(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 389 748**

(51) Int. Cl.:
C12N 7/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **08771834 .2**
(96) Fecha de presentación: **24.06.2008**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2181189**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.05.2010**

(54) Título: **Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino de tipo 1 norteamericano recombinante y métodos de uso**

(30) Prioridad:
25.06.2007 US 946080 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.10.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.10.2012

(73) Titular/es:
SOUTH DAKOTA STATE UNIVERSITY (100.0%)
ADM 130 BOX 2201
BROOKINGS, SD 57007-1396, US

(72) Inventor/es:
FANG, YING y
HENNINGS, JANE

(74) Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

ES 2 389 748 T3

DESCRIPCIÓN

Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino de tipo 1 norteamericano recombinante y métodos de uso

Campo técnico

Esta solicitud se refiere al campo de la virología molecular, y más particularmente a la construcción de ácidos nucleicos recombinantes que codifican el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV).

Antecedentes

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es la enfermedad económicamente más importante de los cerdos a nivel mundial. Se caracteriza por insuficiencia reproductiva a largo plazo en cerdas, y neumonía grave en cerdos neonatales. El virus del PRRS (PRRSV) consiste en dos genotipos principales, el genotipo europeo (Tipo 1) y el genotipo norteamericano (Tipo 2), cada uno localizado en otro tiempo en continentes diferentes. Más recientemente, se han identificado aislados del PRRSV del Tipo 1 (Tipo 1 norteamericano) en porquerizos de los Estados Unidos de América. Este grupo de virus posee características antigénicas y genéticas únicas que son distintas del PRRSV de tipo norteamericano y europeo típico. Se ha identificado una supresión única de 51 pb en la región inmunodominante del Nsp2. El agente etiológico de PRRS es un virus pequeño con cubierta, que contiene un genoma de ARN monocatenario positivo. PRRSV pertenece a la familia *Arteriviridae*, que incluye el virus de la artritis equina (EAV), el virus que aumenta la lactato deshidrogenasa (LDV), y el virus de la fiebre hemorrágica de los simios (SHFV) (Snijder y Meulenberg, 1998). Las comparaciones de las secuencias nucleotídicas mostraron que PRRSV se puede dividir en genotipos europeo (Tipo 1) y norteamericano (Tipo 2) distintos (Allende et al., 1999; Nelson et al., 1999).

El genoma del PRRSV tiene una longitud de alrededor de 15 kb, y contiene nueve marcos de lectura abiertos. El extremo 3' del genoma codifica cuatro glucoproteínas asociadas a la membrana (GP2a, GP3, GP4 y GP5; codificadas por ARNm subgenómicos 2-5), dos proteínas de membrana no glucosiladas (E y M; codificadas por ARNm subgenómicos 2 y 6) y una proteína de la nucleocápside (N; codificada por ARNm subgenómico 7) (Bautista et al., 1996; Mardassi et al., 1996; Mcng et al., 1996; Meulenberg &dcn Besten, 1996; Meulenberg et al., 1995; Mounir et al., 1995; Wu et al., 2001, 2005). Los genes asociados a replicasas, ORF1a y ORF1b, situados en el extremo 5' del genoma, representan casi el 75% del genoma vírico. Se predice que la proteína pplab codificada por ORF1ab es escindida en 12 sitios para formar 13 productos: nsp1α, nsp1β, y nsp2 a nsp12 (Allende et al., 1999; den Boon et al., 1995; Nelson et al., 1999; Snijder y Meulenberg, 1998).

Actualmente existen vacunas atenuadas vivas modificadas frente a PRRSV para la reducción de la enfermedad clínica asociada con PRRSV (Boehringer-Ingelheim Animal Health, Inc.). Sin embargo, no se pueden distinguir serológicamente entre cerdos que se han recuperado de una infección natural y aquellos que se han vacunado. Una vacuna genéticamente marcada permitiría la diferenciación entre cerdos vacunados e infectados naturalmente, lo que se necesita para programas de control y erradicación de PRRSV.

Sumario

A título de descripción general, se describe un virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino recombinante (PRRSV) que incluye una o más mutaciones en el marco de lectura abierto (ORF) Ia, siendo las mutaciones tales que el PRRSV recombinante no produce al menos un polipéptido funcional que corresponde a ORFIa. La mutación puede ser una supresión. Una supresión puede estar en la región nsp2, y puede incluir el epítopo ES4. En una realización, la supresión incluye los aminoácidos 736-790 de ORFIa. La mutación puede incluir una inserción de una secuencia de ADN heteróloga. Una inserción puede estar entre los aminoácidos 733 y 734 de ORFIa. La inserción puede incluir la proteína fluorescente verde (GFP).

Se describe una vacuna que incluye un mutante de PRRSV que tiene una mutación en ORFIa, siendo la mutación tal que dicho mutante de PRRSV no produce un polipéptido de ORFIa funcional, y la vacuna incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. La mutación puede incluir una supresión en la región nsp2, tal como una supresión de aminoácidos 736-790 en la región nsp2. La mutación puede incluir una inserción de una secuencia de ADN heteróloga. La inserción puede estar entre los aminoácidos 733 y 734 en la región nsp2.

Se describe un kit que incluye una vacuna que incluye un mutante de PRRSV que tiene una mutación en ORFIa, siendo la mutación tal que dicho mutante de PRRSV no produce un polipéptido de ORFIa funcional, incluyendo la mutación una inserción de una secuencia de ADN heteróloga, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El kit incluye además uno o más primeros polipéptidos codificados por la secuencia de ADN heteróloga, y uno o más segundos polipéptidos codificados por ORFIa funcional. La mutación en la vacuna de PRRSV puede ser una supresión en la región nsp2, tal como en un epítopo ES4, y el uno o más primeros polipéptidos incluyen GFP y el uno o más segundos polipéptidos incluyen el epítopo ES4.

Se proporciona un método para diferenciar un animal vacunado con una vacuna marcadora de PRRSV de un animal infectado naturalmente con PRRSV, en el que la vacuna marcadora de PRRSV comprende un PRRSV recombinante que incluye una mutación de inserción y una mutación de supresión. El método incluye las etapas de proporcionar

una primera proteína de PRRSV recombinante que incluye la mutación de inserción, proporcionar una segunda proteína de PRRSV recombinante que incluye la mutación de supresión, incubar una muestra sérica procedente del animal con las proteínas de PRRSV recombinantes primera y segunda, y detectar la unión de anticuerpos en la muestra con las proteínas de PRRSV recombinantes primera y segunda. La unión de anticuerpos en la muestra con la primera proteína de PRRSV recombinante es indicativa de un animal vacunado, y la unión de anticuerpos en la muestra con la segunda proteína de PRRSV recombinante es indicativa de un animal infectado naturalmente. La primera proteína de PRRSV recombinante puede incluir una inserción de GFP, y la segunda proteína de PRRSV recombinante puede incluir una supresión de ES4.

Frente a este antecedente, la invención se refiere a los siguientes aspectos:

1. Una vacuna frente al virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino de Tipo 1 norteamericano (USIPRRSV), que comprende una secuencia de ácido nucleico recombinante de SEC ID NO: 43.

2. Un método para diferenciar un animal infectado naturalmente con un virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino de Tipo 1 norteamericano (US1 PRRSV) de un animal vacunado con una vacuna marcadora de US1 PRRSV, en el que dicha vacuna marcadora comprende un US1 PRRSV recombinante en el que se ha insertado un antígeno extraño (marcador positivo) y en el que se ha suprimido un epítopo inmunógeno (marcador negativo), comprendiendo el método de diferenciación:

incubar una muestra sérica procedente del animal con una primera proteína de PRRSV recombinante que contiene el marcador positivo, y con una segunda proteína de PRRSV recombinante que carece del epítopo inmunógeno (marcador negativo), y

detectar la unión de anticuerpos en la muestra con las proteínas de PRRSV primera y segunda, en el que la unión de anticuerpos a la proteína que contiene el marcador positivo es indicativa de un animal vacunado, mientras que la unión de anticuerpos a la proteína que contiene el marcador negativo es indicativa de un animal infectado naturalmente.

En una realización preferida, la vacuna marcadora es la vacuna de (1).

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una representación esquemática del genoma de PRRSV y la estrategia de clonación.

Las FIGS. 2A-2F representan el resultado de ensayos de inmunofluorescencia llevados a cabo para investigar la infecciosidad del clon infeccioso pSD01-08.

La FIG. 3 es una gráfica que muestra la cinética de crecimiento de virus clonado, virus progenitor, y virus que expresa GFP.

La FIG. 4 representa patrones de fragmentos de endonucleasas de restricción de los productos de RT-PCR del virus clonado y progenitor SD01-08.

Las FIGS. 5A y 5B son gráficas que muestran la caracterización *in vivo* de virus clonados.

Las FIGS. 6A-6C representan los resultados de ensayos de inmunofluorescencia llevados a cabo para investigar PRRSV que expresa GFP.

La FIG. 7 es una representación esquemática del constructo pSD01-08-GFP.

La FIG. 8 es una representación esquemática del constructo pSD01-08-GFP/ΔES4.

La FIG. 9 es una gráfica que muestra la cinética de crecimiento de los virus marcadores de GFP/ΔES4.

La FIG. 10 representa la morfología de placas de virus marcadores de GFP/ΔES4 y virus progenitores.

La FIG. 11 representa la estabilidad de la expresión de GFP.

La FIG. 12 representa una comparación del gen de GFP de tipo salvaje con un gen de GFP mutado en Arg-97.

La FIG. 13 es una gráfica que representa características *in vivo* del gen marcador de GFP/ΔES4.

Las FIGS. 14A-14C son gráficas que representan propiedades virológicas e inmunológicas del virus marcador de GFP/ΔES4.

Las FIGS. 15A-15C representan resultados de ELISA a base de GFP y del epítopo ES4.

Descripción detallada

Se desarrolló un clon de ADNc de longitud completa, SD01-08, de un aislado de PRRSV de Tipo 1 norteamericano. Cuando se compara con el virus de Lelystad, SD01-08 comparte una identidad del 94,1% a nivel nucleotídico (número de acceso de GenBank DQ489311). Una distinción importante entre SD01-08 y LV es las propiedades de crecimiento en PAMs y células de riñón de mono. Los resultados dados a conocer por Meulenberg et al (15) mostraron que los virus de LV de tipo salvaje y clonados crecieron bien en PAMs, pero hasta niveles bajos en la estirpe celular derivada de MA-104, CL2621. SD01-08 progenitor y clonado crecieron igualmente bien en PAMs y células MARC-145, otra estirpe celular derivada de MA-104. El título de los virus clonados de SD01-08 alcanzó un pico a 48 hpi, mientras que los virus clonados de LV crecieron hasta títulos bajos y no alcanzaron ningún pico incluso a 96 hpi. Por lo tanto, el clon infeccioso de SD01-08 se replica bien en la estirpe celular continua. Otra diferencia entre LV y SD01-08 es en el nivel de virulencia. En PAMs, el virus clonado de LV alcanzó títulos elevados a $10^{7,1}$ a $10^{7,9}$ $TCID_{50}$/ml, y alcanzó un pico a alrededor de 32 hpi. El virus clonado de SD01-08 alcanzó el mismo título que su virus progenitor en PAMs, pero sus títulos fueron ambos menores que los de LV, alcanzando sólo alrededor de 10^4 $TCID_{50}$/ml, y alcanzaron más tarde el pico, a alrededor de 72 hpi. Este resultado sugiere que el virus clonado de SD01-08 es menos virulento que el virus clonado de LV. Esta conclusión está apoyada por observaciones de campo y un estudio experimental de exposición de los animales. SD01-08 no provocó signos clínicos significativos, y sólo se observaron lesiones patológicas leves en los cerdos infectados experimentales. Por el contrario, se informó que LV provoca problemas respiratorios importantes en cerdos y abortos en cerdas (34).

Una de las aplicaciones principales del clon infeccioso es su uso como columna vertebral vírica para construir vacunas manipuladas genéticamente mediante ingeniería. Las actuales vacunas de PRRSV en los Estados Unidos de América se dirigen principalmente a los aislados de Tipo 2 norteamericano. La aparición del PRRSV Tipo 1 norteamericano requiere que las vacunas sean eficaces para ambos genotipos de PRRSV. Un requisito esencial para cualquier vacuna de virus vivo es que sea de baja virulencia, y que no induzca manifestaciones en la enfermedad, o las induzca como mucho de forma muy débil. El virus progenitor, SD01-08, se aisló de un grupo de cerdos que no muestran signos clínicos. Los estudios de patogénesis confirmaron que SD01-08 posee propiedades de baja virulencia en la fase aguda de la enfermedad, lo que sugiere que el clon infeccioso pSD01-08 es una cepa potencial poco virulenta y adecuada para la construcción de vacunas.

Una de las etapas claves en el desarrollo de vacunas es la inclusión de marcadores para la diferenciación diagnóstica de animales vacunados de aquellos que están infectados naturalmente con el virus de tipo salvaje. Las vacunas marcadoras son importantes en programas dirigidos a controlar o erradicar infecciones víricas en animales para alimentación, así como en animales de compañía (Babiuk, 1999; Babiuk et al., 1999, 2002; van Oirschot, 2001). Las vacunas marcadoras del virus del herpes estuvieron entre las primeras que demostraron ser eficaces en el campo (Bosch et al., 1996; van Oirschot et al., 1996), seguido de diversos virus de ARN genéticamente modificados, tales como el virus clásico de la fiebre porcina (Widjojoatmodjo et al., 2000; van Gennip et al., 2002) y el virus de Rinderpest o peste bovina (Walsh et al., 2000). En programas de erradicación de EAV, algunas autoridades legislativas requieren una vacuna marcadora, puesto que los caballos están implicados de forma activa en el comercio y tráfico internacional. La discriminación entre vacunación e infección se está convirtiendo en una cuestión importante (Castillo-Olivares et al., 2003). De forma similar, con un programa de eliminación de PRRSV, en el futuro, el comercio internacional de cerdos y puercos probablemente requerirá una vacuna marcadora. Además, puesto que el mundo se dirige progresivamente a la eliminación de PRRSV, la serovigilancia es una herramienta esencial para verificar el estado de la enfermedad. Las vacunas convencionales actualmente disponibles son incapaces de permitir la diferenciación entre la infección de tipo salvaje y la vacunación. De este modo, la serovigilancia es imposible frente a la vacunación continuada o durante varios meses después de que ha cesado la vacunación. Claramente, una vacuna marcadora sería de gran beneficio.

Para crear un PRRSV recombinante, se usó un clon infeccioso de PRRSV de Tipo 1 norteamericano, pSD01-08. Comparado con un clon infeccioso del virus de Lelystad (LV) europeo, pSD01-08 posee varias propiedades biológicas distintas: (1) el clon infeccioso pSD01-08 derivó de una cepa progenitora aislada en los Estados Unidos de América en el año 2001, que representa un PRRSV Tipo 1 norteamericano; (2) la cepa progenitora SD01-08 se aisló de un grupo de cerdos de 8 semanas que no mostraban signos clínicos, Y (3) SD01-08 posee una supresión de 51 pb única en la región inmunodominante de Nsp2 (Fang et al., 2004).

La nsp2 desempeña un papel en la replicación vírica. La nsp2 contiene un dominio de cisteína proteasa que reside en el N-terminal. Este dominio induce escisión de nsp2/3, y también funciona como un cofactor con una serina proteasa de nsp4 para procesar los otros productos de escisión (Snijder et al., 1994, 1995; Wassenaar et al., 1997). Además de su función en la replicación vírica, se ha demostrado que las cisteína proteasas de nsp2 de EAV y de PRRSV pertenecen a la superfamilia de proteasas de tumor ovárico (OTU). La proteasa de OTU es capaz de desconjugar tanto ubiquitina como ISG 15 de proteínas celulares, que inhiben respuesta inmunitaria innata dependiente de ubiquitina y de ISG 15 (Frias-Staheli et al., 2007).

El desarrollo de la vacuna marcadora se basa en la manipulación de clones infecciosos de ADNc, en los que se puede insertar un antígeno extraño (marcador positivo) o en los que se puede suprimir un epítopo inmunógeno (marcador negativo). La respuesta de anticuerpos al antígeno extraño o al epítopo vírico se puede usar para diferenciar animales vacunados de los animales infectados naturalmente. La nsp2 de PRRSV es un sitio candidato

excelente para la modificación marcadora. La propiedad más importante de nsp2 relacionada con la manipulación del marcador mediante ingeniería es la capacidad de nsp2 de tolerar grandes supresiones e inserciones. Se han dado a conocer inserciones/supresiones de secuencias nucleotídicas en la región central de la proteína (Gao et al., 2004; Shen et al., 2000; Tian et al., 2007; Han et al., 2007). Otra propiedad relacionada con la manipulación del marcador mediante ingeniería es la presencia de varios epítopos inmunodominantes en esta región. Se han identificado seis sitios epitópicos (ES) de células B lineales en la región nsp2 de un virus danés de Tipo 1 (ES2 a ES7) (Oleksiewicz et al., 2001). En el virus de Tipo 2, se ha encontrado que la nsp2 contiene la frecuencia más elevada de epítopos inmunodominantes, cuando se compara con proteínas estructurales (de Lima et al., 2006).

Se prepararon modificaciones marcadoras en la región nsp2 de un clon infeccioso de PRRSV de Tipo 1 norteamericano. Se insertó un marcador positivo, GFP, en la región nsp2, pero el gen de GFP no fue estable. Seguidamente, se suprimió un epítopo tremendamente inmunógeno, ES4, situado en la región nsp2 (aminoácido 736 a 790 de ORF1a), y se sustituyó por el gen de GFP (en el aminoácido 733/734 de ORF1a) usando genética inversa, para crear un marcador negativo. Se caracterizaron las características de replicación *in vitro* y las propiedades biológicas *in vivo* del virus recombinante resultante para determinar su uso potencial como vacuna marcadora frente a la infección por PRRSV. Se llevaron a cabo ELISAs a base del antígeno de GFP y del antígeno peptídico de ES4 para determinar su sensibilidad y especificidad como ensayos de diagnóstico de compañía para la detección y diferenciación de marcadores.

I. Marcador positivo GFP

Células y virus. Se aisló originalmente en 2001 un aislado de PRRSV de Tipo 1 norteamericano, SD01-08, a partir de un grupo de cerdos de 8 semanas de los Estados Unidos de América, que no mostraron signos clínicos de PRRS. Para la transfección inicial para la recuperación de virus a partir de ARN transcrito *in vitro*, se usaron células de riñón de hámster bebé (BHK-21 C 13: American Type Culture Collection). Para el rescate vírico y los experimentos subsiguientes se usaron células MARC-145 (Fang et al., 2006). Las células de macrófagos alveolares porcinos (PAM) se obtuvieron mediante lavado pulmonar de crías de cerdo libres de patógenos específicos libres de PRRSV.

