgccaggggtg 240
tttatggcgg agggccaagt ctactgcaca cgatgtctca gtgcacggtc tctccttctc 300
ctgaatctcc aagttcctga gcttggagtg ctgggcctat ttacaggcc cgaagagcca 360
ctccgggtgga cgttgcccacg tgcattcccc actggtgagt gctccccgc cggggcctgc 420
tggctttctg cgatctttcc aattgcacga atgaccagtg gaaacctgaa ctttcaacaa 480
agaatggtgc gggtcgcagc tgagatttac agagccggcc agctcacccc tgcagtcttg 540
aaggctctac aagtttatga acggggttgc cgctggtacc ctatagtcgg acctgtccct 600
ggagtggccg attttgccaa ctccctacat gtgagtgata aacctttccc gggagcaact 660
catgtgctaa ccaacctgcc actcccagag aggcctaagc 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 agccccggg agtgggtgtct ctatgcgggg cgagtgccca 960
cacggctgtc tccccgctaa tactgtccct gaaggtaact gctggtggcg cttgtttgac 1020
tcgctcccac tggacgttca gaacaaagaa attegccgtg ccaaccaatt cggctatcaa 1080
accaagcatg gtgtcgctgg caagtaccta caacggaggc tgcaagctaa tggctcctcga 1140
gcagtgactg atacagatgg acccattgtc gtacagtatt tctctgtag ggagagctgg 1200
atccgccact tcagactggc ggaagagcct agcctcctg ggtttgaaga cctcctcaga 1260
ataagggtag agcccaatac gtcgccattg agtgacaagg gtggaaaaat cttccggttt 1320
ggcagtcaca aatggtacgg tgctggaaag agagcaagga aagcacgctc tggatgacc 1380
accacagtgc ctcaccgcgc cttgcccgtc cgtgaaatcc agcaagccaa aaagcacgag 1440

```

ES 2 388 909 T3

gatgccggcg ctgataaggc tgtgcatctc aggcactatt ctccgcctgc cgacgggaac 1500
tgtggttggc actgcatttc cgccatcgcc aaccgaatgg tgaattccaa atttgaaact 1560
actcttcccc agaggggtgag accttcagat gactgggcta ctgacgagga ccttgtgaac 1620
accatccaaa ttctcaagct ccctgcggcc ttggacagga acggtgcttg tgttggcgcc 1680
aaatacgtgc ttaagctgga aggcgagcat tggactgtct ctgtgacct tgggatgtcc 1740
ccttctttgc tcccccttga atgtgttcag ggctgttgtg agcataagag cggacttggg 1800
ccccagatg cggtcgaagt ttctggattt gacctgcct gccttgaccg actggctgag 1860
gtaatgcact tgcttagcag tgtcatccca gctgctctgg ccgaaatgtc cggcgacccc 1920
aaccgtccgg cttccccggg cactactgtg tggactgttt cacaattctt tgcccgccac 1980
agaggaggag agcaccctga tcaggtgcgc ttaggaaaaa tcatcagcct ttgtcaagtt 2040
gttgaggaat gctgttgcca tcagaataaa accaaccggg ccaccccgga agaggttgcg 2100
gcaaggattg atcagtacct ccattggtgca acaagtcttg aagaatgctt gattaggtct 2160
gagagggttt gcccgcagag cgctgcgga accttctttg attggaatgt tgtgctccct 2220
ggggttgggg cttcaactca gacaaccaa cagctccatg tcaaccagtg ccgcgctctg 2280
gttctgtgctg tgactcaaga gcctttggac aaagaccag tccctctgac cgccttctcg 2340
ctgtccaatt gctactatcc tgcacaaggt gacgaggttc gtcaccgtga gaggctaaac 2400
tccgtactct ctaagctgga gggggttgtt cgtgaggaat atgggctcac gccaaactgga 2460
cctggccccg cagccgcact accgaacggg ctctgcgaac ttaaagacca gatggaggag 2520
gatctgctaa aactagtcaa cgcccaggca acttcagaaa tgatggcctg ggcagccgag 2580
caggttgatc tgaaagcttg ggtcaaaaac taccacggg ggacaccgtc acccctcca 2640
ccaagagttc agcctcgaaa aacaaagcct gtcaagagct tgccagggaa caaacctgtc 2700
cccgtccac gcaggaaggt cagatctgat tgtggcagcc cgatttcgat gggcgacaat 2760
gttctgtgacg gtccggaaga tttgactgtt ggtggcccc ttgatcttcc gacaccatcc 2820
gagccgatga cacctctgag tgagcctgca cctatgcccg cgttgcaata tatttctagg 2880
ccagtgcacac ctttgagtgt gctggcccca gtacctgcac cgcgtagaac tgtgtcccga 2940
ccggtgacgc ccttgagtga gccaattttt gtgtctgcac cgcgacacaa atttcagcag 3000
gtggaagaag cgaatctggc ggcaacaatg ctgacgcacc aggacgaacc tctagatttg 3060
tctgcatcct cacagactga atatgaggct tctcccctaa caccactgca gaacatgggt 3120
attctggagg tgggggggca agaagctgag gaagttctga gtgaaaactc ggatacactg 3180
aatgacatca accctgcacc tgtgtcatca agcagctccc tgtcaagtgt taagatcaca 3240
cgcccaaaa actctgctca agccatcatt gactcgggag ggccctgcag tgggcatctc 3300
cgaaagggaa aagaagcatg cctcagcatc atgctgagg cttgtgatgc ggctaagctt 3360
agtgcaccct ccacgcagga atggctttct cgcagtggg ataggggtga tatgctgact 3420
tggcgcaaca ctctgctta ccaggcttc ccatcttag atggtaggtt ttagtctctc 3480
ccaaagatga tactcgagac accgcccggg taccctgtg ggtttgtgat gctgctcgc 3540
acgcctgcac cttcctgtgg tgagagagt gacctacca ttggttcagt cgccactgaa 3600
gatgttccac gcatectcgg gaaaatagaa aacgcccggc agatgcccaa ccaggggctc 3660
ttgacatcct tcggggaaga accggtgtgc gaccaacctg tcaaggactc ctggatgtcg 3720
tcgccccggg ttgacgagag cacaacggct ccgtccgtg gtacaggtgg tgctgactta 3780
cccaccgatt tgccaccttc agatggtttg gatgcccagc agtgggggcc gttacggacg 3840
gtaagaaaga aagctgaaag gctcttcgac caattgagcc gtcaggtttt taacctcgtc 3900
tccatctcc ctgttttctt ctcacacctc tcaaatctg acagtggtta ttctccgggt 3960
gattgggggt ttgcagcttt tactttattt tgcctctttt tgtgttacag ctaccattc 4020
tttggttttg ttccccctct ggggtttttt tctgggtctt ctggcgctgt gcgcatgggg 4080
gtttttggct gttggttggc ttttgctgtt ggctgttca agcctgtgtc cgaccagtc 4140
ggcactgctt gtgagtttga ctgcagagag tgtaggaacg tccttcattc ttttgagctt 4200
ctcaaacctt gggaccctgt tcgcagcctt tacatctggc gttgtgggcc ccgtcggctc cggcctgccc 4260
attcttggca ggttactggg cggggcacgc taccatctggc attttttgct tagccttggc 4320
attgttgagc attgtatctt ggctggagct tatgtgcttt ctcaaggtag gtgtaaaaag 4380
tgctggggat cttgtgtaag aactgctcct aatgaaatcg ccttcaacgt gttccctttt 4440
acgcgtgcga ccaggtcgtc actcatcgac ctgtgcgac ggttttgtgc gccaaaaggc 4500
atggacccca ttttctcgc tactgggtgg cgcgggtgct ggaacggccc aagtccatt 4560
gagcaaccct ctgaaaaacc catcgcgttc gccagttgg atgaaaagag gatcacggct 4620