Extracción del ARN, RT-PCR y secuenciación: se infectaron células MARC-145 con virus purificados en placas a una multiplicidad de infección (MOI) de aproximadamente 0,1. Después de tres días, el sobrenadante del cultivo se colocó en capas sobre una almohada de sacarosa 0,5 M y se centrifugó a 100.000 x g durante 14 h en un rotor SW41 (Beckman). Se extrajo ARN del pelete usando un kit de ARN vírico QIAamp (Qiagen). Para obtener la secuencia genómica de longitud completa del virus progenitor, SD01-08, se llevó a cabo la RT-PCR usando una serie de cebadores (Ropp et al., 2004). Cada producto de la RT-PCR se secuenció directamente al menos dos veces desde ambas direcciones para obtener las secuencias de consenso. Para construir el clon infeccioso, se amplificaron mediante RT-PCR nueve fragmentos solapantes (Fig. 1) que cubren el genoma vírico de longitud completa flanqueados por sitios de enzimas de restricción únicos. Los oligonucleótidos directos e inversos para la amplificación mediante RT-PCR se diseñaron inicialmente basándose en la secuencia de LV (número de acceso de GenBank M96262; 18) y más tarde se modificaron para que coincidieran con la secuencia de SD01-08 (Tabla 1). Se llevó a cabo la RT-PCR (Fang et al., 2004). Estos fragmentos amplificados mediante RT-PCR se purificaron en gel y se clonaron en el vector PCR-Blunt II-Topo (Invitrogen). Se secuenciaron tres clones de cada fragmento, y el clon que contiene la secuencia de consenso se usó para el ensamblaje del clon infeccioso.

Tabla 1. Cebadores usados para la amplificación mediante RT-PCR

Cebadores	Secuencias	Posición del genoma
		en SD01-08
Fragmento a		
E4849F	5’ gca tgg ctc tta agg cag ac SEC ID nº 1	4849 - 4868
E7227R	5’ cag ctt caa ggc agt tgt ca SEC ID nº 2	7208 - 7227
Fragmento b		
E7139F	5’ tgt tgt gat cgg cgg tat ta SEC ID nº 3	7139 - 7158
E8297R	5’ cgg cgc ggg cac aca ttt cgt caa ttt SEC ID nº 4	8271 - 8297
Fragmento c		
E8090F	5’ tac gac cta tcc acc caa gg SEC ID nº 5	8090 - 8109
E10275R	5’ gaa tct atg gtt atc gca gag c SEC ID nº 6	10254 - 10275

Cebadores	Secuencias	Posición del genoma
Fragmento d		
E9946F	5’ cct cga tga ggc tgg ata tt SEC ID nº 7	9946 - 9965
E12929R	5’ gca cca acc agg agg aaa aaa gc SEC ID nº 8	12907 - 12929
Fragmento e		
E3173F	5’ cat tct tgc gtc cct caa at SEC ID nº 9	3173 - 3192
E5352R	5’ cga cag tct ttc tgc cat caa tg SEC ID nº 10	5330 - 5352
Fragmento f		
E2229F	5’ gct gct gtt gtc ctg tgt t SEC ID nº 11	2229 - 2247
E3397R	5’ ccg tcg aag ggg gtg gca tcc SEC ID nº 12	3377-3397
Fragmento g		
E12482F	5’ tca ttc gag ctg acc atc aa SEC ID nº 13	12482 - 12501
E14651R	5’ ctt tat cat tgc acc cag caa SEC ID nº 14	14631 - 14651
Fragmento h		
E1GF	5’ ggc gcg cct aat acg act cac tat aga tga tgt gta ggg tat SEC ID nº 15	1 - 16
E2968R	5’ cgc ggg cgc ctg agt tcg aca aat t SEC ID nº 16	2944 - 2968
Fragmento i		
E14059F	5’ caa cga tcc tac cgc cgc aca a SEC ID nº 17	14059 - 14080
018 Poly AR	5’ ggc gat cgg gcg tct agg aat tct aga $(T)_{41}$ aat ttc ggt cac SEC ID nº 18	15036 - 15047
018 3’ R	5’ ggc gat cgg gcg tct agg aat tc SEC ID nº 19	Después de polyA
Construcción de sitio de enzima de restricción único en ORF7		
E14059F	5’ caa cga tcc tac cgc cgc aca a SEC ID nº 20	14059 - 14080
YFp503R	5’ ggc ccc agt gct gca atg ata c SEC ID nº 21	Después de polyA
ScalF *	5’ aga aga aaa aga aaa gta c***t***g ctc caa tgg g SEC ID nº 22	14569 - 14599
ScalR *	5’ ccc cat tgg agc ***a***gt act ttt ctt ttt ctt SEC ID nº 23	14571 - 14600
Inserción de GFP en la region Nsp2		
gfpF	5’ gct cag atg gtg agc aag ggc gag gag c SEC ID nº 24	
gfpR	5’ gag tct gaa gag gac ttg tac agc tcg tcc a SEC ID nº 25	
Nsp2F1	5’ tgc tga ctt tct tgc tga tcc acc tcc t SEC ID nº 26	1895 - 1922
Nsp2R1	5’ cct tgc tca cca tct gag cac tcc cg SEC ID nº 27	2408 - 2420
Nsp2F2	5’ gct gta caa gtc ctc ttc aga ctc caa ga SEC ID nº 28	2419 - 2439
Nsp2R2	5’ gcg gac cca gcc agg atc aga c SEC ID nº 29	2732 - 2753
* El nucleótido mutado para crear el sitio de la enzima de restricción *ScaI* está en negrita y en cursiva.		

Los extremos 5’ y 3’ de las secuencias genómicas se determinaron usando un kit GeneRACER (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento que representa el término 5’ del genoma vírico se preparó usando RT-PCR con los cebadores E1GF y E2968R (Tabla 1), que integra un sitio de T7 ARN polimerasa

inmediatamente antes de los nucleótidos 5' terminales auténticos y un sitio de la enzima de restricción *AscI*. El fragmento que contiene la secuencia del extremo 3' se construyó mediante transcripción inversa de ARN con el cebador 018 polyA, que flanquea los 41 restos de polyA y el sitio *XbaI*. La reacción de transcripción inversa fue seguida mediante PCR con los cebadores E14059F y 018 3'R (Tabla 1).

Construcción de un clon de ADNc de longitud completa de un PRRSV de Tipo 1 norteamericano, y determinación de su infecciosidad. Se construyó un clon de ADNc genómico de longitud completa de un PRRSV de Tipo 1 norteamericano, pSD01-08, usando la estrategia mostrada en la Fig. 1. Un plásmido de bajo número de copias pACYC177 (número de acceso de GenBank X06402) se modificó sustituyendo el fragmento entre los sitios *BamHI* y *BglI* por un fragmento rellenador, que se preparó como un gen sintético que contiene los sitios de enzimas de restricción como se muestra en la Fig. 1. Cada uno de los fragmentos víricos se cortó de PCR-Blunt II-Topo usando enzimas de restricción y se ligó en el plásmido pACYC177, que se digirió con las mismas enzimas de restricción. Después de cada etapa de ligación, el constructo de pACYC177 se transformó en células DH5α de *E. coli* y se hizo crecer toda la noche a 37ºC en presencia de kanamicina. El clon de ADNc de longitud completa totalmente ensamblado se secuenció, y la secuencia genómica de longitud completa se depositó en GenBank con el número de acceso DQ489311.

Para crear el sitio de la enzima de restricción *ScaI*, se generó la mutación silenciosa (mutación de G a T) en el nucleótido 42 de ORF7 (nucleótido 14588 del genoma de SD01-08) usando mutagénesis dirigida al sitio. La mutagénesis dirigida al sitio se logró mediante una técnica de PCR de extensión solapante (Ho et al., 1989; Jespersen et al., 1997), usando los pares de cebadores E14059F/Sca1R y Sca1F/YFp503R. El producto mutado se confirmó mediante análisis de secuenciación de ADN.

Este constructo contiene un promotor de T7 ARN polimerasa de bacteriófago en el término 5' del genoma vírico, un resto de guanosina adicional introducido entre el promotor T7 y el primer nucleótido del genoma vírico, el genoma de longitud completa de 15047 nucleótidos de SD01-08 y una cola de poly (A) de 41 restos incorporada en el extremo 3' del genoma. Comparada con la secuencia genómica del virus progenitor, la secuencia de ADN de pSD01-08 contenía seis diferencias nucleotídicas (Tabla 2).

Tabla 2. Diferencias nucleotídicas entre el aislado de SD01-08 progenitor y el clon de ADNc de longitud completa

Posición nucleotídica en el genoma de SD01-08	Nucleótido en virus progenitor	Nucleótido en el clon de ADNc	Cambio de aminoácido	Posición génica
1331	T	C	Silencioso	Nsp1β
6158	T	C	Silencioso	Nsp5
8191	A	G	Silencioso	Nsp9
9492	c	T	PtoL	Nsp10
11261	T	C	YtoH	Nsp11
14588	G	T	Silent	ORF7

Cuatro de estas diferencias fueron mutaciones silenciosas. La mutación en el nucleótido 14588 se introdujo para crear un sitio de enzima de restricción *ScaI* único en ORF7, para diferenciar el virus clonado del virus progenitor. Dos de las mutaciones nucleotídicas dieron como resultado cambios en los aminoácidos, que incluyeron la sustitución de una C por T en el nucleótido 9492 (aminoácido P a L) situado en Nsp10, y una T por C en el nucleótido 11261 (aminoácido Y a H) situado en Nsp11.

El plásmido pSD01-08 se linealizó mediante la enzima de restricción *XbaI*, y se usó para la transcripción *in vitro* mediante una T7 ARN polimerasa para sintetizar los ARNs de extremos bloqueados. El ARN de extremos bloqueados transcrito *in vitro* se transfectó en células BHK-21. A las 48 horas después de la transfección, las células se examinaron para determinar la expresión de la proteína N mediante tinción con anticuerpo fluorescente con mAb SDOW17 (Fig. 2A). Los resultados en la Fig. 2A mostraron que alrededor de 5% de las células transfectadas expresaron la proteína N. Los sobrenadantes procedentes de las células transfectadas se hicieron pasar sobre células MARC-145. Después de 72 horas, las células MARC-145 se tiñeron usando el mAb anti-Nsp2 específico para SD01-08, ES3-4 58-46 (Fig. 2B), y el mAb anti-proteína N SDOW17 (Fig. 2C). Como control negativo, se incorporó un mAb anti-proteína N específica para PRRSV Tipo 2 norteamericano, MR39 (Fig. 2D). Los resultados mostraron que ambas proteínas Nsp2 y N fueron detectadas en células MARC-145 inoculadas con sobrenadante procedente de las células BHK-21 transfectadas con pSD01-08. Con la pasada adicional del sobrenadante sobre células MARC-145 recientes (pasada 2 sobre células MARC-145), se observaron efectos citopáticos (CPE) en 48 a 72 horas después de la infección (hpi). La titulación del virus de la pasada 2 sobre células MARC-145 mostró un

título medio de 3,6 x 10^7 FFU/ml. Estos resultados indican que se rescató PRRSV Tipo 1 norteamericano viable e infeccioso a partir de las células transfectadas con ARN transcrito *in vitro*.

Inserción de GFP: El clon de pSD01-08-GFP se construyó insertando la secuencia génica de GFP (Clontech) en la región de Nsp2 (nucleótido 2420/2421) del genoma vírico en el plásmido pSD01-08. El gen de GFP se amplificó a partir del plásmido pEGFP-N1 (Clontech) con el cebador directo gfpF y el cebador inverso gfpR. GFP se insertó mediante técnica de PCR de extensión solapante (Ho et al.; 1989, Jesperson et al., 1997) usando los pares de cebadores de Nsp2F1/Nsp2R1 y Nsp2F2/Nsp2R2. El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción *RsrI1* y *AcI1* y se ligó en el plásmido pSD01-08, que se digirió con las mismas enzimas de restricción.

Transcripción *in vitro* y rescate de PRRSV: El plásmido pSD01-08 o pSD01-08-GFP se linealizó con la enzima de restricción *XbaI*. El ARN bloqueado en los extremos se transcribió con T7 ARN polimerasa usando el kit mMessage Machine (Ambion), y se transfectó a células BHK-21 usando el reactivo DMRIE-C (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para rescatar el virus, el sobrenadante del cultivo celular obtenido 48 horas después de la transfección se hizo pasar en serie sobre células MARC-145. El rescate del virus infeccioso se confirmó mediante ensayo inmunofluorescente indirecto (IFA) (Ropp et al., 2004). Se desarrollaron anticuerpos monoclonales (mAbs) para uso en el ensayo de IFA, incluyendo Mab ES3-4 58-46, que reconoce específicamente Nps2 de SD01-08 (Fang et al., Conf. Res. Work. Anim, Dis., abstr. 78, 2004). El MAb MR39 reconoce específicamente la proteína N del PRRSV de Tipo 2 norteamericano, y el Mab SDOW17 reconoce la proteína N de ambos genotipos de PRRSV (Nelson et al., 1993; Ropp et al, 2004). Para el rescate del virus de GFP, también se visualizó directamente la expresión de GFP bajo un microscopio fluorescente.

Se examinaron las cinéticas de crecimiento infectando células MARC-145 con virus clonado y virus progenitor, a una MOI de 0,1. Las células infectadas se recogieron a 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas después de la infección, y los títulos del virus se determinaron mediante IFA en células MARC-145 y se cuantificaron como unidad de foco fluorescente por ml (FFU/ml). Se comparó la morfología de placas entre el virus clonado y el virus progenitor mediante un ensayo de placas sobre células MARC-145. Las monocapas de células confluentes se infectaron con 0,1 MOI de los virus. Después de 2 horas, el sobrenadante del cultivo celular se retiró y se aplicó un recubrimiento de agar. Las placas se detectaron después de cinco días a 37ºC, y se tiñeron usando violeta de cristal al 0,1%.

Caracterización *in vitro* de virus clonado. El virus progenitor y el virus clonado (pasada 2 sobre células MARC-145) se titularon sobre macrófagos alveolares porcinos (PAMs). La tinción inmunofluorescente usando mAb anti-proteína N mostró que ambos virus se replicaron en PAMs (Fig. 2E y 2F) y produjeron el rendimiento vírico similar (2,1-2,8 x 10^4 FFU/ml) a 72 hpi.

Para comparar adicionalmente las propiedades de crecimiento de los virus clonados y progenitores, se infectaron células MARC-145 con cada uno de los virus a una MOI de 0,1 y se cosecharon a 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 hpi. Los resultados de la curva de crecimiento mostraron que el virus clonado poseyó una cinética de crecimiento similar a la del virus progenitor (Fig. 3). Los títulos alcanzaron un pico a 48 hpi para ambos virus. El título pico del virus clonado fue 1,39 x 10^7 FFU/ml, frente a 2,34 x 10^7 FFU/ml para el virus progenitor. También se determinó la morfología de placas de estos virus: el tamaño de las placas producidas por el virus clonado fue similar al del virus progenitor (datos no mostrados). Estos resultados indican que el virus clonado posee propiedades *in vitro* similares al virus de tipo salvaje progenitor.

Para diferenciar el virus clonado del virus progenitor, se manipuló mediante ingeniería un sitio de enzima de restricción *ScaI* en el nucleótido 42 de ORF7. Como se muestra en la Fig. 4, en el virus clonado se escindió mediante *ScaI* un fragmento de RT-PCR de 1054 pb derivado de amplificar los nucleótidos 13875 a 14928. Por el contrario, el fragmento de RT-PCR derivado del virus progenitor no se escindió mediante *ScaI*.

Propiedades patógenas e inmunológicas de virus clonado derivado de pSD01-08 en un modelo de cerdo. Se llevó a cabo un estudio *in vivo* de las propiedades de replicación de virus derivado del clon infeccioso usando un modelo de cerdo de criadero. Se obtuvieron veintiún cerdos de 4 semanas, no sometidos a tratamiento previo de PRRSV, procedentes de una piara certificada negativa a PRRSV, y se dividieron aleatoriamente en 4 grupos enjaulados separadamente en instalaciones de aislamiento. Después de un período de aclimatación de 4 días, los cerdos de cada grupo (n = 6) para el grupo infectado con el virus clonado; n = 5 para los grupos restantes) se inocularon intranasalmente con 1 ml de 10^5 $TCID_{50}$ de virus clonado (grupo 1) o virus progenitor (grupo 2). El tercer grupo de animales se incoculó con la actual vacuna del virus vivo modificado (MLV) Ingelvac® PRRSV. Los animales del grupo de control negativo (grupo 4) se expusieron de forma simulada al sobrenadante del cultivo de células MARC-145.

Los cerdos se observaron diariamente en busca de signos clínicos, y se tomaron las temperaturas corporales durante los primeros 7 días tras la infección. Se obtuvieron muestras de sangre de todos los cerdos en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, y 42. Las muestras de suero se almacenaron a -80ºC para ensayos posteriores. Dos cerdos de cada grupo se eutanasiaron a los 21 días después de la inoculación (dpi) para el análisis post-mortem de infección aguda. Los tres cerdos restantes de cada grupo se eutanasiaron a 42 dpi. Las lesiones pulmonares de los animales del estudio se evaluaron usando un sistema desarrollado previamente basado en el volumen aproximado que cada lóbulo contribuye a todo el pulmón: los lóbulos apicales izquierdo y derecho, los lóbulos cardíacos izquierdo y

derecho, y el lóbulo intermedio contribuyen cada uno con 10% del volumen pulmonar total, y los lóbulos caudales izquierdo y derecho contribuyen cada uno 25%. Estas puntuaciones se usaron entonces para calcular la puntuación de lesión pulmonar total basándose en la contribución relativa de cada lóbulo (Halbur et al., 1995).

Para la detección de ARN vírico y la determinación de la carga viral, se examinaron muestras séricas de 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 dpi usando PCR cuantitativa en tiempo real (Tetracore VetAlert PRRS; Wasilk et al., 2004), que se lleva a cabo de manera rutinaria en el South Dakota Animal Disease Research and Diagnostic Laboratory (SDSU-ADRDL). Todas las muestras séricas se evaluaron para determinar los anticuerpos anti-PRRSV usando el ELISA IDEXX HerdChek® PRRS 2XR y el ensayo de neutralización vírica (VN). Estos ensayos también se llevan a cabo de forma rutinaria en SDSU-ADRDL bajo guías estrictas de garantía de calidad.

Todos los cerdos que recibieron los virus se infectaron, lo que fue evidente por los resultados positivos de RT-PCR para la presencia de ARN vírico en suero y mediante serología. El virus en suero alcanzó un pico a 14 días después de la infección (dpi) (Fig. 5A; Tabla 3). A 14 dpi, 5 de 6 cerdos en el grupo del virus clonado, 4 de 5 cerdos en el grupo del virus progenitor, y los 5 cerdos en los grupos de la vacuna se habían seroconvertido (Fig. 5B; Tabla 3). Cuatro de los 6 cerdos en el grupo expuesto al virus clonado tuvieron títulos de anticuerpos neutralizantes detectables a 21 dpi, mientras que 1 de los 5 cerdos en el grupo expuesto al virus progenitor desarrolló anticuerpos neutralizantes en 21 dpi. Dos de los cerdos procedentes del grupo expuesto a la vacuna de MLV desarrollaron títulos de anticuerpos neutralizantes detectables a 42 dpi (Tabla 3).

Tabla 3. Sumario de resultados serológicos y de PCR en suero de cerdos inoculados a diferentes días después de la infección (dpi).

dpi	Virus progenitor			Virus clonado			Vacuna de MLV		
	PCR[a]	ELISA[b]	VN[c]	PCR[a]	ELISA[b]	VNc	PCR[a]	ELISA[b]	VNc
0	0/5	0/5	0/5	0/6	0/6	0/6	0/5	0/5	0/5
7	4/5	1/5	0/5	5/6	0/6	0/6	5/5	0/5	0/5
14	4/5	4/5	0/5	6/6	5/6	0/6	5/5	5/5	0/5
21*	5/5	5/5	1/5	6/6	5/6	4/6	5/5	5/5	0/5
28	2/3	3/3	2/3	4/4	4/4	2/4	3/3	3/3	0/3
35	1/3	3/3	2/3	2/4	4/4	2/4	3/3	3/3	0/3
42	0/3	3/3	3/3	1/4	4/4	2/4	2/3	3/3	2/3

[a]PCR: número de cerdos con una PCR positiva/número total de cerdos en cada grupo determinado mediante la PCR en tiempo real; [b]ELISA: número de cerdos seropositivos/número total de cerdos en cada grupo determinado mediante ELISA IDEXX HerdChek® PRRS 2XR; [c]VN: número de cerdos que desarrollan respuesta de anticuerpos neutralizantes/número total de cerdos, determinado mediante ensayo de neutralización de foco fluorescente. Resultados interpretados como reducción del 90% de la infección vírica. *Dos cerdos eutanasiados en el día 21 para el análisis de infección aguda.

Todos los cerdos infectados de forma simulada permanecieron negativos a la RT-PCR y a anticuerpos anti-PRRSV durante todo el período de estudio. No se observaron signos clínicos significativos en ninguno de los cerdos infectados. Sólo se observaron lesiones pulmonares patológicas leves características de PRRSV, tal como neumonía intersticial menor, en 3 de 6 cerdos del grupo del virus clonado, 5 de 5 cerdos del grupo del virus progenitor y 2 de 5 cerdos del grupo de la vacuna. El resto de los cerdos no mostró lesiones pulmonares gruesas (Tabla 4). De forma interesante, al comparar las lesiones patológicas entre los cerdos de diferentes grupos, las puntuaciones de las lesiones parecen ligeramente mayores en cerdos infectados con virus progenitor.

Tabla 4. Porcentaje de pulmón con lesiones de neumonía gruesas en cerdos infectados

Número del cerdo	Puntuación de lesión pulmonar gruesa (%)*			
	Virus clonado	Virus progenitor	Vacuna de MLV	Control simulado
1	0	0,6	0,7	0
2	1,0	0,5	0	0

Número del cerdo	Puntuación de lesión pulmonar gruesa (%)*			
	Virus clonado	Virus progenitor	Vacuna de MLV	Control simulado
3	0,9	10,5	0	0
4	0	2,1	0,3	0
5	0	3,25	0	0
6	1.5	N/A	N/A	N/A

*La patología pulmonar gruesa se evaluó usando un sistema de puntuación de lesión pulmonar de cerdo gruesa en el que cada lóbulo del pulmón se evaluó para determinar el % de neumonía, y el % de neumonía de cada lóbulo se añadió para todo el pulmón (10).

Introducción de la proteína fluorescente verde en la región Nsp2 del clon infeccioso. Se exploró la posibilidad de usar este clon infeccioso para la expresión de genes extraños. Los estudios previos demostraron que Nsp2 es un sitio candidato excelente para la inserción de genes extraños. La región C-terminal de Nsp2 tanto para el Tipo 1 como para el Tipo 2 contiene dominios hipervariables, incluyendo inserciones y supresiones de aminoácidos (7, 8, 27). Una de las diferencias importantes entre el SD01-08 y LV, el miembro prototípico de los virus de Tipo 1 europeos, es la presencia de una supresión de 17 aminoácidos en la Nsp2, que está situada entre los aminoácidos 734 a 750 en ORF de LV. Se insertó una proteína fluorescente verde (GFP) en este sitio de supresión único de Nsp2 (en los aminoácidos 733/734 del ORF1a de SD01-08, Fig. 7). El constructo, pSD01-08-GFP, se transcribió *in vitro* y se transfectó en células BHK-21. Las células vivas se examinaron directamente bajo un microscopio de fluorescencia después de 48 horas tras la transfección. El sobrenadante del cultivo celular procedente de las células BHK transfectadas se hizo pasar sobre células MARC-145, dando como resultado la aparición de células que expresan GFP, que se pudieron visualizar claramente tan pronto como 6 horas después de la infección (FIG. 6A). Para confirmar la expresión de la proteína de fusión GFP-Nsp2, a 48 horas después de la infección, las células se fijaron y se tiñeron con un mAb específico para Nsp2, ES3-4 58-46. ES3-4 58-46 se generó inmunizando ratones con un péptido sintético obtenido de la secuencia epitópica de ES3, que está situada inmediatamente en dirección del sitio de inserción de GFP (Fig. 7). Como anticuerpo secundario, se usó IgG antiratón de cabra conjugada a Cy3 fluorescente rojo. La microscopía confocal mostró la localización perinuclear tanto de GFP como Nsp2, similar a la localización de Nsp2 del virus progenitor (Figs. 6B y 6C). Para determinar si la expresión de GFP afectó a la replicación vírica, se compararon las características de crecimiento del virus de GFP con los virus de tipo salvaje progenitor y clonado. El ciclo de replicación del virus de pSD01-08-GFP fue similar al de los otros virus, incluyendo títulos víricos pico a 48 hpi; sin embargo, el título máximo para la infección del virus de GFP se redujo aproximadamente 10 veces. (Fig. 3).

Para investigar la estabilidad de la expresión de GFP a lo largo de múltiples rondas de replicación vírica, se hizo pasar en serie ocho veces el virus de GFP sobre células MARC-145. Hacia la séptima pasada, apareció una subpoblación de virus que no expresa GFP, que se computó como el 15% de la población vírica total. También se analizó la pérdida de GFP mediante RT-PCR. Se aisló ARN celular total de células infectadas con la séptima pasada del virus de GFP, y se usó ARN como molde en una reacción de RT-PCR con cebadores que amplificaron la región de inserción de GFP. El producto de RT-PCR se clonó y se secuenció. Los resultados revelaron que los aminoácidos N-terminales 1-159 de GFP se suprimieron (Fig. 7). De forma más interesante, mientras que se suprimieron los aminoácidos 1-159, se insertaron dos aminoácidos, metionina (M) y ácido glutámico (E), por el virus antes del aminoácido 160 de GFP (Fig. 7). Por lo tanto, la selección del genoma vírico que codifica la supresión en el gen de GFP dio cuenta de la disminución en el porcentaje de células infectadas que expresan GFP. Tomados juntos, estos resultados indican que la región Nsp2 puede tolerar la introducción de un gen extraño. Sin embargo, la inserción de un gen extraño reduce el nivel de replicación vírica. De este modo, el marcador positivo, el gen de GFP no fue estable.

II. Virus marcador negativo de GFP/ΔES4

Construcción del virus vacunal marcador negativo GFP/ΔES4. A fin de obtener un virus vacunal marcador negativo potencial, se suprimió el epítopo de células B, ES4, que está situado en dirección de la GFP (en el nucleótido 2427 a 2591 del genoma vírico de SD01-08) mediante técnicas de PCR de extensión solapante (Hayashi et al., 1994) usando pares de cebadores ΔES4F/E3448R y E1895F/ΔES4R (Tabla 5). El producto de la PCR se digirió con las enzimas de restricción *RsI1* y *EcoRV*, y se ligó en el plásmido pSD01-08-GFP, que se digirió con los mismos enzimas de restricción. El constructo plasmídico resultante se designó como pSD01-08-GFP/ΔES4 (Fig. 8).

Tabla 5. Cebadores usados para la supresión del epítopo ES4 y la expresión antigénica de ELISA

Nombre del cebador	Secuencia*	Posición del genoma en SD01-08@
ΔES4F	5' **caa g**tc ctc tac agg gcc cat act c SEC ID nº 32	2421 -2426 2592 -2606
ΔES4R	5' ggc cct gta gag gac **ttg tac agc tc** SEC ID nº 33	2421 -2426 2592 - 2599
E1895F	5' ctt gct gat cc acct cct cag g SEC ID nº 34	1905 - 1926
E3448R	5' ccg tcg gag ggg gtg gca tcc SEC ID nº 35	3377 - 3397
Nsp2-2144F	5' gtc tgt gtc ctt gga cga gtg SEC ID nº 36	2144 - 2164
Nsp2-2694R	5' cca agc ggc caa gga tag atc SEC ID nº 37	2694 - 2714
pET-EGFP-F	5' cg*g gat cc***a tgg tga gca agg gcg agg agc** SEC ID nº 38	-
pET-EGFP-R	5' cct *aag ctt* **cct tgt aca gct cgt cca tgc cg** SEC ID nº 39	-
pET-ES4F1	5' gc *aga tct* tca gac tcc aag aga gaa SEC ID nº 40	2427 - 2444
pET-ES4F2	5' gc *aga tct* ggt ggt ggt ggt tcc tca gac tcc aag aga gaa SEC ID nº 41	2427 - 2444
pET-ES4R	5' at ccc *aag ctt* gcg g*gg atc* ccg gga caa atc ctc g SEC ID nº 42	2577 - 2591
*Los nucleótidos de GFP están en negrita, y los sitios de enzimas de restricción están en cursiva y subrayados; @ Los números corresponden a posiciones nucleotídicas en el genoma de SD01-08.		

La Fig. 8 es un diagrama esquemático del constructo pSD01-08-GFP/ΔES4. La GFP se insertó entre los aminoácidos 733 y 734 de ORF1a, y el epítopo de células B inmunógeno, ES4, situado en dirección de GFP (en el aminoácido 736 a 790) se suprimió del virus SD01-08. La transfección directa de este ADN plasmídico en células BHK-21 inicia un ciclo completo de replicación vírica. Los sobrenadantes de los cultivos celulares de células BHK-21 obtenidos 48 horas después de la transfección se hicieron pasar sobre células MARC-145, se recuperó el virus de la progenie infecciosa, y el virus resultante se denominó como virus marcador GFP/ΔES4. El virus progenitor, SD01-08, se generó paralelamente a partir del clon de ADNc pSD01-08. Para la caracterización *in vitro* e *in vivo* se usó la pasada dos de los virus de células MARC-154.

El estudio de la genética de crecimiento mostró que los virus marcadores GFP/ΔES4 se replicaron con una cinética ligeramente más lenta, alcanzando un título máximo varias horas más tarde que el virus progenitor, SD01-08. El título vírico pico del virus marcador (3,34 x 10^4 FFU/ml) fue aproximadamente dos logaritmos menor que el del virus progenitor (2,56 x 10^6 FFU/ml) (Fig. 9). La Fig. 9 representa la cinética de crecimiento de los virus marcadores GFP/ΔES4. Las células MARC-145 se infectaron paralelamente a MOI de 0,1 con la pasada tres del virus marcador GFP/ΔES4 y del virus progenitor. A 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas después de la infección, las células se cosecharon, y los títulos víricos se determinaron mediante IFA en células MARC-145. Los resultados fueron valores medios a partir de tres réplicas del experimento, y los títulos víricos se expresaron como unidades de foco de fluorescencia por mililitro (FFU/ml). La morfología de placas entre el virus marcador y el virus progenitor se comparó mediante ensayo en placas en células MARC-145. Las placas víricas formadas por el virus marcador GFP/ΔES4 se redujeron drásticamente de tamaño, y la mayoría de las placas tuvieron un tamaño preciso (Fig. 10), sugiriendo un efecto negativo de la inserción de GFP/supresión de ES4 sobre la velocidad de extensión célula a célula durante la infección. La Fig. 10 muestra la morfología de placas de los virus marcadores GFP/ΔES4 (10-1) y virus progenitores (10-2). Se infectaron monocapas de cultivos celulares confluentes con virus a una MOI de 0,1. Después de una infección de 2 horas, el sobrenadante del cultivo celular se retiró y se aplicó un recubrimiento de agar. Las placas se detectaron después de 5 días a 37ºC, y se tiñeron usando violeta de cristal al 0,1%.

La estabilidad *in vitro* de la inserción de GFP o la supresión de ES4 en los virus recombinantes fue seguida durante 10 pasadas en serie (incubación de 72 horas para cada pasada) en células MARC-145. La región GFP/ΔES4 del virus en la pasada 10 se secuenció. Sorprendentemente, a diferencia del virus SD01-08-GFP previo, que experimentó una supresión de los 159 aminoácidos N-terminales, la GFP en el virus marcador GFP/ΔES4

permaneció intacta como un gen de longitud completa, y todavía estaba presente la supresión de ES4. Este resultado indica que la supresión de la región del epítopo ES4 mejoró la estabilidad del gen extraño insertado, GFP. Se identificó una pequeña población de las células infectadas que perdió la fluorescencia asociada a GFP (Fig. 11). En 11-1 se muestra la expresión de GFP en células MARC-145 infectadas con la pasada 10 de los virus marcadores GFP/ΔES4. El mismo foco vírico teñido con anticuerpo monoclonal anti-nucleocápsida marcado con AlexiFluor, SDOW 17 (Nelson et al., 1993), se muestra en 11-2. En el círculo se muestra la población de virus que perdieron la fluorescencia de GFP.

Para la región de GFP/ΔES4, se llevaron a cabo tres repeticiones independientes de PCR y secuenciación (en las direcciones tanto directa como inversa). Por lo tanto, se obtuvo un total de seis secuencias. En una de las secuencias, se identificó una mutación del nucleótido C-289 a T-289, que provocó la mutación de aminoácidos de arginina a cisteína en la posición 97 de la GFP, que puede corresponder a la pequeña población de células infectadas que perdieron la fluorescencia asociada a GFP (Fig. 12). No se detectó ninguna mutación en las otras cinco secuencias. La Fig. 12 representa un electroferograma del gen de GFP de tipo salvaje en comparación con el gen de GFP mutado en Arg-97. La región de inserción de GFP se secuenció a partir de la pasada 10 del cultivo celular de los virus marcadores de GFP/ΔES4. Los aminoácidos se presentan en un código de una sola letra, y la letra en negrita indica el aminoácido mutado de CGC (Arg) a TGC (Cys).

Expresión de los antígenos ES4 y GFP. El antígeno ES4 se expresó como epítopos ES4 de repetición en tándem usando un método modificado descrito anteriormente (Sun et al., 2004). De forma breve, se construyeron tres copias del epítopo ES4 (aminoácido 736-790 de ORF1a de SD01-08) en el vector de expresión proteico, pET-28a (+) (Novagen). Se añadió un ligador peptídico flexible, GGTGGTGGTGGTTCC, entre dos epítopos para ayudar a presentar los epítopos. Hubo dos cebadores directos. El cebador directo 1, pET-ES4F1 contenía un sitio de restricción de *Bgl*II, pero sin una secuencia ligadora, mientras que el cebador directo 2, pET-ES4F2, contenía no sólo un sitio de restricción de *Bgl*II, sino también una secuencia ligadora. El fragmento génico de ES4 se amplificó en primer lugar con el cebador directo 1 y el cebador inverso, pET-ES4R. El producto de la PCR se digirió con *Bgl*II e *Hind*III, y después se clonó en pET-28a, que se digirió con *BamHI* e *Hind*III. Este clon se denominó pET-28a-ES4 (+1). La segunda copia de ES4 se amplificó mediante PCR mediante el cebador directo 2 y el cebador inverso, pET-ES4R. El producto de la PCR se digirió con *Bgl*II e *Hind*III, y después se clonó en pET-28a-ES4 (+1), que se digirió con *BamHI* e *Hind*III. La tercera copia del ES4 se insertó usando la misma estrategia que la segunda copia. El constructo final se denominó pET-28a-ES4 (+3). El gen de GFP se amplificó a partir del plásmido pEGFP-N1 (Clontech) con el par de cebadores pET-EGFP-F/pET-EGFP-R. El producto de la PCR se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* e *Hind*III, y se ligó al vector pET-28a, que se digirió con las mismas enzimas. Las proteínas recombinantes se expresaron en *E. coli* BL21 (DE3) para producir una proteína de fusión con seis restos de histidina en el N-terminal. Las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad de níquel, y se analizaron mediante SDS-PAGE como se describe en nuestra publicación previa (Ferrin et al., 2004).

Caracterización in vivo del virus marcador de GFP/ΔES4. Las características *in vivo* del virus marcador de GFP/ΔES4 se estudiaron en un modelo de enfermedad de cerdo de criadero. Se adquirieron dieciocho cerdos de cuatro semanas de una piara libre de PRRSV. Los animales se separaron aleatoriamente en tres grupos (n = 6/grupo) y se enjaularon en condiciones de aislamiento BL2 con un período de aclimatación de 7 días antes de comenzar las inoculaciones experimentales. Los cerdos del grupo 1 se infectaron con el virus marcador de GFP/ΔES4, y los cerdos del grupo 2 se infectaron con el virus progenitor SD01-08 como control positivo, y los cerdos del grupo 3 se infectaron de forma simulada con el medio de cultivo celular. Los cerdos del grupo 1 y grupo 2 se inocularon a través de sitios tanto intranasales como intramusculares, con 1 x 10^6 dosis infecciosas de cultivo tisular del 50% ($TCID_{50}$) del virus (1 ml en cada sitio). En los 42 días después de la infección (dpi), los cerdos del grupo 1 y el grupo 2 se expusieron a la cepa de Tipo 1 heteróloga del virus SD03-15.

El SD03-15 es otra cepa de Tipo 1 norteamericana, que se aisló de muestras clínicas sometidas a nuestro laboratorio de diagnóstico en el año 2003. En informes de campo, los cerdos infectados con SD03-15 experimentaron una mortalidad previa al destete de 80-90% durante un período de 3 semanas. El comportamiento disminuido continuó a través de la fase de acabado. En la población de cerdas adultas, hubo una tormenta de abortos leve, en comparación con la epidemia de US PRRSV previa. Nuestro estudio con animales experimentales previo también demostró la naturaleza patógena de este virus (Lawson et al., Proc. Conf. Res. Work. Anim. Dis., abstr. 99, 2005).