agaactgtgg tcgctcagcc ttatgatcct aaccaagccg taaagtgtt gcgggtgtta 4680
caggcgggtg gggcgatagt ggccgaggca gtcccaaaag tggtaaggt ttccgctatt 4740

ccattccgag ctcccttttt tcccaccgga gtgaagggtg atcctgagtg caggatcgtg 4800
 gtcgaccccg aactttttac tacagctctc cggctctggtt actccaccac aaacctcgtc 4860
 cttggtgtag gggactttgc ccaactgaat ggattaaaaa tcaggcaaat ttccaagccc 4920
 tcgggaggag gcccgcacct cattgctgcc ctgcatggtg cttgctcgat ggcgtgcac 4980
 atgcttgctg gagtttatgt aactgcagtg gggctctgcy gtaccggcac caacgatccg 5040
 tggtgacta acccattcgc cgtccctggc tacggacctg gctccctctg cacgtccaga 5100
 ttgtgcatct cccaacatgg ccttaccctg cccttgacag cacttggtggc aggattcggg 5160
 cttcaggaaa ttgccttagt cgttttgatt ttcgtttcca tcggaggcat ggctcatagg 5220
 ttgagtgtga aggctgatat gctgtgcgtc ttacttgcaa tcgccagcta tgtttgggta 5280
 ccccttacct ggttgctctg tgtgttctc tgcctgggtg gctgggttctc tttgcacct 5340
 ctaccattc tatggttggg gtttttctg atgtctgtaa atatgcctc gggaatctta 5400
 accgtggtgt tattggttgc tctttggctt ctaggcctt atactaatgt tgttggctt 5460
 gttacccct atgatattca ccattacacc aatggcccc gcggtgttgc cgccttggct 5520
 accgcaccag atgggactta cttggccgct gtccgcgcg ctgctgtgac tggccgcacc 5580
 gtgctgttta ccccgctca gcttgggtcc cttcttgagg gcgctttcag aactcgaag 5640
 ccctcactga acaccgtcaa tgtggtcggg tccctcatgg gctctggcgg agtggtcact 5700
 atcgatggga aaattaagtg cgtgactgcc gcacatgtcc ttacgggtaa ttcagccagg 5760
 gtttccgggg tcggctttaa tcaaatgctt gactttgatg taaaagggga cttcgccata 5820
 gctgactgcc cgaattggca aggggtgct cctaagacct aattctgcga ggatggatgg 5880
 actggccgcg cctattggct gacatcctct ggcgtcgaac ccggtgtcat tgggaatgga 5940
 ttgccttct gcttcaccgc gtgcggcgat tccgggtccc cagtgatcac cgaagccggg 6000
 gagcttgcg gcgttcacac aggatcaaac aaacaaggag gaggcattgt tacgcgcccc 6060
 tctggccagt tttgcaatgt ggcacctc aagctgagcg aattaagtga gttctttgct 6120
 ggacctaaagg tcccgcctcg tgatgtgaag gttggcagcc acataattaa agacatatgc 6180
 gaggtacct cagatctttg cgccttgcct gctgccaac ccgaactgga aggaggctc 6240
 tccaccgtcc aacttctgtg tgtgttttct cctctgtgga gaatgatggg acatgcctgg 6300
 acgcccctgg ttgctgttgg gttttttatc ttgaatgagg ttctcccagc tgtactggc 6360
 cggagtgtt tctcctttgg aatgtttgtg ctatcttggc tcacaccatg gtctgcgcaa 6420
 gttctgatga tcaggcttct aacagcagct cttaacagga acagattgtc actcgcctt 6480
 tacagccttg gtgcagcgac cggttttgtc gcagatctgg cggcaactca agggcacccg 6540
 ttgcaggcag taatgaattt aagtacctat gccttctctc ctccgataat ggtcgtgacc 6600
 tcaccagtcc cagtgatgca gtgtggtgtt gtgcacctcc ttgccataat tttgtacttg 6660
 ttaagtacc gctgcctgca caatgtcctt gttggcgatg gtgcttctc tgcggcttc 6720
 ttcttgcgat actttgccga ggggaaattg agggaaaggg tgcgcaatc ctgcgggatg 6780
 aatcatgagt cgctgactgg tgccctcgtc atgagactta atgacgagga cttggatttt 6840
 cttacgaaat ggactgattt taagtgtttt gtttctgcat ccaacatgag gaatgcccg 6900
 ggccagttca tcgaggctgc ctatgctaaa gcacttagaa ttgaacttgc ccagttgggtg 6960
 caggttgata aggttcgagg tactttggcc aaacttgaag cttttgctga taccgtggca 7020
 cccaactct cgcgcgggta cattgttgtt gctcttggcc atacgcctgt tggcgggatc 7080
 ttgcacctaa aggttggtag caccaagcat accctccaag ccattgagac cagagtctt 7140
 gccgggtcca aatgacctg ggcgcgtgtc gttgatccaa cccccacacc cccaccgca 7200
 cccgtgccta tcccccttcc accgaaagt ctggagaatg gtcccacgc ctggggggat 7260
 gaggatcgtt tgaataagaa gaagaggcgc aagatggaag ccgtcggcat cttgttatg 7320
 ggtggaaga aatcagaa attttgggac aagaactccg gtgatgtgtt ttatgaggag 7380
 gtccatgata acacagacgc gtgggagtgc ctcagagtg acaaccctgc cgactttgac 7440
 cctgagaagg gaactctgtg cgggcatact accattgaag ataagactta cagtgtctac 7500
 gctccccat ctggcaagaa attcctggtc cccgcctacc cagagagcaa aaaaaacca 7560
 tgggaagctg cgaagctttc cgtggaacag gcccttggca tgatgaatgt cgacggtgaa 7620
 ctgacagcca aagaagtgga gaaactgaaa agaataattg acaaactcca gggcctgact 7680
 aaggagcagt gtttaaactg ctagccgcca gcgcttgac ccgctgtggt cgcggcggct 7740
 tggttattac tgagacagcg gtaaaaatag tcaaatcca caaccggacc ttcaccctag 7800
 gacctgtgaa tttaaaagtg gccagtgagg ttgagctaaa agacgcggtc gagcataacc 7860
 aacccccgt tgcaagaccg gttgatgggt gtgtgtgct cctgcgctcc gcagttcctt 7920
 cgcttataga cgtcttaatc tccggcgtg atgcatctcc caagttactc gcccgccacg 7980
 ggccgggaaa cactgggatc gatggcacgc tttgggattt tgaggccgag gccactaaa 8040

aggaaattgc actcagtgcg caaataatac aggcttgtga cattagggcg ggcgacgcac 8100
 ctgaaattgg tcttccttat aagctgtacc ctgtcagggg caaccctgag cgggtaaaaag 8160
 gagttttaca gaatacaagg tttggagata taccttataa aacccccagt gacactggaa 8220
 gcccagtgca cgcggctgcc tgctcacgc ccaatgccac tccggtgact gatgggcgct 8280
 ccgtcttggc cacgactatg cctccgggtt ttgagttgta tgtaccgacc attccagcgt 8340
 ctgtccttga ttatcttgat tctaggcctg actgccccaa acagttgaca gagcacggct 8400
 gtgaggacgc cgcattaaga gacctctcca agtatgactt gtccacccaa ggctttgttt 8460
 tacctggagt tcttcgcctt gtgcgtaagt accctgttgc tcatgtgggt aagtgcgccg 8520
 ccgttcatcg gccttccact taccctgcca agaattctat ggctggaata aatgggaaca 8580
 ggttccaac caaggacatc cagagcgtcc ctgaaatcga cgttctgtgc gcacaggccg 8640
 ttcgggaaaa ctggcaaaact gttaccctt gtaccctcaa gaaacagtat tgtgggaaga 8700
 agaagactag gacaatactc ggcaccaata acttcattgc gctggctcac cgggcagcgt 8760
 tgagtgggtg caccagggc ttcataaaaa aggggtttaa ctgcccatt gccctcggtg 8820
 aaaacaaatt taaagagctt cagactccgg tcttaggcag gtgcctttaa gctgatcttg 8880
 catcctgcga tcgctccaca cctgcaattg tccgctgggt tgcgccaat cttctttatg 8940
 aacttgctg tgctgaagag caccagccgt cgtacgtgtt gaactgctgc cacgacctac 9000
 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
 ctcccaccat gccaaaactac cactgggtgg ttgaacatct gaacctgatg ctgggttttc 9300
 agacggacc aaagaagaca gccataacag actcggccatc atttctagge ttaggataa 9360
 taaatggacg ccagctcgtc cctaaccgtg acaggattct cgcggccctc gcctaccata 9420
 tgaaggcaag caatgtctct gaatactacg cctcggcggc tgcgatactc atggacagct 9480
 gtgcttgttt agatgatgat cccgaatggt ttgaagagct tgtagtggg atagcgcagt 9540
 gtgcccgcaa ggacggctac agttttcccg gcccgcgctt cttcttgtcc atgtgggaaa 9600
 aactcagatc caatcatgag ggaagaagt ccagaatgtg cgggtactgc ggggccccgg 9660
 ctccgtacgc cactgcctgt ggcctcgacg tctgtattta ccacaccac ttccaccagc 9720
 attgtccagt catcatctgg tgtggccacc cggctgggtc tgggtcttgt agtgagtgca 9780
 aacccccct agggaaaggc acaagccctc tagatgaggt gttagaaca gtcccgtata 9840
 agcctccacg gactgtaatc atgcatgtgg agcagggctc caccctctt gaccagga 9900
 gataccagac tcgcccgyga ttagtctccg ttaggcgtgg cattagagga aatgagggtg 9960
 atctaccaga cggtgattat gctagcaccg ccctactccc tacttgtaaa gagattaaca 10020
 tggtcgctgt cgcctctaat gtgttgcgca gcaggttcat catcggcccg cctggtgctg 10080
 ggaaaacata ctggctcctt caacaggctc aggatygtga tgccatttac acgccaactc 10140
 accagaccat gctcgatatg attagggctt tggggacgtg ccggttcaac gtcccagcag 10200
 gtacgacgct gaattccct gccccctccc gtaccggccc ttgggttcgc atcctagcctg 10260
 gcggttgggt tccctggcaag aattccttcc tggatgaagc agcgtattgt aatcacctg 10320
 atgtcttgag gcttcttagc aaaactacc tccactgtct gggagatttc aaacaactcc 10380
 acccagtggt ttttgattct cattgctatg tttttgacat catgcctcag actcaactga 10440
 agaccatctg gagatttggg cagaatatct gtgaggccat tcagccagat tacagggaca 10500
 aacttgatc catggtcaac acaaccctg taacctacgt ggaaaaacct gtcaagtatg 10560
 ggcaagtcct cacccttac cacagggacc gagaggacgg cgccatcaca attgactcca 10620
 gtcaaggcgc cacatttgat gtggttacac tgcatttgcc cactaaagat tcaactcaaca 10680
 ggcaaagagc cttgttgcct attaccagg caagacatgc tgtctttgtg tatgaccac 10740
 acaggcaact gcagagcatg tttgatctc ctgcgaaagg cacaccctc aacctcgctg 10800
 tgcaccgtga cgagcagctg atcgtgctag atagaaataa caaagaatgc acggttgctc 10860
 aggctctagg caatggggat aaattcagg ccacagacaa gcgcgttgta gattctctcc 10920
 gcgccatttg tgcagatctg gaagggtcga gctccccgt cccaaggct gcacacaact 10980
 tgggatttta tttctcgctt gatttgacac agtttgctaa actcccggta gaacttgca 11040
 cccactggcc cgtgggtgaca acccagaaca atgaaaagt gccagaccg ttggttgcta 11100
 gccttcgccc cgtccataag tatagccgcg cgtgcatcgg tgccggctac atggtggcc 11160
 cctcagtggt tctgggcacc cctgggggtg tgcatacta tctcaaaaa ttgtcaggg 11220
 gcgaggctca aatgcttccg gagacagtct tcagaccgg ccgaattgag gtgagattgcc 11280
 gtgagtatct cgatgaccgg gagcgagaaa ttgctgagtc cctccccat gctttcattg 11340

ES 2 388 909 T3

gcgacgtcaa aggcactacc gttggaggat gtcaccatgt cacctccaaa taccttccgc 11400
 gcttccttcc caaggaatca gtcgcggtag tccgggttcc aagccccggg aaagccgcaa 11460
 aagcagtttg cacattaaca gatgtgtatc tcccagatct cgaagcttac ctccaccag 11520
 agaccagtc caagtgtctg aaaatgatgt tggacttcaa ggaagtctga ctgatggtct 11580
 ggaaggacaa gacggcctat tttcaacttg aaggccgcca tttcacctgg taccagcttg 11640
 caagctatgc ctctgtacatc cgagttcctg ttaactctac ggtgtatttg gaccctgca 11700
 tgggcccctgc cctttgcaac agaagagttg tccgggtccac tcattgggga gctgacctcg 11760
 cagtcacccc ttatgattac ggtgccaaaa tcacctctgc tagtgacac catggtgaaa 11820
 tggcccctgg gtacaaaatc ctggcgtgcg cggagttctc gcttgacgat ccagtgaggt 11880
 acaaacacac ctggggggtt gaatcggata cagcgtatct gtacgagttc accggaaaacg 11940
 gtgaggactg ggaggattac aatgatgcgt ttcgtgcgcg ccagaaaggg aaaatttata 12000
 aggccactgc caccagcatg aggtttcatt tcccccggg cctgtcatt gaaccaactt 12060
 taggcctgaa ttgaaatgaa atgggggtcca tgcaaagcct ctttgacaaa attggccaac 12120
 ttttcgtgga tgctttcacg gaatttttgg tgtccattgt tgatatcatc atatttttgg 12180
 ccattttgtt tggctttacc atcgtctggct ggctgggtgg cttctgcatc cgattggttt 12240
 gctccgcggt actccgtgcg cgcctacca ttcaccctga gcaattacag aagatcctat 12300
 gaggcctttc tttctcagtg ccagggtggat attcccacct ggggaactag acatcccctg 12360
 gggatgcttt ggcaccataa ggtgtcaacc ctgattgatg aaatggtgtc gcgtcggatg 12420
 taccgacca tggaaaaagc aggacaggct gcctggaaac aggtggtgag cgaggccacg 12480
 ctgtctcgca ttagtggttt ggatgtgggt gctcattttc agcatcttgc cgccattgaa 12540
 gccgagacct gtaaatattt ggctctcgg ctgccatgc tacacaatct gcgcatgaca 12600
 ggtcaaatg taaccatagt gtataatagt actttgaatc aggtgtttgc tatttttcca 12660
 acccctggat cccggccaaa gcttcatgat tttcagcaat ggctaatagc tgtgactcc 12720
 tccatatttt cctccgttgc ggcttctgt actcttttg ttgtgctgtg gttgcggatt 12780
 ccaatgctac gtaactgttt tggtttccgc tggttagggg caatttttcc ttcgaactca 12840
 cggatgaatta cacgggtgtg cgccttgcc tcaccggca agcagccgct gaggtctacg 12900
 aaccaggcag gtctctttgg tgcaggatag ggcattgacc atgtagttag gaagaccatg 12960
 acgatctagg gttcatggtt ccgtctggcc tctccagcga aggccacttg accagtgttt 13020
 acgcctgggt ggcgttctctg tcttccagct acacggcca gttccatccc gagatatttg 13080
 ggatagggaa tgtgagtcaa gtttatgttg acatcaagca ccaattcatc tgcgccgttc 13140