Tres cerdos del grupo 3 se expusieron al virus SD03-15, y los otros tres cerdos permanecieron como controles infectados de forma simulada. Los cerdos se observaron diariamente en busca de signos clínicos y para determinar las temperaturas corporales durante los primeros 7 días después de la infección y los primeros 7 días después de la exposición. Se compararon las respuestas de temperaturas medias entre diferentes grupos de exposición. Las temperaturas rectales se tomaron un día antes de la exposición, y 7 días después de la exposición. No se detectó incremento de temperatura en ninguno de los cerdos tras la infección inicial, y no se observaron signos clínicos. Después de la exposición, las temperaturas rectales fueron elevadas en aquellos tres cerdos expuestos del Grupo 3 (infectados inicialmente de forma simulada) a uno y dos días después de la exposición (Fig. 13). También se observaron signos clínicos (tos y descarga nasa) en estos tres cerdos. El resto de los cerdos siguió asintomático. Se obtuvieron muestras de sangre de todos los cerdos una vez por semana. Los cerdos se eutanasiaron a los 21 días

después de la exposición. Se evaluaron lesiones pulmonares gruesas del animal del estudio usando un sistema desarrollado previamente basado en el volumen aproximado con el que cada lóbulo contribuye a todo el pulmón: los lóbulos apicales izquierdo y derecho, los lóbulos cardíacos izquierdo y derecho, y el lóbulo intermedio contribuyen cada uno con 10% del volumen pulmonar total, y los lóbulos caudales izquierdo y derecho contribuyen cada uno con 25%. Estas puntuaciones se usaron entonces para calcular la proporción de la lesión pulmonar total basándose en las contribuciones relativas de cada lóbulo (Halbur et al., 1995). En la necropsia, no se observaron lesiones patológicas gruesas en el Grupo 1, Grupo 2, y en los tres cerdos del control negativo estricto. Por el contrario, se observaron lesiones pulmonares patológicas gruesas leves, características de PRRSV en aquellos tres cerdos del Grupo 3 que se infectaron inicialmente de forma simulada y después se expusieron a SD03-15.

Propiedades virológicas e inmunológicas. Se determinaron las propiedades virológicas e inmunológicas *in vivo* del virus marcador. Los cerdos se expusieron a 42 dpi, mostrado como una línea punteada vertical en las Figs. 14A-14C. La duración y altura de la viremia se determinó mediante PCR en tiempo real, y el resultado se interpretó como número de copias de ARN por ml. A cada día después de la infección, la carga viral media con diferentes letras en mayúsculas (A, B o C) difiere significativamente ($P < 0,05$). En comparación con los cerdos del Grupo 2 infectados con virus progenitores (título vírico medio pico = $5,9 \times 10^7$ copias/ml), los cerdos que se infectaron con el virus marcador de GFP/ΔES4 tuvieron una menor carga viral pico (título vírico medio pico = $2,08 \times 10^5$ copias/ml, Fig. 14A). En el día 7 después de la exposición, la carga viral fue dos a tres logaritmos menor para los cerdos vacunados que para aquellos cerdos infectados inicialmente de forma simulada y expuestos después al virus SD03-15. Hacia el día 21 después de la exposición, los cerdos del grupo infectado con el virus marcador de GFP/ΔES4 tuvieron una carga viral 10 veces menor en comparación con el grupo progenitor, y 3/5 cerdos habían eliminado el virus en el suero (Fig. 14A; Tabla 6).

Tabla 6. Carga viral en suero medida mediante PCR cuantitativa a los 21 días después de la exposición con una cepa genéticamente diferente, SD03-15

Números de los cerdos	Carga viral en suero (copias/ml)			
	GFP/ΔES4	Progenitor	Negativo / expuesto*	Negativo
1	0	2,7E + 02	N/A	0
2	7,4E + 02	0	N/A	0
3	0	1,2E + 04	N/A	0
4	N/A	0	3,6E + 04	N/A
5	0	2,6E + 03	3,3E + 04	N/A
6	1,7E + 02	1,1E + 04	3,6E + 04	N/A
Media	**1,8E + 02**	**4,3E + 03**	**3,5E + 04**	**0**
* Tres de los cerdos en grupo negativo expuestos con la cepa heteróloga, SD03-15, a 42 dpi.				

Hacia 14 dpi, todos los cerdos de grupos infectados se habían seroconvertido. Los anticuerpos del suero específicos de PRRSV se midieron mediante un kit IDEXX HerdChek® PRRSV ELISA 2XR. Las relaciones S/P mayores que 0,4 son consideradas positivas. La respuesta de anticuerpos alcanzó niveles similares después de 21 dpi (Fig. 14B).

La respuesta de anticuerpos neutralizantes víricos se determinó mediante ensayo de neutralización de foco fluorescente (Fig. 14C). Los resultados se interpretaron como una reducción del 90% de la infección vírica, y los títulos de los anticuerpos neutralizantes se presentaron como valor medio ($n = 6$) y se expresaron en una escala logarítmica de base 2. El virus progenitor SD01-08 se usó para el ensayo neutralizante vírico. En cada día después de la infección, las medias con letras en mayúsculas diferentes (A, B o C) difieren significativamente ($P < 0,05$). La medida adicional de los niveles de anticuerpos neutralizantes del suero (SN) mostró que, en cerdos infectados con el virus progenitor, se detectaron anticuerpos SN en uno de los seis cerdos a los 21 días después de la infección, y 3/6 cerdos desarrollaron un título SN detectable que alcanzó un título medio geométrico (GMT) promedio de 2 a los 35 días después de la infección. Por el contrario, las respuestas de anticuerpos neutralizantes se desarrollaron más rápido y en mayor cantidad en cerdos infectados con el virus marcador de GFP/ΔES4. Los anticuerpos SN se detectaron en uno de los seis cerdos a los 14 días después de la infección, y los títulos SN se detectaron en todos los cerdos en este grupo, que alcanzaron un GMT promedio de 9,2 a los 35 días después de la infección. Después de la exposición a SD03-15, se observó un mayor efecto, con el GMT de 18,4 del grupo infectado con el virus marcador de GFP/ΔES4, en comparación con el GMT de 5,7 del grupo infectado con el virus progenitor a 49 dpi (una semana después de la exposición). Ambos grupos alcanzaron títulos SN similares a 62 dpi (tres semanas después de la exposición) (Fig. 14C). Estos datos sugieren que, en la infección inicial, los cerdos infectados con el virus

marcador de GFP/ΔES4 generaron títulos de anticuerpos neutralizantes mayores que los cerdos infectados con el virus progenitor.

Aislamiento de virus y secuenciación. Se usaron muestras séricas de 7, 14, 21 y 28 dpi para el aislamiento del virus como se describe previamente (Wasilk et al., 2004). La presencia del virus se confirmó mediante IFA con anticuerpo específico para PRRSV, SDOW17 (Nelson et al., 1993). Para determinar la estabilidad de la inserción de GFP y de la supresión del epítopo ES4, se extrajo ARN vírico del virus aislado del suero, usando el minikit QIAamp Viral RNA (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo la RT-PCR usando métodos descritos previamente (Fang et al., 2004). El fragmento amplificado mediante RT-PCR se purificó en gel, y la secuencia se determinó en las instalaciones de secuenciación de la Universidad del Estado de Iowa (Ames, IA). Para la RT-PCR y secuenciación se usó el par de cebadores nsp2-2144F/nsp2-2694R (Tabla 5), y se amplificó la región nucleotídica (2144 a 2694 del genoma de SD01-08) que contiene la inserción de GFP y la supresión de ES4. En SEC ID NO. 43 (Tabla 7) se proporciona la secuencia de longitud completa del virus marcador de GFP/ΔES4.

Estabilidad *in vivo* del marcador de GFP/ΔES4. Para determinar la estabilidad de los marcadores de GFP/ΔES4, se usaron muestras séricas de 7 a 28 dpi para el aislamiento del virus en células MARC-145. Los virus se recuperaron de las muestras séricas recogidas a 7, 14 y 21 dpi, y no se aisló virus de las muestras séricas recogidas desde el 28 dpi. En cultivo celular, sólo se observó una pequeña población de células infectadas que muestra una fluorescencia de GFP débil con los virus aislados desde 7 a 14 dpi y no se observó ninguna fluorescencia de GFP en células infectadas con los virus aislados a partir de 21 dpi. Sin embargo, la tinción inmunofluorescente usando el anticuerpo monoclonal específico contra la proteína de la nucleocápside, SDOW 17, confirmó la presencia de una gran población de virus, similar a lo observado en el estudio *in vitro* (Fig. 11). La estabilidad de la inserción de GFP/supresión de ΔES4 se determinó secuenciando las regiones correspondientes. Los resultados confirmaron la presencia de la supresión de ES4, y la GFP permaneció intacta como un gen de longitud completa. Sin embargo, los resultados de la secuenciación revelaron dos mutaciones de punto que se localizaron en el nucleótido 144 (C a T) y en el nucleótido 289 (C a T) de la GFP. La mutación del nucleótido 144 fue silenciosa, pero la mutación del nucleótido 289 provocó la mutación de aminoácidos de arginina (R) a cisteína (C) en la posición 97 de la GFP, lo que es consistente con nuestro análisis de secuenciación *in vitro* (Fig. 12). De forma interesante, todavía hubo una pequeña población del gen de GFP no mutado detectada en los virus aislados desde 7 y 14 dpi. Para cada dpi, se secuenciaron virus aislados de tres cerdos, y la secuenciación se llevó a cabo usando cebadores tanto directos como inversos, dando como resultado un total de seis secuencias para cada dpi. Para los virus aislados a partir de 7 dpi, se encontró que 1/6 secuencias no tienen mutación en la posición 97, y se determinó que las otras cinco secuencias contienen la mutación R a C. Para los virus aislados a partir de 14 dpi, no se identificaron mutaciones en 2/6 secuencias, y estas dos secuencias procedieron de dos cerdos diferentes. También se identificó que las otras cuatro secuencias contienen la mutación R a C. Todas las secuencias generadas a partir de los virus de 21 dpi contenían la mutación R a C. Este dato fue consistente con un informe previo (Kim et al., 2007) de que la pérdida de fluorescencia de GFP es debida a la mutación R a C. La presencia de una pequeña población de la GFP no mutada daría cuenta de las células débilmente fluorescentes observadas en el cultivo celular. Estos resultados sugieren que la selección puede haber ocurrido gradualmente para generar la mutación a favor de la replicación vírica mejorada.

ELISA a base de GFP y del epítopo de ES4. Se llevaron a cabo ELISAs usando placas de microtitulación de 96 pocillos Immulon II HB (Thermo Labsystems, Franklin, MA). La proteína recombinante se diluyó en tampón de revestimiento (carbonato de sodio 15 mM-bicarbonato de sodio 35 mM, pH 9,6), y las placas se revistieron con 100 ul del antígeno diluido en las columnas 1, 3, 5, 7, 9 y 11. Las columnas 2, 4, 6, 8, 10 y 12 se trataron con 100 ul de tampón de revestimiento como control de fondo. Las placas se incubaron a 37ºC durante 1 hora, y después los sitios que se unen a proteína en exceso se bloquearon con leche al 10% en tampón de PBST (1x PBS con 0,05% de Tween 20) a 4ºC toda la noche. Los sueros de los ensayos se aplicaron a diluciones 1:5 en tampón de PBST con leche al 5%. Después de una incubación de 1 hora a 37ºC, las placas se lavaron con PBST y se añadió anti-IgG porcina de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD), para unirse a cualesquiera anticuerpos séricos de PRRSV que se unen al antígeno en las placas. Las placas se incubaron a 37ºC durante otra hora, se lavaron, y se añadió el sustrato de peroxidasa ABTS (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) para el desarrollo del color. El desarrollo del color se cuantificó leyendo a 405 nm con un lector de microplacas EL800 (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT.) controlado por el software XChek (IDEXX Laboratories).

Se desarrolló un ensayo de diagnóstico diferencial de compañía para diferenciar animales que se vacunaron con la vacuna marcadora de aquellos que se infectaron de forma natural con los virus de campo. Debido a que se usaron dos marcadores, la inserción de GFP (marcador positivo) y supresión de ES4 (marcador negativo), se desarrollaron ensayos ELISA a base tanto de GFP como del epítopo de ES4 para la detección de los marcadores. Tanto GFP como los epítopos de ES4 se expresaron como proteínas recombinantes solubles. Se evaluaron estos dos ensayos de ELISA para detectar los anticuerpos específicos. La Fig. 15A muestra los resultados del ELISA a base del epítopo de ES4, y la Fig. 15B muestra los resultados del ELISA a base del antígeno de GFP. Los cerdos se expusieron a los 42 días después de la infección y se muestran como una línea vertical punteada en la Fig. 15A. Como se esperaba, la infección de los cerdos del Grupo 1 con el virus marcador de GFP/ΔES4 no indujo una respuesta de anticuerpos detectable contra el epítopo de ES4 suprimido (Fig. 15A), pero indujo una respuesta de anticuerpo potente contra el antígeno de GFP, partiendo desde 14 dpi y continuando durante el estudio hasta 62 dpi (Fig. 15B). Por el contrario,

los cerdos del Grupo 2 que se infectaron con el virus progenitor, se pudo detectar anticuerpo específico de la proteína recombinante de ES4 a 21 dpi, y también duró hasta 62 dpi (Fig. 15A), mientras que no se detectó ninguna respuesta de anticuerpo específica contra el antígeno de GFP (Fig. 15B). Después de exponerlos a 03-15, los cerdos del Grupo 1 mostraron una respuesta de anticuerpo detectable al epítopo de ES4 una semana después de la exposición, puesto que el virus 03-15 contiene el epítopo de ES4 (Fig. 15A). No se detectó ninguna respuesta de anticuerpo específica en ELISAs basados tanto en GFP como en el epítopo de ES4 para las muestras séricas procedentes de los tres cerdos de control negativo estricto (Figs. 15A y 15B).

Muestras séricas de otros animales infectados con PRRSV de Tipo 1 y Tipo 2. Un requisito básico para el marcador negativo es que la región antigénica debería ser capaz de reaccionar con un amplio abanico de virus de campo. Para asegurarse de que el epítopo de ES4 puede ser reactivo en diversas cepas víricas, se usaron muestras de suero procedentes de cerdos infectados con cada una de cuatro cepas representativas del virus de Tipo 1 norteamericano, SD01-07, SD01-08, SD02-11, y SD03-15 (Lawson et al., Proc. Conf. Res. Work. Anim. Dis., abstr. 99, 2005). Los aislados de SD01-07 y SD01-08 se obtuvieron de piaras que no muestran enfermedad clínica, y SD02-11 y SD03-15 procedieron de piaras con una morbimortalidad sustancial en cerdos jóvenes. Estos cuatro aislados también se agrupan en diferentes ramas del árbol filogenético desarrollado para aislados de PRRSV de Tipo 1 de origen norteamericano (Fang et al., 2007). Las muestras de suero procedentes de cerdos experimentales infectados con el virus de Tipo 2, VR2332, se obtuvieron de la fuente de reactivos compartida del PRRSV Cooperative Agriculture Project (CAP). Como se muestra en Fig. 15C, el epítopo de ES4 reaccionó con antisueros procedentes de todos los cerdos infectados con estas cuatro cepas víricas. Los resultados se presentan como valores medios (n = 6). La respuesta de anticuerpo se detectó a 14 dpi, y duró más de 62 dpi. Sin embargo, el ensayo posterior de muestras de suero procedentes de un grupo de cerdos experimentales infectados con la cepa prototípica de Tipo 2, VR2332, no mostró reactividad con el epítopo de ES4 en el ELISA (datos no mostrados). Por lo tanto, se necesitaría otro ensayo serológico para diferenciar a los animales infectados con los virus de Tipo 1 de aquellos animales infectados con los virus de Tipo 2.

III. Discusión

Se construyeron dos marcadores genéticos en la región nsp2 del virus de PRRS. El marcador positivo (inserción de GFP) permitirá la detección de los animales que han sido vacunados, mientras que el marcador negativo (supresión del epítopo de ES4) permitirá detectar la presencia de virus de tipo salvaje en los animales. En comparación con el MLV preparado mediante técnicas tradicionales de múltiples pasadas de cultivos celulares, las vacunas construidas usando este tipo de supresiones/inserciones atenuantes definidas de forma precisa, y el uso de tecnología genética inversa, reducen el riesgo potencial de inversión a virus de tipo salvaje virulentos.

Las vacunas marcadoras son útiles solamente si existen ensayos adecuados (ensayos de diagnóstico de compañía) para monitorizar los niveles de vacunación y seguir el transcurso espacial de la infección. El ELISA a base del antígeno de GFP detectó un nivel elevado de la respuesta anti-GFP en el grupo de cerdos infectados con el virus marcador. El ELISA basado en el epítopo de ES4 también detectó un nivel elevado de respuesta de anticuerpo en el grupo de cerdos infectados con el virus progenitor, pero pareció desarrollarse de forma más lenta que la de la respuesta anti-GFP. Se puede detectar una respuesta anti-GFP robusta de nivel elevado a 14 dpi en cerdos infectados con el virus marcador, mientras que la respuesta de anticuerpo anti-ES4 se detectó a 21 dpi y alcanzó mayores niveles a 28 dpi en cerdos infectados con el virus de tipo salvaje. El epítopo de ES4 posee los valores hidrófilos más elevados (Hopp y Woods, 1981) entre los seis epítopos de células B identificados en la nsp2 del virus de Tipo 1 (Oleksiewicz et al., 2001). El análisis de las secuencias de aminoácidos de nsp2 actualmente disponibles de PRRSV de Tipo 1 (Meulenberg et al., 1993; Fang et al., 2007) mostró que esta región posee 63,6% a 100% de identidad de secuencias de aminoácidos en el genotipo de Tipo 1. El análisis de las secuencias proteicas mostró que la región del epítopo de ES4, AA736-AA790, contiene realmente siete epítopos pequeños de células B (PepTool, BioTools, Inc., Edmonton, Alberta, Canadá). El epítopo AA745 - AA754 y AA768 - AA780 están bien conservados en el genotipo de Tipo 1. El dato de ELISA de ES4 fue consistente con el análisis de secuencia proteica, demostrando que el epítopo de ES4 puede reaccionar con muestras de sueros procedentes de animales infectados con cuatro cepas de campo representativas de PRRSV de Tipo 1. Sin embargo, el epítopo de ES4 no reacciona con las muestras séricas procedentes de animales infectados con aislados de Tipo 2. En comparación con los epítopos de células B identificados en la región nsp2 (Oleksiewicz et al., 2001; de Lima et al., 2006), ninguno de los epítopos identificados en la región nsp2 se conservó entre los aislados de Tipo 1 y de Tipo 2. Por lo tanto, es necesario otro ensayo de diagnóstico para diferenciar cerdos vacunados con el mutante de la supresión del epítopo de ES4 de aquellos cerdos infectados con cepas de campo de Tipo 2.

El epítopo de ES4 en la región nsp2 parece ser no esencial para la replicación del PRRSV, pero puede desempeñar un papel importante en la atenuación y patogénesis vírica *in vivo*. La inserción de la GFP sola no redujo sustancialmente las propiedades de crecimiento *in vitro* del virus; sin embargo, cuando se suprimió el epítopo de ES4 en dirección de la GFP, el título vírico se redujo al menos dos logaritmos en comparación con el de los virus progenitores. La morfología de placas también demostró efectos negativos de los marcadores en el crecimiento vírico. La caracterización *in vivo* demostró además que el virus marcador de GFP/ΔES4 se atenuó con un menor nivel de viremia y un mayor nivel de respuesta de anticuerpos neutralizantes que el del virus de tipo salvaje. El análisis de las secuencias proteicas ha demostrado que la región del epítopo de ES4 contiene el valor hidrófilo más elevado en la nsp2 (Hopp y Woods, 1981).