 acgacgggga gaacgccacc ttgcctcgtc atgacaatat ttcagccgta tatcagacct 13200
 actaccaaca tcaagtogac ggcggcaatt ggtttcacct agaatggctg cgccttctt 13260
 tttcctcttg gttggtttta aatgtttctt ggtttctcag gcgttcgcct gcaagccatg 13320
 tttcagttca agtctttcgg acatcaaaac caacacaacc gcagcatcag gctttgttgt 13380
 cctccaggac atcagctgcc ttaggcatgg cgactcgtcc tctcagacga ttcgcaaaaag 13440
 ctctcagtg cgcgcggcga tagggacgcc cgtgtacatc actgtcacag ccaatgtcac 13500
 agatgagaat tatttacatt cttctgatct ccttatgctt tcttcttgcc ttttctatgc 13560
 ttctgagatg agtgaaaagg gattcaagggt gatgtttggc aatgtgtcag gcatcgtggc 13620
 tgtgtgtgtc aactttacca gctacgtcca acatgtcaag gagtttacc aacgctcctt 13680
 ggtggtcgat catgtgcggc tgctccattt catgacacct gagaccatga ggtgggcaac 13740
 cgttttagcc tgttttcttg ccatcttact ggcaatttga atgttcaagt atgttgggga 13800
 gatgcttgac cgcgggctgt tgctcogcat tgctttcttt gtgggtgtatc gtgccatttt 13860
 gttttgctgc gctcgtcaac gccaacagca acagcagctc tcactctcag ttaatttaca 13920
 acttgacgct atgtgagctg aatggcacag attggctgaa agacaaattt gattgggcat 13980
 tggagacttt tgtcatcttt cccgtgttga ctacattgt ctcatatagt gcaactacca 14040
 ctaggcattt ccttgacaca gtcgggtctgg ttactgtgtc tactgccggg ttctaccacg 14100
 ggcggtatgt tctgagttag atctacgcgg tctgcgctct ggccgcttg acttgcttctg 14160
 tcattaggct tgcgaagaac tgcattgctt ggcgctactc ttgtaccaga tatactact 14220
 tccttctgga cactaagggc agactctatc gctggcggtc gcccgttatc atagagaaaag 14280
 ggggtaagggt tgaggctgaa ggtcacctga tgcacctcaa aagagttgtg cttgatggtt 14340
 ccgtggcaac ccctttaacc agagtttcag cggaaacaatg gggctcgtct tagacgactt 14400
 ttgctatgat agcacggctc cacaaaagggt gcttttggcg ttttccatta cctacacgcc 14460
 agtgatgata tatgctctaa aggtaagtcg cggccgactt ttagggcttc tgcacctttt 14520
 gatctttctg aattgtactt ttacctctgg gtacatgaca tgcgtgact ttaatagcac 14580
 aaataaggct gcgctcacta tgggagcagt agttgcactt ctttgggggg tgtactcagc 14640

ES 2 388 909 T3

```
catagaaacc  tggaagttca  tcacctccag  atgtcgtttg  tgcttgctag  gccgcaagta  14700
cattctggcc  cccgcccacc  acgtcgaaag  tgccgcgggc  tttcatccga  tcgchgcaaa  14760
tgataaccac  gcatttgctg  tccggcgtcc  cggctccact  acggttaacg  gcacattggt  14820
gcccgggttg  aaaagcctcg  tgttgggtgg  cagaaaagct  gttaaacagg  gagtggtaaa  14880
ccttgtcaaa  tatgccaaat  aacaacggca  agcagcaaaa  gaaaaagagg  gggaatggcc  14940
agccagtcaa  tcagctgtgc  cagatgctgg  gtaagatcat  cgcccagcaa  aaccagtcca  15000
gaggcaaggg  accggggaag  aaaattaaga  ataaaaacc  ggagaagccc  cttttctctc  15060
tagcgactga  agatgacgtc  aggcactact  tcaccctag  tgagcggcaa  ttgtgtctgt  15120
cgtcgatcca  gactgccttt  aaccagggcg  ctggaacctg  taccctatca  gattcaggta  15180
ggataagtta  cactgtggag  tttagtttgc  cgacgcatca  tactgtgctg  ctgatccgcg  15240
tcacagcgcc  atcatcagcg  taatgggctg  gcattcctta  agcacctcag  tgttagaatt  15300
ggaagaatgt  gtggtgaatg  gcactgattg  gcactgtgcc  tctaagtcac  ctattcaatt  15360
agggcgaccg  tgtgggggtt  aagttaatt  ggcgagaacc  atgcggccga  aattaaanaa  15420
aaaa                                             15424
```

<210> 2

<211> 15424

<212> ADN

5 <213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

<400> 2

ES 2 388 909 T3

tcgccccgggc	aggtggtggc	tctatgcctt	ggcatttgta	ttgtcaggag	ctgcgaccat	60
tggtacagcc	caaaaactagc	tgcacagaaa	acgcccttct	gtgacagccc	tcttcagggg	120
agcttagggg	tctgtcccta	gcaccttget	tccggagttg	cactgcttta	cggctctctc	180
aaccctttaa	ccatgtctgg	gatacttgat	cgggtgcacgt	gcacccccaa	tgccaggggtg	240
tttatggcgg	agggccaagt	ctactgcaca	cgatgtctca	gtgcacggtc	tctccttctc	300
ctgaatctcc	aagttcctga	gcttggagtg	ctgggcctat	tttacaggcc	cgaagagcca	360
ctccgggtgga	cgttgccacg	tgcatcccc	actgttgagt	gctccccgc	cggggcctgc	420
tggctttctg	cgatctttcc	aattgcacga	atgaccagtg	gaaacctgaa	ctttcaacaa	480
agaatgggtgc	gggtcgcagc	tgagatttac	agagccggcc	agctcacccc	tgacgtcttg	540
aaggctctac	aagtttatga	acgggggttg	cgctgggtacc	ctatagtcgg	acctgtccct	600
ggagtggccg	tttttgccaa	ctccctacat	gtgagtgata	aacctttccc	gggagcaact	660
catgtgctaa	ccaacctgcc	actcccgag	aggcctaagc	ctgaagactt	ttgccctttt	720
gagtgtgcta	tggctgacgt	ctatgatatt	ggtcatggcg	ccgtcatgta	tgtggccaaa	780
gggaaagtct	cctgggcccc	tcgtggcggg	gatgagcgga	aatttgaaac	tgtccctagg	840
gagttgaagt	tgatcgcgaa	ccaactccac	atctccttcc	cgccccacca	cgcagtggtg	900
atgtctaagt	ttgtgttcat	agccccctgg	agtgggtctc	ctatgcgggt	cgagtgccca	960
cacggctgtc	tccccgctaa	tactgtccct	gaaggtaact	gctgggtggcg	cttgtttgac	1020
tcgctcccac	tggacgttca	gaacaaagaa	atcgcctgtg	ccaaccaatt	cggctatcaa	1080
accaagcatg	gtgtcgctgg	caagtaccta	caacggaggc	tgcaagctaa	tggctctccga	1140
gcagtgactg	atacagatgg	accattgtc	gtacagtatt	tctctgttag	ggagagctgg	1200
atccgccact	tcagactggc	ggaagagcct	agcctccctg	ggtttgaaga	cctcctcaga	1260
ataagggtag	agcccaatac	gtcgccattg	agtgacaagg	gtggaaaaat	cttccggttt	1320
ggcagtcaca	aatggtacgg	tgctggaaag	agagcaagga	aagcacgctc	tggtatgacc	1380
accacagtgc	ctcaccgcgc	cttgcccgtc	cgtgaaatcc	agcaagccaa	aaagcacgag	1440
gatgccggcg	ctgataaggc	tgtgcatctc	aggcactatt	ctccgcctgc	cgacgggaac	1500
tgtggttggc	actgcatttc	cgccatcgcc	aaccgaatgg	tgaattccaa	atttgaaact	1560
actcttcccg	agaggggtgag	accttcagat	gactgggcta	ctgacgagga	ccttgtgaac	1620
accatccaaa	ttctcaagct	ccctgcggcc	ttggacagga	acggtgcttg	tgttggcgcc	1680
aaatacgtgc	ttaagctgga	aggcgagcat	tggactgtct	ctgtgaccct	tgggatgtcc	1740
ccttctttgc	tcccccttga	atgtgttcag	ggctgttgtg	agcataagag	cggacttggg	1800
ccccagatg	cggtcgaagt	tttcggattt	gacctgcct	gccttgaccg	actggctgag	1860
gtaatgcact	tgctagcag	tgcatocca	gctgctctgg	ccgaaatgtc	cggcgacccc	1920
aactgtccgg	cttccccggg	cactactgtg	tggactgttt	cacaattctt	tgccccccac	1980

agaggaggag agcaccctga tcaggtgctc ttaggaaaa tcatcagcct ttgtcaagtt 2040
 gttgaggaat gctggtgcca tcagaataaa accaaccggg ccaccccgga agaggttgcg 2100
 gcaaggattg atcagtacct ccatggtgca acaagtcttg aagaatgctt gattaggtct 2160
 gagagggttt gcccgccgag cgctgctgac accttctttg attggaatgt tgtgctccct 2220
 ggggttgggg cttcaactca gacaaccaa cagctccatg tcaaccagtg ccgcgctctg 2280
 gttcctgtcg tgactcaaga gcctttggac aaagactcag tccctctgac cgcttctctg 2340
 ctgtccaatt gctactatcc tgacaaagt gacgaggttc gtcaccgtga gaggctaac 2400
 tccgtactct ctaagctgga ggggttgtt cgtgaggaat atgggctcac gccactgaa 2460
 cctggcccg caccgcact accgaacggg ctgctgaaac ttaaagacca gatggaggag 2520
 gatctgctga aactagtcaa cgcccaggca acttcagaaa tgatggcctg ggcccgag 2580
 caggttgatc taaaagcttg ggtcaaaaac taccacggt ggacaccgcc accccctcca 2640
 ccaagagttc agcctcgaac aacaaagtct gtcaagagct tgccagggaa caaacctgtc 2700
 cccgctccac gcaggaaggt cagatctgat tgtggcagcc cgatthttgat gggcgacaat 2760
 gttcctgacg gtcgggaaga tttgactgtt ggtggccccc ttgatctttc gacaccatcc 2820
 gagccgatga cacctctgag tgagcctgca cttatgcccc cgttgcaata ttttctagg 2880
 ccagtgcacat ctttgagtgt gctggcccca gttcctgcac cgctagaac tgtgtcccga 2940
 ccggtgacgc ccttgagtga gccaatthtt gtgtctgcac cgcgacacaa atttcagcag 3000
 gtggaagaag cgaatctggc ggcaacaacg ctgacgcacc aggacgaacc tctagatttg 3060
 tctgcatcct cacagactga atatgaggct tctcccctaa caccactgca gaacatgggt 3120
 atctctggagg tgggggggca agaagctgag gaagttctga gtgaaatctc ggatacactg 3180
 aatgacatca accctgcacc tgtgtcatca agcagctccc tgtcaagtgt taagatcaca 3240
 cgcccaaaac actctgctca agccatcatt gactcgggcg ggcctgcaag tgggcatctc 3300
 cgaagggaaa aagaagcatg cctcagcatc atgctgagg cttgtgatgc ggctaagctt 3360
 agtgaccctg ccacgcagga atggctttct cgcatgtggg atagggttga catgctgact 3420
 tggcgcaaca cgtctgctta ccaggcgttc cgcactctag atggtagggt tgagtthctc 3480
 ccaaagatga tactcgagac accgcccgcc taccctgttg ggtttgtgat gctgctcac 3540
 acgctgcac cttccgtggg tgacagaggt gaccttacca ttggttcagt cgccactgaa 3600
 gatgttccac gcatcctcgg gaaaatagaa aacgcccggc agatgccca ccaggggctc 3660
 ttgacatcct tcggggaaga accggtgtgc gaccaacctg tcaaggactc ctggatgtcg 3720
 tcgccccggg ttgacgagag cacaacggct ccgtccgctg gtacaggtgg tgctgactta 3780
 cccaccgatt tgccaccttc agatggtttg gatgcccagc agtggggggc gttaccggagc 3840
 gtaagaaaga aagctgaaag gctcttcgac caattgagcc gtcaggtttt taacctcgtc 3900
 tcccatctcc ctgthttctt ctcacacctc ttcaaactc acagtgtta ttctccgggt 3960
 gattgggggt ttgcagcttt tactttattt tgcctctttt tgtgttacag ctaccattc 4020
 tttggthttg tccccctctt ggggtgtttt tctgggtctt ctggcgtgt gcgcatggg 4080
 gthtttggt gttggttggc thttgctgtt ggcctgttca agcctgtgtc cgaccagtc 4140
 ggcactgctt gtgagthtga ctgcagagag ttaggaacg tcttctattc thttgactt 4200
 ctcaaacctt gggacctgt tcgcagcctt gttgtgggccc ccgtcgtct cggccttgc 4260
 attcttggca ggttactggg cggggcacgc tacatctggc atthtttgct taggcttggc 4320
 attgttgcag attgtatctt ggctggaget tatgtcttt ctcaaggtag gtgtaaaaag 4380
 tgctggggat cttgtgtaag aactgctcct aatgaaatcg cttcaacgt gttcccttt 4440
 acgctgctga ccaggtcgtc actcatcgac ctgtgcgatc ggtthttgtgc gccaaaaggc 4500
 atggacccca thttctctgc tactgggtgg cgcggtgct ggaccggccg aagtcctatt 4560
 gagcaacctt ctgaaaaacc catcgcgttc gccagttgg atgaaaagag gattacggct 4620
 agaactgtgg gcgctcagcc ttatgatcct aaccaagccg taaagtgtt gcgggtgta 4680
 caggcgggtg gggcgatagt ggccgaggca gtcccaaaag tggtaaggt thccgctatt 4740
 ccattccgag ctccccthtt tcccaccgga gtgaaggtt atcctgagtg caggatcgtg 4800
 gtcgaccccg acactthttac tacagctctc cggctgggtt actccaccac aaacctcgtc 4860
 cttggtgtgg gggactthtgc ccaactgaat ggattaaaaa tcaggcaaat thccaagccc 4920
 tcgggaggag gcccgcacct cattgtctgc ctgcatgttg cttgctcgat ggcgttgcac 4980
 atgcttgcct gagthttatg aactgcagtg gggcttctgc gtaccggcac caacgatccg 5040
 tgggtgacta acccattcgc cgtccctggc tacggacctg gctccctctg cacgtccaga 5100
 ttgtgcatct cccaacatgg cttaccctg cccttgacag cacttgtggc aggatccggt 5160
 cttcaggaaa ttgccctagt cgtthttgatt thcgtthcca tcggaggcat ggctcatagg 5220
 ttgagttgta aggctgatat gctgtgcgtc thacttgcaa tcgccagcta tgtttgggta 5280

ccccttacct ggttgctctg tgtgtttcct tgctgggtgc gctggttctc tttgcaccct 5340
 ctaccattc tatggttggt gtttttcttg atgtctgtaa atatgccttc gggaatctta 5400
 accgtggtgt tattggttgc tctttggctt ctaggccgtt aactaatgt tgttggctct 5460
 gttaccccct atgatattca tcattacacc aatggcccc gcggtgttgc cgccttggct 5520
 accgcaccag atgggactta cttggccgct gtccgccgcg ctgctttgac tggccgcacc 5580
 gtgctgttta ccccgctca gcttgggtcc cttcttgagg gcgctttcag aactcgaaag 5640
 ccctcactga acaccgtcaa tgtggctggg tcctccatgg gctctggcgg agtgttcaact 5700
 atcgatggga aaattaagtg cgtgactgcc gcacatgtcc ttacgggtaa ttcagccagg 5760
 gttccgggg tggcttcaa tcaaagtctt gactttgatg taaaagggga cttcgccata 5820
 gctgattgcc cgaattggca aggggctgct cctaagacc aattctgca ggtggatga 5880