Sorprendentemente, la supresión del epítopo de ES4 mejoró la estabilidad de la inserción de GFP en la nsp2. Otra observación interesante es la pérdida de fluorescencia de GFP *in vitro* e *in vivo*, aunque el gen de GFP permaneció intacto. El análisis de secuencias identificó la mutación Arg-97 a Cys en la GFP. La mutación Arg-97 a Cys es exactamente la misma mutación de aminoácidos identificada en GFP que se insertó en la región nsp2 de un virus de Tipo 2 (Kim et al., 2007). Como se indica por Kim et al (2007), Arg-97 desempeña un papel clave en la formación cromofórica de GFP, lo que sugiere que la formación cromofórica puede afectar a la función de nsp2. Además, puesto que Cys es el aminoácido implicado normalmente en la formación del enlace de disulfuro en la proteína, puede ser necesario el enlace de disulfuro adicional para mantener la conformación correcta de nsp2 a fin de que funcione. No obstante, la GFP retiene su inmunogenicidad *in vivo*, y funciona como un marcador positivo excelente para la diferenciación entre animales vacunados y los infectados con el virus de tipo salvaje.

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de pericia normal en la técnica a la que pertenece esta invención.

La invención se ha descrito con referencia a diversas realizaciones y técnicas.

Tabla 7. Secuencia de longitud completa del virus marcador de GFP/ΔES4 (SEC ID NO: 43)

atgatgtgta	gggtatcccc	cctacataca	caacactttt	tgtgtttgtg	tactttggag	60
gcgtgggtac	agccccgccc	cacccttggc	cccctgttct	agcccaacag	gtatccttct	120
ccctcggggc	gagtgcgccg	cctgctgctc	ccttgcagtg	ggaaggacct	cccgagtatt	180
tccggagagc	acctgcttta	cgggatctcc	acccttttaac	catgtctggg	acgttctccc	240
ggtgcatgtg	caccccggct	gcccgggtat	tttggaacgc	cggccaagtc	ttttgcacac	300
ggtgtctcag	tgcgcggcct	cttctctctc	cggaacttca	ggacactgac	ctcggtgtag	360
ttggattgtt	ttacaagcct	aaggacaaga	ttcactggaa	agttcctatc	ggcattcctc	420
aggtggagtg	tactccatcc	gggtgctgct	ggctctcagc	cgtattccct	ttggcgcgca	480
tgacttccgg	taatcacaac	ttcctccaac	gacttgttaa	ggttgctgat	gttttgtatc	540
gcgatggttg	cttggcgcct	cgacacctcc	gtgaactcca	agtttacgag	cgcggttgta	600
gctggtaccc	aattacgggg	cccgtacccg	gaatgggttt	gtttgcgaac	tccatgcacg	660
tgtctgacca	gccgttccct	ggtgccaccc	atgtgttgac	taactcgcct	ctgcctcagc	720
gggcgtgccg	gcagccgttc	tgtccatttg	aggaagctca	ttctgacgtt	tacaggtgga	780
agaaatttgt	gatttttacg	gactcctctc	ccaacggtcg	atttcgcatg	atgtggacgc	840
cggaatccga	tgactcagcc	gccctggagg	tgctgccgcc	cgagttagaa	cgtcaggtcg	900
agatcctcac	tcggagtttt	cccgctcatc	accctatcaa	cctagctgac	tgggagctca	960
ctgagtcccc	tgagaacggt	ttttctttcg	gcacgtccca	ttcttgcggc	cacatcgtcc	1020
agaaccccaa	cgtgtttgac	ggcaagtgct	ggctcacctg	ctttttgggc	caatcggctg	1080
aagtgtgcta	ccacgaggaa	catctagcta	acgccctcgg	ttaccaaacc	aagtggggcg	1140
tgcatggtaa	gtacctccaa	cgcaggcttc	aagtccgcgg	catgcgtgct	gtggtcgatc	1200
ctgacggccc	tattcacgtt	gaagcgctgt	cttgctccca	gtcttgggtc	aggcacctga	1260
ctctgaataa	tgatgtcacc	ccaggattcg	ttcgcctgac	atccatccgc	attgtgtcca	1320
acacagaacc	caccgctttc	cggatctttc	ggtttggagc	acataagtgg	tatggcgctg	1380
ccggcaaacg	ggctcgtgcc	aaacgtgcca	ccaaaagtgg	gaaggattcg	gccctcgctc	1440
ccaagattgc	cccaccggtc	cccacctgtg	gaatcaccac	ctactctcca	ccgacagacg	1500
ggtcttgtgg	ttggcacgtt	cttgccgcca	tagtgaatcg	gatgataaac	ggtgacttta	1560
cgtccccct	gcctcagtac	aacagaccag	aggatgattg	ggcttctgat	tatgatcttg	1620
ctcaggcgat	tcaatgttta	caactgcctg	ccaccgtggt	tcggaatcgc	gcctgtccta	1680
acgccaagta	cctcataaag	ctaaacgggg	ttcactggga	agtagaggtg	agatctggaa	1740
tggctcctcg	ttccctttct	cgtgaatgtg	tagttggcgt	ttgctctgaa	ggctgtgtcg	1800
caccgcctta	tccagcggac	gggcttccta	aacgtgcact	cgaggccttg	gcgtctgcct	1860
acagactacc	ctcagattgt	gttagctctg	gtattgctga	ctttcttgct	gatccacctc	1920
ctcaggaatt	ctggactctc	gacaaaatgt	tgacctcccc	gtcaccggag	cggtccggct	1980
tctccagctt	gtataaatta	ctcttagagg	ttgttccgca	aaaatgtggt	gctacggaag	2040
gggctttcgt	ctatgctgtt	gagaggatgt	taaaggactg	tccgagcccc	gaacaggcca	2100
tggcccttct	ggcaaaaatt	aaagttccat	cctcaaaggc	cccgtctgtg	tccttggacg	2160
agtgttttcc	tgcgggtgtt	ccagccgact	tcgagccagc	atttcaggaa	aggccccaaa	2220
gtcccggtgc	tgctgtcgcc	ctgtgttcac	cggacgcaaa	agggttcgag	ggaacagcct	2280
cggaagaagc	tcaagagagt	ggccataagg	ccgtccacgc	tgtacccctt	gccgaaggtc	2340
ccaataatga	acaggtacag	gtggttgctg	gtgagcagct	agagctcggc	ggttgtggtt	2400
tggcaatcgg	gagtgctcag	atggtgagca	agggcgagga	gctgttcacc	ggggtggtgc	2460
ccatcctggt	cgagctggac	ggcgacgtaa	acggccacaa	gttcagcgtg	tccggcgagg	2520
gcgagggcga	tgccacctac	ggcaagctga	ccctgaagtt	catctgcacc	accggcaagc	2580
tgcccgtgcc	ctggcccacc	ctcgtgacca	ccctgaccta	cggcgtgcag	tgcttcagcc	2640
gctaccccga	ccacatgaag	cagcacgact	tcttcaagtc	cgccatgccc	gaaggctacg	2700
tccaggagcg	caccatcttc	ttcaaggacg	acggcaacta	caagacccgc	gccgaggtga	2760
agttcgaggg	cgacaccctg	gtgaaccgca	tcgagctgaa	gggcatcgac	ttcaaggagg	2820
acggcaacat	cctggggcac	aagctggagt	acaactacaa	cagccacaac	gtctatatca	2880
tggccgacaa	gcagaagaac	ggcatcaagg	tgaacttcaa	gatccgccac	aacatcgagg	2940
acggcagcgt	gcagctcgcc	gaccactacc	agcagaacac	ccccatcggc	gacggccccg	3000
tgctgctgcc	cgacaaccac	tacctgagca	cccagtccgc	cctgagcaaa	gaccccaacg	3060
agaagcgcga	tcacatggtc	ctgctggagt	tcgtgaccgc	cgccgggatc	actctcggca	3120
tggacgagct	gtacaagtcc	tctacagggc	ccatactccg	tcatgttgag	cactgcggca	3180
cagagtcagg	cgacagcagt	tcgcctttgg	atctgtcttt	tgcgcaaacg	ttggaccagc	3240

```
ctttagatct atccttggcc gcttggccgg tgaaggccac cgcgtctgat cctggctggg 3300
tccgcggtag gtgcgagcct gtctttttaa agcctcggaa agctttctct gatggcgatt 3360
cggcccttca gttcggggag ctttctgagt ccagctctgt catcgagttt gaccagacaa 3420
aagatactct ggtggctgac gcccctgttg acttgacgac ttcgaacgag gccctctctg 3480
cagtcgaccc ttccgaattt gtcgaactca ggcgcccgcg tcattccgca caagccttaa 3540
ttgaccgagg cggtccactt gctgatgtcc atgcgaaaat aaagaaccgg gtgtatgaac 3600
agtgcctcca agcttgtgag cctggtagtc gtgcaacccc agccaccagg gagtggctcg 3660
acaaaatgtg ggatagggtg gacatgaaaa cttggcgctg cacttcacag ttccaggccg 3720
gtcgcattct tgcgtccctc aaatttcttc ctgacatgat tcaagacacg ccgcctcctg 3780
tccccaagaa gaaccgagct agtgacagtg ccggtcagac cgtccctccg cctacggata 3840
tccagcaaga ggatgccacc ccctccgacg ggttatccca tgcatcggat ttttctagtc 3900
gagtgagcac gagctggagt tggaaaggcc ttatgctttc cggcacccgt ctcgcggggt 3960
ctgctggtca gcgcctcatg acatgggttt ttgaagttta ctcccatctc ccagctttta 4020
tactcacact tttctcgccg cggggctcta tggctccagg cgattggttg tttgcaggtg 4080
ttgttttact tgctctcttg ctctgtcgtt cttacccaat actcggatgc cttcccttac 4140
tgggtgtctt ctctggttct ttgcggcgtg ttcgtctggg tgtttttggt tcttggatgg 4200
cttttgctgt atttttattc tcgactccat ccaacccagt cggttcttct tgtgaccacg 4260
attcgccgga atgtcatgct gagcttttgg ctcttgagca gcgccaactt tgggaacctg 4320
tgcgcggcct tgtggttggc ccctcaggtc tcttatgtgt catccttggc aagttactcg 4380
gtgggtcacg tcatctctgg catgttatcc tacgtttatg catgcttaca gatttggccc 4440
tttctcttgt ttatgtggtg tcccaagggc gttgtcacaa gtgttgggga aagtgtataa 4500
ggacagctcc tgctgaggtg gctctcaatg tatttccttt ctcgcgcgcc actcgcaact 4560
ctctcacatc cttgtgtgat cggttccaaa ctcctaaagg agttgatccc gtgcacttgg 4620
caacgggttg gcgcgggtgt tggcgtggtg agagtcccat ccatcaacca caccaaaagc 4680
ccatagctta tgccaatttg gatgaaaaga aaatatctgc tcaaacggtg gttgctgtcc 4740
catacgaccc cagtcaggct atcaaatgtc tgaaggttct gcaggcggga ggggctatcg 4800
tggaccagcc tacgcctgaa gttgttcgtg tgtctgaaat cccctttca gccccatttt 4860
tcccaaaagt tccagtcaac ccagattgca ggattgtggt ggattcagat acttttgtgg 4920
ctgcagtccg ctgcggttac tcgacagcac aactggtcct aggccggggc aactttgcca 4980
agttgaatca gaccccccttt agggactctg cctccaccaa aacgactggt ggggcctctt 5040
atactcttgc tgtggctcaa gtgtctgtgt ggactcttgt tcatttcatc ctcggtcttt 5100
ggttcacatc acctcaagtg tgtggccgag gaaccgctga cccatggtgt tcaaatccct 5160
tttcgtatcc tgcctacggc cctggagttg tgtgctcctc tcgactttgt gtgtctgccg 5220
atggggtcac cctgccattg ttctcagctg tggcacaact ctccggtaga gaggtaggga 5280
tttttatttt agtgcttgtt tccttgactg ccttggccca tcgcctggct cttaaggcag 5340
acatgttagt ggtcttttca gctttttgtg cttacgcctg gcccatgagc tcctggttaa 5400
tctgcttctt tcctatactc ttaaagtggg ttacccttca ccccctcact atgctttggg 5460
tgcactcatt cttggtgttt tgtatgccag cagccggcat cctctcacta gggataactg 5520
gccttctctg ggcagttggc cgctttaccc aggttgccgg aattattaca ccttatgaca 5580
tccaccagta tacctctggg ccacgcggtg cagccgctgt agccacagcc ccagaaggca 5640
cttatatggc cgccgtccgg agagctgctt taactggacg aactttgatc ttcaccccgt 5700
ctgcggtcgg atcccttctt gaaggtgctt tcaggactca taaaccctgc cttaacaccg 5760
tgaatgttgt gggttcttcc cttggttctg gaggggtttt taccattgat ggcagaaaga 5820
ccgtcgtcac tgctgctcat gtgttgaacg gcgacacagc tagagttacc ggcgactctt 5880
acaaccgcat gcacactttt aagaccagtg gcgattatgc ctggtcccat gctgatgact 5940
ggcagggcgt tgcccctgtg gtcaaggttg cgaaggggta tcgcggtcgt gcctactggc 6000
aaacatcaac cggtgtcgaa cccggcgtca ttggggaagg gttcgccttc tgtttcacca 6060
actgtggcga ttcggggtca cccgtcatct cagaatctgg tgatctcatc ggaatccata 6120
ccggttcaaa caaactcggt tctggtcttg tgacgacccc tgaaggggaa acctgcgcca 6180
tcaaagaaac caagctctct gacctttcca gacattttgc gggcccgagc gtccctcttg 6240
gggacattaa attgagtccg gccatcgtcc ctgatgtaac atctattccg agtgacttgg 6300
catcgctcct agcttccgtc cctgtaatgg aaggcggcct ctcgaccgtt caacttctgt 6360
gtgtcttttt ccttctctgg cgcatgatgg gccatgcctg gacacccatt gttgccgtgg 6420
gcttcttttt gctgaatgaa attcttccag cagttttggt ccgagccgtg ttttcctttg 6480
cactctttat tcttgcatgg gccacccccct ggtccgcaca ggtgttaatg attagactcc 6540
```