 actggccgcg cctattggct gacatcctct ggcgtcgaac ccggtgtcat tgggaatgga 5940
 ttcgcttct gcttcaccgc gtgcccgat tccgggtccc cagtgatcac cgaagccggt 6000
 gagctgtcg gcgttcacac aggatcaaac aaacaaggag gaggcattgt tacgcgcccc 6060
 tctggccagt tttgcaatgt ggcacccatc aagctgagcg aattaagtga gttctttgct 6120
 ggacctaagg tcccgtcgg tgatgtgaag gttggcagcc acataattaa agacatatgc 6180
 gaggtaacct cagatctttg cgccttgcct gctgccaaac ccgaactgga agggggcctc 6240
 tccaccgtcc aacttctgtg tgtgtttttc ctctgtgga gaatgatggg acatgcctgg 6300
 acgcccctgg ttgctgttgg gttttttatc ttgaatgagg ttctcccagc tgtactggtc 6360
 cggagtgtt tctcctttgg aatgtttgtg ctatcttggc tcacaccatg gtctgcgcaa 6420
 gttctgatga tcaggcttct aacagcagct ctaacagga acagattgtc actcgccttt 6480
 tacagccttg gtgcagcgc cggttttgtc gcagatctgg cggcaactca agggcaccgc 6540
 ttgcaggcag taatgaattt aagtacctat gcctcctgc ctcgataat ggtcgtgacc 6600
 tcaccagtcc cagtgttgc gtgtggtgtt gtgcacctcc ttgccataat tttgtacttg 6660
 ttaagtacc gctgcctgca caatgtcctt gttggcgatg gtgcttctc tgcgggtttc 6720
 ttcttgcgat actttgcccga ggggaaattg atgagactta atgagagga cttggatttt 6780
 aatcatgagt cgctgactgg tgcctcctt atgagactta atgagagga cttggatttt 6840
 cttaacgaaat ggactgattt taagtgtttt gttcttgcac ccaacatgag gaatgcccgc 6900
 ggccagttca tcgaggctgc ctatgctaaa gcacttagaa ttgaaactgc ccagttggtg 6960
 caggttgata aggttcgagg tactttggcc aaacttgaag cttttgctga taccgtggca 7020
 cccaactct cgcgggtga cattgttgtt gctcttggcc atacgctgt tggcgggatc 7080
 ttcgacctaa aggttggtag caccaagcat accctccaag ccattgagac cagagttctt 7140
 gccgggtcca aaatgaccgt ggcgcgtgtc gttgatccaa cccccacacc cccaccgcga 7200
 cccgtgccta tcccccttc accgaaagt ctggagaatg gtoccaacgc ctggggggat 7260
 gaggatcgtt tgaataagaa gaagaggcgc aggatggaag ccgtcggcat ctttgttatg 7320
 ggtggaaga aatatcagaa attttgggac aagaactccg gtgatgtgtt ttatgaggag 7380
 gtccatgata acacagacgc gtgggagtgc ctgagattg acaaccctgc cgactttgac 7440
 cctgagaagg gaactctgtg cgggcatact accattgaag ataagactta cagtgtctac 7500
 gcctccccat ctggcaagaa attcctggct cccgtctacc cagagagcaa aaaaaacca 7560
 tgggaagctg cgaagctttc cgtggaacag gcccttggca tgatgaatgt cgacggtgaa 7620
 ctgacagcca aagaagtgga gaaactgaaa agaataattg acaaactcca ggcctgact 7680
 aaggagcagt gtttaactg ctagccgcca gcggcttgac ccgctgtggt cgcggcggct 7740
 tggttgttac tgagacagcg gtaaaaatag tcaaatttca caaccggacc ttcaccctag 7800
 gacctgtgaa tttaaaagt gccagtgagg ttgagctaaa agacgcggtc gagcataacc 7860
 aacaccgggt tgcaagacc gttgatggtg gtgttgtgct cctgcgctcc gcagttcctt 7920
 cgcttataga cgtcttaatc tccggcgtg atgcatctcc caagttactc gcccgccag 7980
 ggccgggaaa cactgggatc gatggcacgc tttgggattt tgaggccgag gccactaaag 8040
 aggaaattgc actcagtgcg caaataatac aggcctgtga cattaggcgc ggcgacgcac 8100
 ctgaaattgg tcttccttat aagctgtacc ctgtcagggg caaccctgag cgggtaaaag 8160
 gatttttaca gaatacaagg tttggagaca taccttataa aaccctcagt gacactggaa 8220
 gccagtgca cgcggctgcc tgctcagc ccaatgccac tccggtgact gatgggcgct 8280
 ccgtcttggc cagactatg ccctccggtt ttgagttgta tgtaccgacc attccagcgt 8340
 ctgctcttga ttactttgat tctaggcctg actgccccaa acagttgaca gagcagcgt 8400
 gtgaggacgc cgcattaaga gacctcca agctgactt gtcacccaa ggcctttgtt 8460
 tacctggagt tcttcgctt gtgcgtaagt accctgttgc tcatgtgggt aagtgccgc 8520
 ccgttcatcg gccttcact taccctgcca agaattctat ggctggaata aatgggaaca 8580

ES 2 388 909 T3

ggtttccaac caaggacatc cagagcgtcc ctgaaatcga cgttctgtgc gcacaggccg 8640
 tgcgggaaaa ctggcaaact gttaccctt gtaccctcaa gaaacagtat tgtgggaaga 8700
 agaagactag gacaatactc ggcaccaata acttcattgc gctggccac cgggcagcgt 8760
 tgagtgggtg caccagggc ttcataaaaa aggcgttaa ctcgccatt gccctcggt 8820
 aaaacaaatt taaagagctt cagactccgg tcttaggcag gtgcctgaa gctgatcttg 8880
 catcctgcga tcgctccaca cctgcaattg tccgctggt tgccgcaat cttctttatg 8940
 aacttgctg tgctgaagag cacctgccgt cgtacgtgt gaactgctgc cacgacctac 9000
 tggtcacgca gtccggcgca gtaactaaga gagtgccct gtcgtctggc gacccgatca 9060
 cttctgtgtc caacaccatt tacagcttgg tgatataatg acaacacatg gtgctcagtt 9120
 actttaaaag tggtcaccct catggccttc tgtttctaca agaccagctg aagtttgagg 9180
 acatgctcaa ggttcaacc ctgatcgtct attcggacga cctcgtactg tatgccgagt 9240
 ctcccacat gccaaactac cactgggtgg ttgaacatct gaacctgatg ctgggttttc 9300
 agacggacc aaagaagaca gccataacag actcgcctc atttctaggc ttaggataa 9360
 taaatggacg ccagctcgtc cctaaccgtg acaggattct cgcggccctc gcctaccata 9420
 tgaaggcaag caatgtctct gaatactacg cctcggcggc tgcgatactc atggacagct 9480
 gtgcttgttt agagtatgat cccgaatggt ttgaagagct ttagtgggg atagcgcagt 9540
 gtgcccgcaa ggacggctac agttttccc gcccgcctt cttctgtcc atgtgggaaa 9600
 aactcagatc caatcatgag ggaagaagt ccagaatgtg cgggtactgc ggggccccgg 9660
 ctccgtacgc cactgctgt ggcctcgacg tctgtattta ccacaccac tccaccagc 9720
 attgtccagt catcatctgg tgtggccacc cggctggttc tggttcttg agtgagtgc 9780
 aacccccct agggaaaggc acaagccctc tagatgaggt gttagaacaa gtcccgtata 9840
 agcctccacg gactgtaatc atgcatgtgg agcagggtct caccctctt gaccaggca 9900
 gataccagac tcgcccggga ttagtctccg ttaggcgtgg cattagagga aatgaggtt 9960
 atctaccaga cggtgattat gctagaccg ccctactccc tacttgtaa gagattaaca 10020
 tggtegtgt cgctctaatt gtgttgcga gcaggttcat catcggccc cctggtgctc 10080
 ggaaaacata ctggctcctt caacaggtcc aggatggtga tgtcattac gcgccaact 10140
 accagaccat gctcgatag attagggctt tggggcgtg ccggtcaac ccccagcag 10200
 gtacgacgct gcaattccct gccccctccc gtaccgccc ttgggttcgc atcctagccg 10260
 gcggttggtg tctggcaag aattccttcc tggatgaagc agcgtattgt aatcacctg 10320
 atgtcttgag gcttcttagc aaaactacc tcacctgtct gggagatttc aaacaactc 10380
 acccagtggg ttttgattct cattgctatg tttttgacat catgcctcag actcaactga 10440
 agaccatctg gagatttggg cagaatatct gtgatgccat tcagccagat tacagggaca 10500
 aacttgatc catggtcaac acaaccctg taacctacgt ggaaaaacct gtcaagtatg 10560
 ggcaagtcc cacccttac cacagggacc gagaggacgg cgccatcaca attgactcca 10620
 gtcaaggcgc cacatttgat gtggttacac tgcatttgcc cactaaagat tcaactcaaca 10680
 ggcaaagagc ccttggtgct attaccagg caagacatgc tatctttgtg tatgaccac 10740
 acaggcaact gcagagcatg tttgatcttc ctgcgaaagg cacaccctc aacctcgtg 10800
 tgcaccgtga cgagcagctg atcgtgctag atagaaataa caaagaatgc acggttgctc 10860
 aggctctagg caatggggat aaattcagg ccacagacaa gcgcttgta gattctctcc 10920
 gcgccatttg tgcagatctg gaagggtcga gctcccctc cccaaggte gcacacaact 10980
 tgggatttta tttctcgcct gatttgacac agtttgctaa actcccggta gaacttgca 11040
 cccactggcc cgtggtgaca acccagaaca atgaaaagt gccagaccgg ttggttgcta 11100
 gccttcgccc cgtccataag tatagcccg cgtgcatcgg tgccggctac atggtgggccc 11160
 cctcagtggt tctgggcacc cctgggggtg tgcatacta tctcacaana tttgtcaggc 11220
 gcgaggctca aatgcttccg gagacagctc tcagaccgg ccgaattgag gtagattgccc 11280
 gtgagtatct tgatgaccgg gagcgagaaa ttgctgagtc cctccccat gctttcattg 11340
 gcgacgtcaa aggcactacc gttggaggat gtcaccatgt cacctcaaaa taccttccgc 11400
 gcttccctcc caaggaatca gtccgggtag tccgggtttc aagccccggg aaagccgcaa 11460
 aagcagtttg cacattaaca gatgtgtatc tcccagatct cgaagcttac ctccaccag 11520
 agaccagtc caagtgtgg aaaatgatgt tggacttcaa ggaagttcga ctgatggtct 11580
 ggaaggacaa gacggcctat tttcaacttg aaggccgcca tttcacctgg taccagctt 11640
 caagctatgc ctcgtaacac cgagttctc ttaactctac ggtgtatttg gaccctgca 11700
 tgggcccctg cctttgcaac agaagagttg tccgggtccac tcattgggga gctgacctc 11760
 cagtcacccc ttatgattac ggtgccaaaa tcatcctgct tagtgatac catggtgaaa 11820
 tgccccctgg gtacaaaatc ctggcgtgcg cggagttctc gcttgacgat ccagtgaggt 11880

ES 2 388 909 T3

acaaacacac ctgggggttt gaatcggata cagcgtatct gtacgagttc accggaaacg 11940
 gtgaggactg ggaggattac aatgatgcgt ttcgtgcgcg ccagaaaggg aaaatttata 12000
 aggccactgc caccagcatg aggtttcatt ttccccggg ccctgtcatt gaaccaactt 12060
 taggcctgaa ttgaaatgaa atgggggtcca tgcaaagcct ctttgacaaa attggccaac 12120
 tttttgtgga tgctttcacg gaatttttgg tgtccattgt tgatatcatc atatttttgg 12180
 ccattttggt tggctttacc atcgtctggc ggctgggtgg cttctgcatc cgattgggtt 12240
 gctccgcggt actcgtgcg cgccctacca ttcaccctga gcaattacag aagatcctat 12300
 gaggcctttc tttctcagtg ccagggtggat attcccacct ggggaactag acatcccctg 12360
 gggatgtttt ggcaccataa ggtgtcaacc ctgattgatg aaatgggtgc gcgtcggatg 12420
 taccgcacca tggaaaaagc aggacaggct gcctggaaac aggtgggtgag cgaggccacg 12480
 ctgtctcgca ttagtgggtt ggatgtgggt gctcattttc agcatcttgc cgccattgaa 12540
 gccgagacct gtaaatatth ggctctcgg ctgcccctgc tacacaatct gcgcatgaca 12600
 ggggtcaaat taaccatagt gtataatagt actttgaatc aggtgtttgc tatttttcca 12660
 acccctggat cccggccaaa gcttcatgat tttcagcaat ggctaatagc tgtgactcc 12720
 tccatatttt cctcgttgc ggcttcttgt actctttttg ttgtgctgtg gttgcggtt 12780
 ccaatactac gtactgtttt tggtttccgc tggtagggg caatttttcc ttcgaactca 12840
 cgggtgaatta cacggtgtgt ccgccttgcc taccggca agcagccgct gaggtctacg 12900
 aaccaggcag gtctctttgg tgcaggatag ggcattgacc atgtagttag gacgacctg 12960
 acgatctagg gttcatgggt ccgcctggcc tctccagcga aggccacttg accagtgttt 13020
 acgctggtt ggcgttccctg tcttcagct acacggccca gttccatccc gagatatttg 13080
 ggatagggaa tgtgagtcaa gtttatgttg acatcaagca ccaattcatc tgcgccgtt 13140
 acgacgggga gaacgccacc ttgcctcgtc atgacaatat ttcagccgta tttcagacct 13200
 actaccaaca tcaagtcgac ggcggcaatt ggtttcacct agaatggctg ccccccttct 13260
 tttcctcttg gttggtttta aatgtttctt ggtttctcag gcgttcgctt gcaagccatg 13320
 tttcagttca agtctttcgg acatcaaaa caacactacc gcagcatcag gctttgttgt 13380
 cctccaggac atcagctgcc ttaggcattg cgactctctc tctcagacga tctgcaaaag 13440
 ctctcagtg cgcgcgga tagggacgcc cgtgtacatc actgtcacag ccaatgtcac 13500
 agatgagaat tatttacatt cttctgatct ccttatgctt tcttcttgc ttttctatgc 13560
 ttctgagatg agtgaaaagg gattcaaggt gatatttggc aatgtgtcag gcatcgtggc 13620
 tgtgtgtgtc aactttacca gctacgtcca acatgtcaag gagtttacc aacgctcctt 13680
 ggtggctgat catgtgcggc tgetccattt catgacacct gagacctga ggtgggcaac 13740
 cgttttagcc tgtttttttg ccacttact ggcaatttga atgttcaagt atgttgggga 13800
 gatgcttgac cgcgggctgt tgetcgcgat tgetttctt gtgggtgtatc gtgccatttt 13860
 gttttgctgc gctcgtcaac gccaacagca acagcagctc tcatcttcag ttgatttaca 13920
 acttgacgct atgtgagctg aatggcacag attggctgaa agacaaattt gattgggcag 13980
 tggagacttt tgtcatcttt cccgtgttga ctcacattgt ctcatatggt gcaactacca 14040
 ctaggcattt ccttgacaca gtcggctctg ttaactgtgtc taccgccggg ttctaccacg 14100
 ggcggtatgt tctgagtagc atctacgagg tctgcgctct ggccgcatg atttgcttctg 14160
 tcattaggct tgcgaagaac tgcattgctt ggcgctactc ttgtaccaga tatactaact 14220