tcacggcatc	cctcaaccgc	aacaagttgt	ctctggcgtt	ctacgcactt	gggggtgtcg	6600
tcggtttggc	cgctgaaatc	ggggcttttg	ccggcaggct	gcctgaattg	tctcaagctc	6660
tttcgacata	ctgtttctta	cctagggtcc	ttgccatggc	cagttatgtt	cccatcatca	6720
tcattggtgg	actccatgcc	ctcggtgtga	ttctgtggtt	gttcaaatac	cggtgcctcc	6780
acaacatgct	ggttggtgat	gggagtttct	caagcgcttt	cttcctacgg	tattttgcag	6840
agggtaatct	tagaaaaggt	gtttcacagt	cttgtggcat	gagtaacgag	tccctgacgg	6900
ctgctctagc	ttgcaagttg	tcgcaggctg	accttgactt	tttgtccagc	ttaacgaact	6960
tcaagtgctt	tgtatctgct	tcaaacatga	aaaatgctgc	cggccagtat	attgaagcag	7020
cgtatgccaa	ggccctgcgc	caagagttgg	cctccctagt	tcaggttgac	aaaatgaaag	7080
gaattttgtc	taagcttgag	gcctttgctg	aaacagccac	tccgtccctt	gacgcaggtg	7140
acgtggttgt	tctgcttggg	caacatcctc	acggatccat	cctcgatatt	aatgtgggga	7200
ctgaaaggaa	aactgtgtcc	gtgcaagaga	cccggagctt	aggtggttcc	aaattcagtg	7260
tttgcactgt	cgtgtccaac	acacccgtgg	acgccttaac	tggcatccca	ctccagacac	7320
caacccctct	ttttgagaat	ggtccgcgtc	accgtggtga	ggaagacgat	cttagagtcg	7380
agaggatgaa	gaaacactgt	gtgtccctcg	gcttccacaa	cattaatggc	aaagtttact	7440
gcaaaatttg	ggacaagtcc	accggtgata	ccttttatac	cgatgattcc	cggtacaccc	7500
aagaccttgc	attccaggac	aggtcagccg	actacagaga	cagggattat	gagggtgtgc	7560
aaaccgcccc	ccaacagggc	tttgatccaa	agtctgaaac	ccctattggc	actgtggtga	7620
tcggcggtat	cacgtataac	aggtacctga	tcaaaggtaa	ggaggtcttg	gttcccaagc	7680
ctgacaactg	ccttgaagct	gccaagctgt	cccttgagca	agctctcgct	gggatgggcc	7740
aaacttgcga	ccttacagct	gccgaggtgg	aaaagttgag	gcgcatcatt	agccagctcc	7800
aaggtttgac	cactgaacag	gctttaaact	gttagccgcc	agcggcttga	cccgctgtgg	7860
ccgcggcggc	ttagttgtaa	ctgaaacagc	ggtaaaaatc	gtaaagtacc	acagcagaac	7920
tttcacccta	ggccctctgg	acctgaaagt	cacctccgag	gctgaggtaa	agaaatcaac	7980
tgagcagggc	cacgctgttg	tggcaaactt	atgttctggt	gtcatcttga	tgagacctca	8040
cccaccgtcc	cttgttgatg	ttcttctgaa	acccggactt	gacacaaaac	ccggcattca	8100
accagggcat	ggggccggga	atatgggcgt	agacggctct	acttgggatt	ttgaaaccgc	8160
acccacaaag	gcagaacttg	agttgtccaa	acaaataatt	caagcatgtg	aagttaggcg	8220
cggggacgcc	ccgaacctcc	aactccctta	caagctctat	cctgttagag	gggatcctga	8280
gcggcatggg	ggccgcctta	tcaataccag	gtttggagat	ctatcttaca	aaacccctca	8340
agacaccaag	tccgcaatcc	atgcggcttg	ttgcctgcac	cccaacgggg	cccctgtgtc	8400
tgatggtaag	tcaacactag	gtaccaccct	tcaacatggt	ttcgaacttt	atgtccccac	8460
tgtgccctat	agtgtcatgg	agtacctcga	ttcacgccct	gacacccctt	tcatgtgcac	8520
taaacatggt	acttccaagg	ctgctgcaga	agacctccaa	aaatacgacc	tatctactca	8580
aggatttgtc	ctgcccgggg	tcttacgcct	tgtacgcaga	ttcatctttg	gccatattgg	8640
taaggcaccg	ccattgttcc	tcccgtcaac	ctatcccgct	aaaaattcta	tggcagggat	8700
caatggccag	aggttcccaa	caaaggacgt	ccagagcata	cctgaaattg	acgaaatgtg	8760
tgcccgcgcc	gtcaaggaga	attggcaaac	tgtgacacct	tgtaccctca	agaaacagta	8820
ctgttccaag	cccaaaacca	ggaccatcct	gggcaccaac	aactttattg	ccctggctca	8880
ccgatcggcg	ctcagtggtg	tcacccaggc	attcatgaag	aaggcttgga	agtccccgat	8940
tgccttggga	aaaaacaaat	tcaaggagct	gcattgcact	gtcgccggca	ggtgtcttga	9000
agccgacttg	gcctcctgtg	accgcagcac	ccccgccatt	gtgaggtggt	tcgtcgccaa	9060
cctcctgtat	gaacttgcag	gatgtgaaga	gtacttgcct	agctatgtgc	ttaactgctg	9120
ccatgacctt	gtggcaacac	aggatggtgc	cttcacaaaa	cgcggtggcc	tgtcgtccgg	9180
ggaccccgtc	accagtgtgt	ctaacaccgt	atattcactg	ataatctatg	cccagcacat	9240
ggtgttgtcg	gccttaaaaa	tgggtcatga	aatcggtctc	aagttcctcg	aggaacagct	9300
caaattcgag	gacctcctcg	aaatccagcc	tatgttggtc	tattctgatg	accttgtctt	9360
gtacgctgaa	aggcccactt	ttcctaatta	tcactggtgg	gtcgagcacc	ttgacctaat	9420
gctgggtttc	agaacggacc	caaagaagac	agtcataact	gataaaccca	gcttcctcgg	9480
ctgcagaatt	gaggcggggc	gacagctggt	ccctaatcgc	gaccgcatcc	tggctgctct	9540
cgcatatcac	atgaaggcgc	agaacgcctc	agagtattat	gcgtctgctg	ccgcaatcct	9600
gatggattca	tgtgcttgca	ttgatcatga	ccctgagtgg	tatgaggacc	tcatctgcgg	9660
tatcgcccga	tgcgcccgcc	aggatggtta	tagtttccca	ggcccggcat	ttttcatgtc	9720
catgtgggaa	aagctgagaa	gtcacaatga	agggaagaaa	tttcgacact	gcggcatctg	9780
cgacgccaaa	gccgaccatg	catccgcctg	tgggcttgat	ttgtgtttgt	tccactcaca	9840

```
ctttcatcaa cactgccccg tcactctgag ctgtggtcat catgccggtt caagggaatg  9900
ttcgcagtgt cagtcacctg ttggggctgg cagatctcct cttgatgccg tgctaaaaca  9960
aatcctgtac aaacctcctc gtacagtcat catgaaggtg ggtaacaaaa caacggccct 10020
cgatccgggg aggtaccagt cccgtcgagg tcttgttgca gtcaagaggg gtattgcagg 10080
caatgaagtt gatcttcctg atggggacta ccaagtagtg cctcttttac caacttgtaa 10140
agacataaac atggtaaagg tggcttgcaa tgtactactc agtaagttca tagtggggcc 10200
accaggttcc ggaaagacca cctggttact gagtcaagtc caggacgatg atgtcattta 10260
cacacccacc catcagacca tgtttgatat agtcagtgct ctcaaagttt gcaggtattc 10320
tattccagga gcctcaggac ttcctttccc accacctgcc aggtccgggc cgtgggttag 10380
gctcgtggcc agcgggcacg tccccggccg aacatcatac ctcgatgagg ctggatattg 10440
taatcatctg gacattctca gactgctttc caaaacaccc ctcgtgtgtt tgggtgacct 10500
tcaacaactt caccctgtcg gctttgactc ctactgttat gtgtttgatc agatgcctca 10560
aaagcaactg accactattt atagatttgg ccctaacatc tgcgcagcca tccagccttg 10620
ttacagggag aagcttgaat ctaaggctag gaacaccagg gtggtcttta ccacctggcc 10680
tgtggccttt ggtcaggtgc tgacaccata ccataaagat cgcatcggct ctgcgataac 10740
catagactca tcccaggggg ccactttcga cattgtgaca ttgcatctac catcaccaaa 10800
gtccctaaat aaatcccgag cacttgtagc catcactcgg gcaagacacg ggttgttcat 10860
ttatgaccct cacaaccagc tccaggagtt tttcaacctg atccctgagc gcactgattg 10920
caaccttgtg ttcagccgtg gggatgatct ggtagttctt agtgcggaca atgcagtcac 10980
aactgtagcg aaggccctag ggacaggtcc atctcgattt cgagtatcag acccgaggtg 11040
caagtctctc ttagctgctt gttcggccag tctggagggg agctgtatgc cactaccaca 11100
agtggcacat aacctggggt tttacttctc cccagacagt ccagcatttg cacctctgcc 11160
aaaggagtta gcgccacatt ggccagtggt tactcaccag aacaatcggg cgtggcccga 11220
tcgacttgtc gctagtatgc gcccaattga tgcccgctac agcaagccaa tggtcggtgc 11280
agggtatgtg gtcgggccgt ccacctttct tggtactcct ggtgtagtgt catactacct 11340
cacgctatac atcaggggtg agccccaggc cttgccagag acactcgttt caacaggacg 11400
catagccact gactgccggg agtatctcga cgcggctgag gaagaggcag caaaagaact 11460
cccccacgca ttcattggcg atgtcaaagg taccacggtc gggggtgtc accacatcac 11520
atcaaaatac ctacccagga ccctgcctaa ggactctgtt gctgtagttg gagtaagctc 11580
gcccggcagg gctgctaaag ccatgtgcac tctcactgat gtgtatctcc ccgaactccg 11640
gccatacctg caacctgaga cggcgtcgaa atgctggaaa ctcaaattag acttcaggga 11700
cgtccgacta atggtctgga aaggagccac cgcctatttc cagttggaag gacttacatg 11760
gtcagcgctg cctgactatg ccaggtttat tcagcttccc aaggacgccg ttgtgtacat 11820
tgatccgtgt ataggaccgg caacagccaa ccgcaaggtc gtgcgaacca cagactggcg 11880
ggccgacctg gcagtgacac cgtatgatta cggtgcccag aacattttga caacagcctg 11940
gttcgaggac ctcgggccgc agtggaagat tttggggttg cagcccttca ggcgggcatt 12000
tggctttgaa aatactgagg attgggcaat ccttgcacgc cgtatgagtg acggcaaaga 12060
ctacactgac tacaactggg attgtgttcg agaacgccca cacgccatct acgggcgtgc 12120
tcgtgaccat acatatcatt ttgcccccgg cacggaattg caggtagagc tgggtaaacc 12180
ccggctgccg cctggacgag agccgtaaac ttggagtgat gcaatggggt cactgtggag 12240
taaaatcagc cagctgttcg tggatgcctt cactgagttt cttgtcagtg tggttgatat 12300
tgtcattttc cttgccatac tgtttgggtt caccgtcgca ggatggttat tggtctttct 12360
tctcagagtg gtttgctccg cgcttctccg ttcgcgctct gccattcact ctcccgaact 12420
atcgaaggtc ctatgaaagc ttgttgccca actgcaggcc ggatgtccca caatttgcat 12480
ttaagcaccc attgggtata ctttggcaca tgcgagtttc ccacctgatt gatgagatgg 12540
tctctcgccg catttaccag accatggaac attcaggtca agcggcctgg aaatatgtgg 12600
tcggtgaggc cactctcacg aagctatcaa agcttgatat agttactcat ttccaacatc 12660
tggccgcagt agaggcggat tcttgccgct ttctcagctc acgactcgtg atgctaaaaa 12720
atcttgccgt tggcaatgtg agcctacagt acaacaccac gttggatcgc gttgaactca 12780
ttttccccac gccaggtacg aggcccaagt tgaccgactt cagacaatgg ctcatcagtg 12840
tgcatgcttc catttttcc tctgtggctt catctgttac cttgttcata gtgctttggc 12900
tgcgaattcc agctctacgc tatgtttttg gtttccattg gcccacggca acacatcatt 12960
cgagctgacc atcaattata ccatatgcat gccctgtctt accagtcaag cagctcgcca 13020
aaggctcgag cccggtcgta acatgtggtg cagaataggg catgataggt gtgaggagcg 13080
tgaccatgat gagttgttaa tgtccatccc gtccgggtac gacaacctca aacttgaggg 13140
```

```
atattatgct tggctggctt ttttgtcctt ttcctacgcg gcccaattcc atccggagct 13200
gttcgggata gggaatgtgt cgcgcgtctt cgtggacaag cgacaccagt ttatttgtgc 13260
cgagcatggt ggactcaatt caaccttatc taccgagcac aatatctccg cattatatgc 13320
ggtatattat caccaccaaa tagacggggg taattggttc catttggaat ggctgcggcc 13380
gctttttcc tcctggttgg tgctcaacat atcatggttt ctgaggcgtt cgcctgtaag 13440
ccctgtttct cgacgcatct atcagatatt aagaccaaca cgaccgcggc tgccggtttc 13500
atggtccttc agaacatcaa ttgttcccgg cctcacgagg cctcagcaac gcaaggtcaa 13560
gttccctcca gaaagtcgtc ccaatgccgt gaagccgtcg gtgttcccca atacatcacg 13620
ataacggcca acgtgaccga cgaatcatat ttgtacaacg cggacttgct gatgctttct 13680
gcgtgccttt tctacgcctc ggaaatgagc gagaaaggct ttaaagttat ctttgggaat 13740
gtctctggcg ttgtttctgc ttgtgtcaat ttcacagatt atgtggccca tgtgacccaa 13800
catacccagc agcatcatct ggtgattaat cacatccggt tactgcactt cctgacacca 13860
tctgcaatga ggtgggctac aaccattgct tgtctgttcg ccattctctt ggcgatatga 13920
aatgttctca caaattgggg cattccttga ctccgcactc ttgcttctgg tggctttttt 13980
tgctgtgtac cggcttgtcc tggtcctttg ccgatggcaa cggcaacaac tcgacatacc 14040
aatacatata taatttgacg atatgcgagt tgaatgggac caattggctg tccggccatt 14100
ttgaatgggc agttgagacc tttgtgcttt acccggttgt cactcatatc ctctcactgg 14160
gttttctcac gacaagtcat ttttttgacg cgctcggtct cggcgctgta tccactgcag 14220
gatttgtcgg agggcggtat gtacttagca gcgtctacgg cgcttgtgct ttcgcagcgt 14280
tcgtatgctt cgtcatccgt gctgctaaaa attgcatggc ctgccgctat gcccgtaccc 14340
ggttcaccaa cttcattgtg gacgaccggg ggggagttca tagatggaag tctccaatag 14400
tggtagaaaa actgggcaaa gccgaaattg gcggcaacct tgtcaccatc aaacatgtcg 14460
tcctcgaagg ggttaaagct caacccttga cgagaacttc ggccgagcaa tgggaggcct 14520
agataatttt tgcaacgatc ctaccgccgc acaaaagatc gtgctagcct tcagcatcac 14580
atacacacct ataatgatat acgcccttaa ggtgtcacgc ggccgactcc tggggctgtt 14640
gcacatccta atatttctga actgttcctt tacattcgga tacatgacat atgtgcattt 14700
tcattctacc caccgtgtcg cacttaccct gggggctgtt gtcgcccttt tgtggggtgt 14760
ctacagcctc acagagtcat ggaagtttat cacttccaga tgcagattgt gttgcctcgg 14820
ccggcgatac attctggccc ctgcccatca cgtagaaagt gctgcaggtc tccattcaat 14880
ctcagcgtct ggtaaccgag catacgctgt gagaaagccc ggactaacat cagtgaacgg 14940
cactctagta ccaggacttc ggagcctcgt gctgggcggc aaacgagctg ttaaacgagg 15000
agtggttaac ctcgtcaagt atggccggta aaaatcagag ccagaagaaa aagaaaagta 15060
cggctccaat ggggaatggc cagccagtca atcaactgtg ccagttgctg ggtgcaatga 15120
taaagtccca gcgccagcaa cctaggggag gacaggctaa aaagaaaaag cctgagaagc 15180
cacattttcc cctggctgca gaagatgaca tccggcacca cctcacccaa actgaacgct 15240
ccctctgctt gcaatcgatc cagacggctt tcaatcaagg cgcaggaact gcgtcgcttt 15300
catccagcgg gaaggtcagt ttccaggttg agtttatgct gccggttgct catacagtgc 15360
gcctgattcg cgtgacttct acatccgcca gtcagggtgc aaattaattt gacagtcagg 15420
tgaatggccg cgattggcgt gtggcctctg agtcacctat tcaattaggg cgatcacatg 15480
ggggtcatac ttaatcaggc aggaaccatg tgaccgaaat t                     15521
```

Referencias

1. Allende, R., Lewis, T. L., Lu, Z., Rock, D. L., Kutish, G. F., Ali, A., Doster, A. R. y Osorio, F. A. (1999). North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. J Gen Virol 80, 307-315.

2. Babiuk, L., Lewis, J., Suradhat, S., Baca-Estrada, M., Foldvari, M. y Babiuk, S. (1999). Polynucleotide vaccines: potential for inducing immunity in animals. J Biotechnol 73, 131-140.

3. Babiuk, L. A. (1999). Broadening the approaches to developing more effective vaccines. Vaccine 17, 1587-1595.

4. Babiuk, L. A., Babiuk, S. L. y Baca-Estrada, M. E. (2002). Novel vaccine strategies. Adv Virus Res 58, 29-80.

5. Barrett, T., Parida, S., Mohapatra, M., Walsh, P., Das, S. y Baron, M. D. (2003). Development of new generation rinderpest vaccines. Dev Biol 114, 89-97.

6. Bautista, E. M., S. M. Goyal, I. J. Soon, H. S. Joo, y J. E. Collins. 1996. Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch. Virol. 141:1357-1365.

7. Benfield, D. A., E. Nelson, J. E. Collins, L. Harris, S. M. Goyal, D. Robison, W. T. Christianson, R. B. Morrison, D. Gorcyca, y D. Chladek. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). J. Vet. Diagn. Invest. 4:127-133.

8. Bosch, J. C., Kaashoek, M. J., Kroese, A. H. y Van Oirschot, J. T. (1996). An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccines. Vet Microbiol 52, 223-234.

9. Calvert, J. G., M. G. Sheppard, and S. K. W. Welch. 2003. Infectious cDNA clone of North American porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and use thereof. US Patent Application 20030157689.

10. Calvert, J. G., M. G. Sheppard, and S. K. W. Welch. 2002. Infectious cDNA clone of North American porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and use thereof. US Patent 6,500,662.

11. Castillo-Olivares, J., Wieringa, R. T., Bakonyi, A. A. F., de Vries, N. J., Poyner, D. y Rottier, P. J. M. (2003). Generation of a candidate live marker vaccine for equine arteritis virus by deletion of the major virus neutralization domain. J Virol 77, 8470-8480.

12. Collins, J. E., D. A. Benfield, W. T. Christianson, L. Harris, J. C. Hennings, D. P. Shaw, S. M. Goyal, D. Gorcyca, D. Chladek, S. McCullough, R. B. Morrison, y H. S. Joo. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (Isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J. Vet. Diag. Invest. 4:117-126.

13. den Boon, J. A., K. S. Faaberg, J. J. M. Meulenberg, A. L. M. Wassenaar, P. G. W. Plagemann, A. E. Gorbelenya, y E. J. Snijder. 1995. Processing and evolution of the N-Terminal region of the arterivirus replicase ORF1a protein: identification of two papainlike cysteine proteases. J. Virol. 69:4500-4505.

14. de Lima, M., Pattnaik, A. K., Flores, E. F. y Osorio, F. A. (2006). Mapping of B-cell linear epitopes on Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virology 353, 410-421.

15. Fang, Y., D.-Y. Kim, S. Ropp, P. Steen, J. Christopher-Hennings, E.A. Nelson, y R. R. R. Rowland. 2004. Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States. Virus Res. 100:229-235.

16. Fang, Y., Rowland, R. R. R., Roof, M., Lunney, J. K., Christopher-Hennings, J. y Nelson, E. A. (2006). A full-length cDNA infectious clone of North American type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus: expression of green fluorescent protein in the nsp2 region. J Virol 80, 11447-11455.

17. Fang, Y., Schneider, P., Zhang, W. P., Faaberg, K., Nelson, E. A. y Rowland, R. R. R. (2007). Diversity and evolution of a newly emerged North American Type 1 porcine arterivirus. Arch Virol 152, 1009-1017.

18. Ferrin, N. H., Fang, Y., Johnson, C. R., Murtaugh, M. P., Polson, D. D., Torremorell, M., *et al*. (2004). Validation of a Blocking ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Clin Diagn Lab Imm 11, 503-514.

19. Fitzgerald, D. J., Bronson, E. D. y Anderson, J. N. (1996). Compositional similarities between the human immunodeficiency virus and surface antigens of pathogens. AIDS Res Hum Retroviruses 12, 99.

20. Floegel-Niesmann, G. (2003). Marker vaccines and companion diagnostic tests for classical swine fever. Dev Biol 114, 185-191.

21. Frias-Staheli, N., Glannakopoulos, N. V., Klkkert, M., Taylor, S. L., Bridgen, A., Paragas, J., Richt, J. A., Rowland, R. R. R., Schmaljohn, C. S., Lenschow, D. J., Snijder, E. J., Garcia-Sastre, A. y Virgin, H. W. (2007). Ovarian tumor domain-containing viral proteases evade ubiquitin- and ISG15-dependent innate immune responses. Cell Host Microbe 2, 404-416.

22. Gao, Z. Q., X. Guo, and H. C. Yang. 2004. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. Arch. Virol. 149:1341-1351.

23. Garrity, R. R., Rimmelzwaan, G., Minassian, A., Tsai, W. P., Lin, G., de Jong, J., Goudsmit, J. y Nara, P. (1997). Refocusing neutralizing antibody response by targeted dampening of an immunodominant epitope. J Immunology 159, 279-289.

24. Hall, B. F. y Joiner, K. A. (1991). Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defenses. Immunol Today 12, A22.

25. Hayashi, N., Welschof, M., Zewe, M., Braunagel, M., Dubel, S., Breitling, F. y Little, M. (1994). Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR. Biotechniques 17, 310, 312, 314-315.

26. Halbur, P. G., P. S. Paul, M. L. Frey, J. Landgraf, K. Eemisse, X.-J. Meng, M. A. Lum, J. J. Andrews, y J. A. Rathje. 1995. Comparison of the pathogenicity of two U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. Vet. Pathol. 32:648-660.

27. Han, J., Liu, G., Wang, Y. y Faaberg, K. S. (2007). Identification of nonessential regions of the nsp2 replicase protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain VR-2332 for replication in cell culture. J Virol 81, 9878-9890.

28. Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, y L. R. Pease. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene. 77:51-59.

29. Hopp, T. P. y Woods, K. R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. Proc Natl Acad Sci 78, 3824-3828.

30. Jespersen, T., D. Mogens, y F. S. Pedersen. 1997. Efficient non-PCR-mediated overlap extension of PCR fragmentos by exonuclease "end polishing." Biotechniques 23:48-52.

31. Johnson, C. R., Yu, W. y Murtaugh, M. (2007). Cross-reactive antibody responses to nsp1 and nsp2 of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol 88,1184-1195.

32. Keffaber, K. K. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. Am. Assoc. Swine Pract. Newsl. 1:1-9.

33. Kim, D. Y., Calvert, J. G., Chang, K. O., Horlen, K., Kerrigan, M., Rowland, R. R. R. (2007). Expression and stability of foreign tags inserted into nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Virus Research 128, 106-114.

34. King, N. J. y Kesson, A. M. (2003). Interaction of flaviviruses with cells of the vertebrate host and decoy of the immune response. Immunol Cell Biol 81, 207-216.

35. Konig, P., Beer, M., Makoschey, B., Teifke, J. P., Polster, U., Giesow, K. y Keil, G. M. (2003). Recombinant virus-expressed bovine cytokines do not improve efficacy of a bovine herpesvirus 1 marker vaccine strain. Vaccine 22, 202-212.

36. Mardassi, H., B. Massive, y S. Dea. 1996. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virology 221:98-112.

37. Marrack, P. y Kappler, J. (1994). Subversion of the immune system by pathogens. Cell 76, 323.

38. Mebatsion, T., Koolen, M. J. M., de Vaan, L. T. C., de Haas, N., Braber, M., Romer-Oberdorfer, A., van den Elzen, P. y van der Marel, P. (2002). Newcastle disease virus marker vaccine: an immunodominant epitope on the nucleoprotein gene of NDV can be deleted or replaced by a foreign epitope. J Virol 76, 10138-10146.

39. Meng, X. J., P. S. Paul, I. Morozov, y P. G. Halbur. 1996. A nested set of six or seven subgenomic mRNAs is formed in cells infected with different isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Gen. Virol. 77:1265-1270.

40. Meulenberg, J. J., J. N. Bos-de Ruijter, R. Van de Graaf, G. Wensvoort, and M. Moormann. 1998. Infectious transcripts from cloned genomic-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Virol. 72: 380-387.

41. Meulenberg, J. J., y A. Petersen-den Besten. 1996. Identification and characterization of a sixth structural protein of Lelystad virus: the glycoprotein GP2 encoded by ORF2 is incorporated in virus particles. Virology 225:44-51.

42. Meulenberg, J. J. M., A. Petersen-den Besten, E. P. de Kluyver, R. J. M. Moormann, W. M. M. Schaaper, y G. Wensvoort. 1995. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. Virology 206:155-163.

43. Meulenberg, J. J., M. M. Hulst, E. J. de Meijer, P. L. Moonen, A. den Besten, E. P. de Kluyver, G. Wensvoort, y R. J. Moormann. 1993. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. Virology 192:62-72.

44. Moradpour, D., M. J. Evans, R. Gosert, Z. Yuan, H. E. Blum, S. P. Goff, B. D. Lindenbach, y C. M. Rice. 2004. Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. J. Virol. 78:7400-7409.

45. Mounir, S., H. Mardassi, y S. Dea. 1995. Identification and characterization of the porcine reproductive respiratory virus ORFs 7, 5 and 4 products. Adv. Exp. Med. Biol. 80:317-320.

46. Nara, P. L., Smit, L., Dunlop, N., Natch, W., Merges, M., Waters, D., Kelliher, J., Gallo, R. C., Fischinger, P. J. y Goudsmit, J. (1990). Emergence of viruses resistant to neutralization by V3-specific antibodies in experimental human immunodeficiency virus type 1 IIIB infection of chimpanzees. J Virol 64, 3779-3791.

47. Nelson, E. A., J. Christopher-Hennings, T. Drew, G. Wensvoort, J. Collins, y D. A. Benfield. 1993. Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 31:3184-3189.

48. Nelson, E. A., J. Christopher-Hennings, y D. A. Benfield. 1995. Structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Adv. Exp. Med. Biol. 380:321-323.

49. Nelsen, C. J., Murtaugh, M. P. y Faaberg, K. S. (1999). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. J Virol 73, 270-280.

50. Neumann, E. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. JAVMA, 227:385-392.

51. Nielsen, H. S., G.-P. Liu, J. Nielsen, M. B. Oleksiewicz, A. Botner, T. Storgaard, y K.S. Faaberg. 2003. Generation of an infectious clone of VR-2332, a highly virulent North American-type isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Virol. 77:3702-3711.

52. Oleksiewicz, M.B., A. Botner, P. Toft, P. Normann, y T. Storgaard. 2001. Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragmento of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. J. Virol. 75:3277-3290.

53. Ropp, S. L., C. E. Mahlum Wees, Y. Fang, E. A. Nelson, K. D. Rossow, M. Bien, B. Arndt, S. Preszler, P. Steen, J. Christopher-Hennings, J. E. Collins, D. A. Benfield, y K. S. Faaberg. 2004. Characterization of emerging European-like PRRSV isolates in the United States. J. Virol. 78:3684-3703.

54. Shen, S., J. Kwang, W. Liu, y D. X. Lui. 2000. Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the nsp2 gene with a unique insertion. Arch. Virol. 145:871-883.

55. Snijder, E. J., y J. J. Meulenberg. 1998. The molecular biology of arteriviruses. J. Gen. Virol. 79:961-979.

56. Snijder, E. J., A. L. M. Wassenaar, y W. J. M. Spaan. 1994. Proteolytic processing of the replicase ORF1a protein of equine arteritis virus. J. Virol. 68:5755-5764.

57. Snijder, E. J., Wassenaar, A. L. M., Spaan, W. J. y Gorbalenya, A. E. (1995). The arterivirus Nsp2 protease. An unusual cysteine protease with primary structure similarities to both papain-like and chymotrypsin-like proteases. J Biol Chem 270, 16671-16676.

58. Sun, T., Lu, P. y Wang, X. (2004). Localization of infection-related epitopes on the non-structural protein 3ABC of foot-and-mouth disease virus and the application of tandem epitopes. J Virol Methods 119, 79-86.

59. Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C., *et al*. (2007). Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. PLoS ONE 2, 526.

60. Truong H. M., Z. Lu, G. Kutish, J. Galeota, F. A. Osorio, y A. K. Pattnaik. 2004. A highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus generated from an infectious cDNA clone retains the in vivo markers of virulence and transmissibility characteristics of the parental strain. Virology. 325:308-319.

61. van Dinten, L. C., A. L. Wassenaar, A. E. Gorbalenya, W. J. Spaan, y E. J. Snijder. 1996. Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b protein: identification of cleavage products containing the putative viral polymerase and helicase domains. J. Virol. 70:6625-6633.

62. van Gennip, H. G., Bouma, A., van Rijn, P. A., Widjojoatmodjo M. N. y Moormann, R. J. (2002). Experimental non-transmissible marker vaccines for classical swine fever (CSF) by trans-complementation of E(rns) or E2 of CSFV. Vaccine 20, 1544-1556.

63. van Oirschot, J. T. (2001). Present a future of veterinary viral vaccinology: a review. Vet. Quart 23, 100-108.

64. van Oirschot, J. T., Kaashoek, M. J., Rijsewijk, F. A. y Stegeman, J. A. (1996). The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. J Biotechnol 44, 75-81.

65. Vijayakrishanan, L., Kumar, V., Agrewala, J. N., Mishra, G. C. y Rao, K. V. (1994). Antigen-specific early primary humoral responses modulate immunodominance of B cell epitopes. J Immunol. 153, 1613-1625.

66. Walsh, E. P., Baron, M. D., Rennie, L., Anderson, J. y Barrett, T. (2000). Development of a genetically marked recombinant rinderpest vaccine expressing green fluorescent protein. J Gen Virol 81, 709-718.

67. Wasilk, A., J. Callahan, J. Christopher-Hennings, B.T. Gay, Y. Fang, M. Dammen, M. Torremorell, D. Polson, M. Mellencamp, E.A. Nelson y W. Nelson. 2004. Detection of U.S. and Lelystad/European-like porcine reproductive and

respiratory syndrome virus and relative quantitation in boar semen and serum by real-time PCR. J. Clin. Micro. 42:4453-4461.

68. Wassenaar, A. L., W. J. Spaan, A. E. Gorbalenya, y E. J. Snijder. 1997. Alternative proteolytic processing of the arterivirus replicase ORF1a polyprotein: evidence that Nsp2 acts as a cofactor for the Nsp4 serine protease. J. Virol. 71:9313-9322.

69. Wensvoort, G., C. Terpstra, J. M. Pol., E. A. ter Laak, M. Bloemrad, E. P. deKluyer, C. Kragten, L. van Buiten, A. den Besten, F. Wagenaar, J. M. Broekhuijsen, P. L. J. M. Moonen, T. Zetstra, E. A. de Boer, H. J. Tibben, M. F. de Jong, P. van't Veld, G. J. R. Groenland, J. A. van Gennep, M. T. H. Voets, J. H. M. Verheijden, y J. Braamskamp. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet. Quarterly 13:121-130.

70. Widjojoatmodjo, M. N., van Gennip, H. G., Bouma, A., van Rijn, P. A., Moormann, R. J. (2000). Classical swine fever virus E(ms) deletion mutants: trans-complementation and potential use as non transmissible, modified, live-attenuated marker vaccines. J Virol 74, 2973-2980.

71. Wu, W. H., Fang, Y., Rowland, R. R. R., Lawson, S. R., Christopher-Hennings, J., Yoon, K. J. y Nelson, E. A. (2005). The 2b protein as a minor structural component of PRRSV. Virus Res 114, 177-181.

72. Wu, W. H., Y. Fang, R. Farwell, M. Steffen-Bien, R. R. Rowland, J. Christopher-Hennings, y E. A. Nelson. 2001. A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF 2b. Virology 287:183-191.

73. Zeman, D., R. Neiger, M. Yaeger, E. Nelson, D. Benfield, P. Leslie-Steen, J. Thomson, D. Miskimins, R. Daly, y M. Minehart. 1993. Laboratory investigation of PRRS virus infection in three swine herds. J. Vet. Diagn. Invest. 5:522-528.

74. Y. Fang, B. Neiger, T. Hawkins, J. Christopher-Hennings, R. Rowland, E. Nelson, Proc. Conf. Res. Work. Anim. Dis., abstr. 78, 2004

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> South Dakota State University

Fang, Ying

Nelson, Eric A.

Hennings, Jane

<120> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino de tipo 1 norteamericano recombinante y métodos de uso

<130> 1210. 1112111

<150> 60/496, 080

<151> 2007-06-25

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 1

gcatggctct taaggcagac 20

<210>2

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 2

cagcttcaag gcagttgtca 20

<210>3

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 3

tgttgtgatc ggcggtatta 20

<210>4

<211> 27

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 4

cggcgcgggc acacatttcg tcaattt 27

<210>5

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 5

tacgacctat ccacccaagg 20

<210>6

<211> 22

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 6

gaatctatgg ttatcgcaga gc 22

<210>7

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 7

cctcgatgag gctggatatt 20

<210>8

<211> 23

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 8

gcaccaacca ggaggaaaaa agc 23

<210>9

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 9

cattcttgcg tccctcaaat 20

<210> 10

<211> 23

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 10

cgacagtctt tctgccatca atg 23

<210> 11

<211> 19

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 11

gctgctgttg tcctgtgtt 19

<210> 12

<211> 21

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 12

ccgtcgaagg gggtggcatc c 21

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 13

tcattcgagc tgaccatcaa 20

<210> 14

<211> 21

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 14

ctttatcatt gcacccagca a 21

<210> 15

<211> 42

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 15

ggcgcgccta atacgactca ctatagatga tgtgtagggt at 42

<210> 16

<211> 25

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 16

cgcgggcgcc tgagttcgac aaatt 25

<210> 17

<211> 22

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 17

caacgatcct accgccgcac aa 22

<210> 18

<211> 79

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 18

ggcgatcggg cgtctaggaa ttctagattt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 60

tttttttaa tttggtcac 79

<210> 19

<211> 23

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 19

ggcgatcggg cgtctaggaa ttc 23

<210> 20

<211> 22

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 20

caacgatcct accgccgcac aa 22

<210> 21

<211> 22

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 21

ggccccagtg ctgcaatgat ac 22

<210> 22

<211> 31

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 22

agaagaaaaa gaaaagtact gctccaatgg g 31

<210> 23

<211> 30

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 23

ccccattgga gcagtacttt tctttttctt 30

<210> 24

<211> 28

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 24

gctcagatgg tgagcaaggg cgaggagc 28

<210> 25

<211> 31

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 25

gagtctgaag aggacttgta cagctcgtcc a 31

<210> 26

<211> 28

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 26

tgctgacttt cttgctgatc cacctcct 28

<210> 27

<211> 26

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 27

ccttgctcac catctgagca ctcccg 26

<210> 28

<211> 29

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 28

gctgtacaag tcctcttcag actccaaga 29

<210> 29

<211> 22

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 29

gcggacccag ccaggatcag ac 22

<210> 30

<211> 100

<212> PRT

<213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino; 691 a 790 de ORF1a

<400> 30

Gln Glu Ser Gly His Lys Ala Val His Ala Val Pro Leu Ala Glu Gly
1 5 10 15

Pro Asn Asn Glu Gln Val Gln Val Val Ala Gly Glu Gln Leu Glu Leu
20 25 30

Gly Gly Cys Gly Leu Ala Ile Gly Ser Ala Gln Ser Ser Ser Asp Ser
35 40 45

Lys Arg Glu Asn Met His Asn Ser Arg Glu Asp Glu Pro Leu Asp Leu
50 55 60

Ser His Pro Ala Pro Ala Ala Thr Thr Thr Leu Val Gly Glu Gln Thr
65 70 75 80

Pro Asp Asn Pro Gly Ser Asp Ala Ser Ala Leu Pro Ile Ala Val Arg
85 90 95

Gly Phe Val Pro

100

<210> 31

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial; inserción de GFP

<400> 31

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Met
145 150 155 160

Glu Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp
165 170 175

Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly
180 185 190

Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser
195 200 205

Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu

210 215 220

Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr
225 230 235 240

Lys

<210> 32

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial; Cebador

<400> 32

caagtcctct acagggccca tactc 25

<210> 33

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial; Cebador

<400> 33

ggccctgtag aggacttgta cagctc 26

<210> 34

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial; Cebador

<400> 34

cttgctgatc cacctcctca gg 22

<210> 35

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial; Cebador

<400> 35

ccgtcggagg gggtggcatc c 21

<210> 36

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial; Cebador

<400> 36

gtctgtgtcc ttggacgagt g 21

<210> 37

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial; Cebador

<400> 37

ccaagcggcc aaggatagat c 21

<210> 38

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial; Cebador

<400> 38

cgggatccat ggtgagcaag ggcgaggagc 30

<210> 39

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial; Cebador

<400> 39

cctaagcttc cttgtacagc tcgtccatgc cg 32

<210> 40

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial; Cebador

<400> 40

gcagatcttc agactccaag agagaa 26

<210> 41

<211> 41

<212> ADN

<213> Artificial; Cebador

<400> 41

gcagatctgg tggtggtggt tcctcagact ccaagagaga a 41

<210> 42

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial; Cebador

<400> 42

cccaagcttg cggggatccc gggacaaatc ctcg 34

<210> 43

<211> 15521

<212> ADN

<213> Artificial; virus marcador de SD01-08 GFP/ES4

<400> 43

atgatgtgta gggtatcccc cctacataca caacactttt tgtgtttgtg tactttggag 60
gcgtgggtac agccccgccc cacccccttgg cccctgttct agcccaacag gtatccttct 120
ccctcggggc gagtgcgccg cctgctgctc ccttgcagtg ggaaggacct cccgagtatt 180
tccggagagc acctgcttta cgggatctcc acccttttaac catgtctggg acgttctccc 240
ggtgcatgtg caccccggct gcccgggtat tttggaacgc cggccaagtc ttttgcacac 300

ggtgtctcag tgcgcggcct cttctctctc cggaacttca ggacactgac ctcggtgtag 360
ttggattgtt ttacaagcct aaggacaaga ttcactggaa agttcctatc ggcattcctc 420
aggtggagtg tactccatcc gggtgctgct ggctctcagc cgtattccct ttggcgcgca 480
tgacttccgg taatcacaac ttcctccaac gacttgttaa ggttgctgat gttttgtatc 540
gcgatggttg cttggcgcct cgacacctcc gtgaactcca agtttacgag cgcggttgta 600
gctggtaccc aattacgggg cccgtacccg gaatgggttt gtttgcgaac tccatgcacg 660
tgtctgacca gccgttccct ggtgccaccc atgtgttgac taactcgcct ctgcctcagc 720
gggcgtgccg gcagccgttc tgtccatttg aggaagctca ttctgacgtt tacaggtgga 780
agaaatttgt gatttttacg gactcctctc ccaacggtcg atttcgcatg atgtggacgc 840
cggaatccga tgactcagcc gccctggagg tgctgccgcc cgagttagaa cgtcaggtcg 900
agatcctcac tcggagtttt cccgctcatc accctatcaa cctagctgac tgggagctca 960
ctgagtcccc tgagaacggt ttttctttcg gcacgtccca ttcttgcggc cacatcgtcc 1020
agaaccccaa cgtgtttgac ggcaagtgct ggctcacctg ctttttgggc caatcggctg 1080
aagtgtgcta ccacgaggaa catctagcta acgccctcgg ttaccaaacc aagtggggcg 1140
tgcatggtaa gtacctccaa cgcaggcttc aagtccgcgg catgcgtgct gtggtcgatc 1200
ctgacggccc tattcacgtt gaagcgctgt cttgctccca gtcttgggtc aggcacctga 1260
ctctgaataa tgatgtcacc ccaggattcg ttcgcctgac atccatccgc attgtgtcca 1320
acacagaacc caccgctttc cggatctttc ggtttggagc acataagtgg tatggcgctg 1380
ccggcaaacg ggctcgtgcc aaacgtgcca ccaaaagtgg gaaggattcg gccctcgctc 1440
ccaagattgc cccaccggtc cccacctgtg gaatcaccac ctactctcca ccgacagacg 1500
ggtcttgtgg ttggcacgtt cttgccgcca tagtgaatcg gatgataaac ggtgacttta 1560
cgtccccccct gcctcagtac aacagaccag aggatgattg ggcttctgat tatgatcttg 1620
ctcaggcgat tcaatgttta caactgcctg ccaccgtggt tcggaatcgc gcctgtccta 1680
acgccaagta cctcataaag ctaaacgggg ttcactggga agtagaggtg agatctggaa 1740
tggctcctcg ttccctttct cgtgaatgtg tagttggcgt ttgctctgaa ggctgtgtcg 1800
caccgcctta tccagcggac gggcttccta aacgtgcact cgaggccttg gcgtctgcct 1860
acagactacc ctcagattgt gttagctctg gtattgctga ctttcttgct gatccacctc 1920
ctcaggaatt ctggactctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccggag cggtccggct 1980
tctccagctt gtataaatta ctcttagagg ttgttccgca aaaatgtggt gctacggaag 2040
gggctttcgt ctatgctgtt gagaggatgt taaaggactg tccgagcccc gaacaggcca 2100
tggcccttct ggcaaaaatt aaagttccat cctcaaaggc cccgtctgtg tccttggacg 2160
agtgttttcc tgcgggtgtt ccagccgact tcgagccagc atttcaggaa aggccccaaa 2220