 tccttctgga cactaagggc agactctatc gctggcggtc gcccgttatc atagagaaag 14280
 ggggtaaggt tgaggctgaa ggtcacctga tgcacctcaa aagagttgtg cttgatgggt 14340
 ccgtggcaac ccctttaacc agagtttcag cggacaatg gggctgtctt tagacgactt 14400
 ttgctatgat agcaggctc cacaaaagg gcttttggcg ttttccatta cctacacgcc 14460
 agtgatgata tatgctctaa aggttaagtc cggccgactt ttagggcttc tgcacctttt 14520
 gatctttctg aattgtactt ttacctcgg gtacatgaca ttcgtgcact ttaatagcac 14580
 aaataaggtc gcgctcacta tgggagcagt agttgcactt cttgggggg tgtactcagc 14640
 catagaaacc tgggaagtca tcacctccag atgcccgttg tgcttgctag gccgcaagta 14700
 cattctggcc cccgccacc acgtcgaag tgcgcgggc tttcatccga tgcgggcaaa 14760
 tgataaccac gcatttgtcg tccggcgtcc cggctccact acggttaacg gcacattggt 14820
 gcccggttg aaaagcctcg tgttgggtgg cagaaaagct gttaaacagg gagtggtaaa 14880
 ccttgtcaaa tatgccaaat aacaacggca agcagcaaaa gaaaaagagg gggaatggcc 14940
 agccagtcaa tcagctgtgc cagatgctgg gtaagatcat cccccagcaa aaccagtcca 15000
 gaggcaaggg accggggaag aaaattaaga ataaaaacce ggagaagccc cattttctc 15060
 tagcgactga agatgacgct aggcactcact tacccttag tgagcggcaa ttgtgtctgt 15120
 cgtcgatcca gactgccttt aaccagggcg ctggaacctg taccctatca gattcaggta 15180

ES 2 388 909 T3

```
ggataagtta cactgtggag tttagtttgc cgacgcatca tactgtgcgc ctgatccgcg 15240
tcacagcgcc atcatcagcg taatgggctg gcattcetta agcacctcag tgttagaatt 15300
ggaagaatgt gtggatgaatg gcactgattg gcactgtgcc tctaagtcac ctattcaatt 15360
agggcgaccg tgtggggggt aagtttaatt ggcgagaacc atgcggccga aattaaanaa 15420
aaaa 15424
```

REIVINDICACIONES

1. Un virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (SRRP) que comprende una secuencia representada por SEC ID N°:1 o por una secuencia que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con SEC ID N°:1.
2. El virus de la reivindicación 1, comprendiendo el virus la secuencia representada por SEC ID N°:1.
- 5 3. Un virus del SRRP que tiene el número de acceso ATCC VR-2638.
4. El virus de la reivindicación 1, comprendiendo el virus la secuencia representada por SEC ID N°:2.
5. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, atenuado por un procedimiento para atenuar un virus que incluye las etapas de replicar sucesivamente dicho virus mediante inoculación y replicación del virus en cultivos celulares individuales respectivos hasta lograr la atenuación, retirar las muestras que contienen virus de al menos determinados de dichos cultivos celulares mientras el virus se está replicando a una velocidad logarítmica y antes de la inducción de efectos citopáticos en dichos determinados cultivos celulares e inocular el siguiente pase de cultivo celular respectivo con dichas muestras.
- 10 6. El virus de la reivindicación 5, produciéndose dicha etapa de retirada aproximadamente 24 horas después de la inoculación de dichos cultivos celulares.
- 15 7. El virus de la reivindicación 5, comprendiendo dicho cultivo celular una monocapa de células que tiene una confluencia superior a aproximadamente el 70 %.
8. El virus de la reivindicación 5, que además comprende la etapa de analizar periódicamente dicho virus progenie para evaluar la atenuación.
9. El virus de la reivindicación 5, que además comprende las etapas de conservar dichos determinados cultivos celulares después de dicha etapa de retirada y observar si la inducción de efectos citopáticos tiene lugar en dichos cultivos celulares conservados.
- 20 10. El virus de la reivindicación 5, comprendiendo dicha inoculación el número más pequeño de virus que da como resultado en última instancia ECP.
11. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, habiéndose pasado dicho virus un mínimo de 200 veces en cultivo celular.
- 25 12. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, estando dicho virus atenuado.
13. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, siendo dicho virus avirulento.
14. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, siendo dicho virus capaz de generar respuestas de anticuerpos en ganado porcino.
- 30 15. El virus de la reivindicación 14, siendo dicha respuesta de anticuerpos específica para cepas de virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.
16. El virus del SRRP atenuado de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, obtenido mediante atenuación de un virus que tiene una secuencia de ácido nucleico representada por SEC ID N°:2.
17. Una vacuna que comprende el virus según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 35 18. La vacuna de la reivindicación 17, que además comprende un agente vehículo farmacológicamente compatible.
19. Una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende al menos el 95 % de identidad de secuencia con SEC ID N°:1.
20. Una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia tal como se muestra en SEC ID N°:1.
- 40 21. La vacuna tal como se define en la reivindicación 17 ó 18 para su uso en la inmunización de ganado porcino contra el síndrome respiratorio y reproductivo porcino, en la que dicha inmunización comprende administrar dicha vacuna a dicho ganado porcino.