gtcccggtgc tgctgtcgcc ctgtgttcac cggacgcaaa agggttcgag ggaacagcct 2280
cggaagaagc tcaagagagt ggccataagg ccgtccacgc tgtacccctt gccgaaggtc 2340
ccaataatga acaggtacag gtggttgctg gtgagcagct agagctcggc ggttgtggtt 2400
tggcaatcgg gagtgctcag atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc 2460
ccatcctggt cgagctggac ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg 2520
gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc 2580
tgcccgtgcc ctggcccacc ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc 2640
gctaccccga ccacatgaag cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg 2700
tccaggagcg caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga 2760
agttcgaggg cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg 2820
acggcaacat cctggggcac aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca 2880
tggccgacaa gcagaagaac ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg 2940
acggcagcgt gcagctcgcc gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg 3000
tgctgctgcc cgacaaccac tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg 3060
agaagcgcga tcacatggtc ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca 3120
tggacgagct gtacaagtcc tctacagggc ccatactccg tcatgttgag cactgcggca 3180
cagagtcagg cgacagcagt tcgcctttgg atctgtcttt tgcgcaaacg ttggaccagc 3240
ctttagatct atccttggcc gcttggccgg tgaaggccac cgcgtctgat cctggctggg 3300
tccgcggtag gtgcgagcct gtctttttaa agcctcggaa agctttctct gatggcgatt 3360
cggcccttca gttcggggag ctttctgagt ccagctctgt catcgagttt gaccagacaa 3420
aagatactct ggtggctgac gcccctgttg acttgacgac ttcgaacgag gccctctctg 3480
cagtcgaccc ttccgaattt gtcgaactca ggcgcccgcg tcattccgca caagccttaa 3540
ttgaccgagg cggtccactt gctgatgtcc atgcgaaaat aaagaaccgg gtgtatgaac 3600
agtgcctcca agcttgtgag cctggtagtc gtgcaacccc agccaccagg gagtggctcg 3660
acaaaatgtg ggatagggtg gacatgaaaa cttggcgctg cacttcacag ttccaggccg 3720
gtcgcattct tgcgtccctc aaatttcttc ctgacatgat tcaagacacg ccgcctcctg 3780
tccccaagaa gaaccgagct agtgacagtg ccggtcagac cgtccctccg cctacggata 3840
tccagcaaga ggatgccacc ccctccgacg ggttatccca tgcatcggat ttttctagtc 3900
gagtgagcac gagctggagt tggaaaggcc ttatgctttc cggcacccgt ctcgcggggt 3960
ctgctggtca gcgcctcatg acatgggttt ttgaagttta ctcccatctc ccagctttta 4020
tactcacact tttctcgccg cggggctcta tggctccagg cgattggttg tttgcaggtg 4080

ttgttttact tgctctcttg ctctgtcgtt cttacccaat actcggatgc cttcccttac 4140
tgggtgtctt ctctggttct ttgcggcgtg ttcgtctggg tgtttttggt tcttggatgg 4200
cttttgctgt atttttattc tcgactccat ccaacccagt cggttcttct tgtgaccacg 4260
attcgccgga atgtcatgct gagcttttgg ctcttgagca gcgccaactt tgggaacctg 4320
tgcgcggcct tgtggttggc ccctcaggtc tcttatgtgt catccttggc aagttactcg 4380
gtgggtcacg tcatctctgg catgttatcc tacgtttatg catgcttaca gatttggccc 4440
tttctcttgt ttatgtggtg tcccaagggc gttgtcacaa gtgttgggga aagtgtataa 4500
ggacagctcc tgctgaggtg gctctcaatg tatttccttt ctcgcgcgcc actcgcaact 4560
ctctcacatc cttgtgtgat cggttccaaa ctcctaaagg agttgatccc gtgcacttgg 4620
caacgggttg gcgcgggtgt tggcgtggtg agagtcccat ccatcaacca caccaaaagc 4680
ccatagctta tgccaatttg gatgaaaaga aaatatctgc tcaaacggtg gttgctgtcc 4740
catacgaccc cagtcaggct atcaaatgtc tgaaggttct gcaggcggga ggggctatcg 4800
tggaccagcc tacgcctgaa gttgttcgtg tgtctgaaat cccctttca gccccatttt 4860
tcccaaaagt tccagtcaac ccagattgca ggattgtggt ggattcagat actttgtgg 4920
ctgcagtccg ctgcggttac tcgacagcac aactggtcct aggccggggc aactttgcca 4980
agttgaatca gaccccccctt agggactctg cctccaccaa aacgactggt ggggcctctt 5040
atactcttgc tgtggctcaa gtgtctgtgt ggactcttgt tcatttcatc ctcggtcttt 5100
ggttcacatc acctcaagtg tgtggccgag gaaccgctga cccatggtgt tcaaatccct 5160
tttcgtatcc tgcctacggc cctggagttg tgtgctcctc tcgactttgt gtgtctgccg 5220
atggggtcac cctgccattg ttctcagctg tggcacaact ctccggtaga gaggtaggga 5280
tttttatttt agtgcttgtt tccttgactg ccttggccca tcgcctggct cttaaggcag 5340
acatgttagt ggtcttttca gctttttgtg cttacgcctg gcccatgagc tcctggttaa 5400
tctgcttctt tcctatactc ttaaagtggg ttacccttca ccccctcact atgctttggg 5460
tgcactcatt cttggtgttt tgtatgccag cagccggcat cctctcacta gggataactg 5520
gccttctctg ggcagttggc cgctttaccc aggttgccgg aattattaca ccttatgaca 5580
tccaccagta tacctctggg ccacgcggtg cagccgctgt agccacagcc ccagaaggca 5640
cttatatggc cgccgtccgg agagctgctt taactggacg aactttgatc ttcaccccgt 5700
ctgcggtcgg atcccttctt gaaggtgctt tcaggactca taaaccctgc cttaacaccg 5760
tgaatgttgt gggttcttcc cttggttctg gaggggtttt taccattgat ggcagaaaga 5820
ccgtcgtcac tgctgctcat gtgttgaacg gcgacacagc tagagttacc ggcgactctt 5880
acaaccgcat gcacactttt aagaccagtg gcgattatgc ctggtcccat gctgatgact 5940
ggcagggcgt tgcccctgtg gtcaaggttg cgaaggggta tcgcggtcgt gcctactggc 6000

aaacatcaac cggtgtcgaa cccggcgtca ttggggaagg gttcgccttc tgtttcacca 6060
actgtggcga ttcggggtca cccgtcatct cagaatctgg tgatctcatc ggaatccata 6120
ccggttcaaa caaactcggt tctggtcttg tgacgacccc tgaaggggaa acctgcgcca 6180
tcaaagaaac caagctctct gacctttcca gacattttgc gggcccgagc gtccctcttg 6240
gggacattaa attgagtccg gccatcgtcc ctgatgtaac atctattccg agtgacttgg 6300
catcgctcct agcttccgtc cctgtaatgg aaggcggcct ctcgaccgtt caacttctgt 6360
gtgtcttttt ccttctctgg cgcatgatgg gccatgcctg gacacccatt gttgccgtgg 6420
gcttcttttt gctgaatgaa attcttccag cagttttggt ccgagccgtg ttttcctttg 6480
cactctttat tcttgcatgg gccacccccct ggtccgcaca ggtgttaatg attagactcc 6540
tcacggcatc cctcaaccgc aacaagttgt ctctggcgtt ctacgcactt gggggtgtcg 6600
tcggtttggc cgctgaaatc ggggcttttg ccggcaggct gcctgaattg tctcaagctc 6660
tttcgacata ctgtttctta cctagggtcc ttgccatggc cagttatgtt cccatcatca 6720
tcattggtgg actccatgcc ctcggtgtga ttctgtggtt gttcaaatac cggtgcctcc 6780
acaacatgct ggttggtgat gggagtttct caagcgcttt cttcctacgg tattttgcag 6840
agggtaatct tagaaaaggt gtttcacagt cttgtggcat gagtaacgag tccctgacgg 6900
ctgctctagc ttgcaagttg tcgcaggctg accttgactt tttgtccagc ttaacgaact 6960
tcaagtgctt tgtatctgct tcaaacatga aaaatgctgc cggccagtat attgaagcag 7020
cgtatgccaa ggccctgcgc caagagttgg cctccctagt tcaggttgac aaaatgaaag 7080
gaattttgtc taagcttgag gcctttgctg aaacagccac tccgtccctt gacgcaggtg 7140
acgtggttgt tctgcttggg caacatcctc acggatccat cctcgatatt aatgtgggga 7200
ctgaaaggaa aactgtgtcc gtgcaagaga cccggagctt aggtggttcc aaattcagtg 7260
tttgcactgt cgtgtccaac acacccgtgg acgccttaac tggcatccca ctccagacac 7320
caacccctct ttttgagaat ggtccgcgtc accgtggtga ggaagacgat cttagagtcg 7380
agaggatgaa gaaacactgt gtgtccctcg gcttccacaa cattaatggc aaagtttact 7440
gcaaaatttg ggacaagtcc accggtgata ccttttatac cgatgattcc cggtacaccc 7500
aagaccttgc attccaggac aggtcagccg actacagaga cagggattat gagggtgtgc 7560
aaaccgcccc ccaacagggc tttgatccaa agtctgaaac ccctattggc actgtggtga 7620
tcggcggtat cacgtataac aggtacctga tcaaaggtaa ggaggtcttg gttcccaagc 7680
ctgacaactg ccttgaagct gccaagctgt cccttgagca agctctcgct gggatgggcc 7740
aaacttgcga ccttacagct gccgaggtgg aaaagttgag gcgcatcatt agccagctcc 7800
aaggtttgac cactgaacag gctttaaact gttagccgcc agcggcttga cccgctgtgg 7860

ccgcggcggc ttagttgtaa ctgaaacagc ggtaaaaatc gtaaagtacc acagcagaac 7920
tttcacccta ggccctctgg acctgaaagt cacctccgag gctgaggtaa agaaatcaac 7980
tgagcagggc cacgctgttg tggcaaactt atgttctggt gtcatcttga tgagacctca 8040
cccaccgtcc cttgttgatg ttcttctgaa acccggactt gacacaaaac ccggcattca 8100
accagggcat ggggccggga atatgggcgt agacggctct acttgggatt ttgaaaccgc 8160
acccacaaag gcagaacttg agttgtccaa acaaataatt caagcatgtg aagttaggcg 8220
cggggacgcc ccgaacctcc aactccctta caagctctat cctgttagag gggatcctga 8280
gcggcatggg ggccgcctta tcaataccag gtttggagat ctatcttaca aaacccctca 8340
agacaccaag tccgcaatcc atgcggcttg ttgcctgcac cccaacgggg cccctgtgtc 8400
tgatggtaag tcaacactag gtaccaccct tcaacatggt ttcgaacttt atgtccccac 8460
tgtgccctat agtgtcatgg agtacctcga ttcacgccct gacacccctt tcatgtgcac 8520
taaacatggt acttccaagg ctgctgcaga agacctccaa aaatacgacc tatctactca 8580
aggatttgtc ctgcccgggg tcttacgcct tgtacgcaga ttcatctttg gccatattgg 8640
taaggcaccg ccattgttcc tcccgtcaac ctatcccgct aaaaattcta tggcagggat 8700
caatggccag aggttcccaa caaaggacgt ccagagcata cctgaaattg acgaaatgtg 8760
tgcccgcgcc gtcaaggaga attggcaaac tgtgacacct tgtaccctca agaaacagta 8820
ctgttccaag cccaaaacca ggaccatcct gggcaccaac aactttattg ccctggctca 8880
ccgatcggcg ctcagtggtg tcacccaggc attcatgaag aaggcttgga agtccccgat 8940
tgccttggga aaaaacaaat tcaaggagct gcattgcact gtcgccggca ggtgtcttga 9000
agccgacttg gcctcctgtg accgcagcac ccccgccatt gtgaggtggt tcgtcgccaa 9060
cctcctgtat gaacttgcag gatgtgaaga gtacttgcct agctatgtgc ttaactgctg 9120
ccatgacctt gtggcaacac aggatggtgc cttcacaaaa cgcggtggcc tgtcgtccgg 9180
ggaccccgtc accagtgtgt ctaacaccgt atattcactg ataatctatg cccagcacat 9240
ggtgttgtcg gccttaaaaa tgggtcatga aatcggtctc aagttcctcg aggaacagct 9300
caaattcgag gacctcctcg aaatccagcc tatgttggtc tattctgatg accttgtctt 9360
gtacgctgaa aggcccactt ttcctaatta tcactggtgg gtcgagcacc ttgacctaat 9420
gctgggtttc agaacggacc caaagaagac agtcataact gataaaccca gcttcctcgg 9480
ctgcagaatt gaggcggggc gacagctggt ccctaatcgc gaccgcatcc tggctgctct 9540
cgcatatcac atgaaggcgc agaacgcctc agagtattat gcgtctgctg ccgcaatcct 9600
gatggattca tgtgcttgca ttgatcatga ccctgagtgg tatgaggacc tcatctgcgg 9660
tatcgcccga tgcgcccgcc aggatggtta tagtttccca ggcccggcat ttttcatgtc 9720
catgtgggaa aagctgagaa gtcacaatga agggaagaaa tttcgacact gcggcatctg 9780

cgacgccaaa gccgaccatg catccgcctg tgggcttgat ttgtgtttgt tccactcaca 9840
ctttcatcaa cactgccccg tcactctgag ctgtggtcat catgccggtt caagggaatg 9900
ttcgcagtgt cagtcacctg ttggggctgg cagatctcct cttgatgccg tgctaaaaca 9960
aatcctgtac aaacctcctc gtacagtcat catgaaggtg ggtaacaaaa caacggccct 10020
cgatccgggg aggtaccagt cccgtcgagg tcttgttgca gtcaagaggg gtattgcagg 10080
caatgaagtt gatcttcctg atggggacta ccaagtagtg cctcttttac caacttgtaa 10140
agacataaac atggtaaagg tggcttgcaa tgtactactc agtaagttca tagtggggcc 10200
accaggttcc ggaaagacca cctggttact gagtcaagtc caggacgatg atgtcattta 10260
cacacccacc catcagacca tgtttgatat agtcagtgct ctcaaagttt gcaggtattc 10320
tattccagga gcctcaggac ttcctttccc accacctgcc aggtccgggc cgtgggttag 10380
gctcgtggcc agcgggcacg tccccggccg aacatcatac ctcgatgagg ctggatattg 10440
taatcatctg gacattctca gactgctttc caaaacaccc ctcgtgtgtt tgggtgacct 10500
tcaacaactt caccctgtcg gctttgactc ctactgttat gtgtttgatc agatgcctca 10560
aaagcaactg accactattt atagatttgg ccctaacatc tgcgcagcca tccagccttg 10620
ttacagggag aagcttgaat ctaaggctag gaacaccagg gtggtcttta ccacctggcc 10680
tgtggccttt ggtcaggtgc tgacaccata ccataaagat cgcatcggct ctgcgataac 10740
catagactca tcccaggggg ccactttcga cattgtgaca ttgcatctac catcaccaaa 10800
gtccctaaat aaatcccgag cacttgtagc catcactcgg gcaagacacg ggttgttcat 10860
ttatgaccct cacaaccagc tccaggagtt tttcaacctg atccctgagc gcactgattg 10920
caaccttgtg ttcagccgtg gggatgatct ggtagttctt agtgcggaca atgcagtcac 10980
aactgtagcg aaggccctag ggacaggtcc atctcgattt cgagtatcag acccgaggtg 11040
caagtctctc ttagctgctt gttcggccag tctggagggg agctgtatgc cactaccaca 11100
agtggcacat aacctggggt tttacttctc cccagacagt ccagcatttg cacctctgcc 11160
aaaggagtta gcgccacatt ggccagtggt tactcaccag aacaatcggg cgtggcccga 11220
tcgacttgtc gctagtatgc gcccaattga tgcccgctac agcaagccaa tggtcggtgc 11280
agggtatgtg gtcgggccgt ccacctttct tggtactcct ggtgtagtgt catactacct 11340
cacgctatac atcaggggtg agccccaggc cttgccagag acactcgttt caacaggacg 11400
catagccact gactgccggg agtatctcga cgcggctgag gaagaggcag caaaagaact 11460
cccccacgca ttcattggcg atgtcaaagg taccacggtc ggggggtgtc accacatcac 11520
atcaaaatac ctacccagga ccctgcctaa ggactctgtt gctgtagttg gagtaagctc 11580
gcccggcagg gctgctaaag ccatgtgcac tctcactgat gtgtatctcc ccgaactccg 11640

gccatacctg caacctgaga cggcgtcgaa atgctggaaa ctcaaattag acttcaggga 11700
cgtccgacta atggtctgga aaggagccac cgcctatttc cagttggaag gacttacatg 11760
gtcagcgctg cctgactatg ccaggtttat tcagcttccc aaggacgccg ttgtgtacat 11820
tgatccgtgt ataggaccgg caacagccaa ccgcaaggtc gtgcgaacca cagactggcg 11880
ggccgacctg gcagtgacac cgtatgatta cggtgcccag aacattttga caacagcctg 11940
gttcgaggac ctcgggccgc agtggaagat tttggggttg cagcccttca ggcgggcatt 12000
tggctttgaa aatactgagg attgggcaat ccttgcacgc cgtatgagtg acggcaaaga 12060
ctacactgac tacaactggg attgtgttcg agaacgccca cacgccatct acgggcgtgc 12120
tcgtgaccat acatatcatt ttgcccccgg cacggaattg caggtagagc tgggtaaacc 12180
ccggctgccg cctggacgag agccgtaaac ttggagtgat gcaatggggt cactgtggag 12240
taaaatcagc cagctgttcg tggatgcctt cactgagttt cttgtcagtg tggttgatat 12300
tgtcattttc cttgccatac tgtttgggtt caccgtcgca ggatggttat tggtctttct 12360
tctcagagtg gtttgctccg cgcttctccg ttcgcgctct gccattcact ctcccgaact 12420
atcgaaggtc ctatgaaagc ttgttgccca actgcaggcc ggatgtccca caatttgcat 12480
ttaagcaccc attgggtata ctttggcaca tgcgagtttc ccacctgatt gatgagatgg 12540
tctctcgccg catttaccag accatggaac attcaggtca agcggcctgg aaatatgtgg 12600
tcggtgaggc cactctcacg aagctatcaa agcttgatat agttactcat ttccaacatc 12660
tggccgcagt agaggcggat tcttgccgct ttctcagctc acgactcgtg atgctaaaaa 12720
atcttgccgt tggcaatgtg agcctacagt acaacaccac gttggatcgc gttgaactca 12780
ttttccccac gccaggtacg aggcccaagt tgaccgactt cagacaatgg ctcatcagtg 12840
tgcatgcttc catttttcc tctgtggctt catctgttac cttgttcata gtgctttggc 12900
tgcgaattcc agctctacgc tatgtttttg gtttccattg gcccacggca acacatcatt 12960
cgagctgacc atcaattata ccatatgcat gccctgtctt accagtcaag cagctcgcca 13020
aaggctcgag cccggtcgta acatgtggtg cagaataggg catgataggt gtgaggagcg 13080
tgaccatgat gagttgttaa tgtccatccc gtccgggtac gacaacctca aacttgaggg 13140
atattatgct tggctggctt ttttgtcctt ttcctacgcg gcccaattcc atccggagct 13200
gttcgggata gggaatgtgt cgcgcgtctt cgtggacaag cgacaccagt ttatttgtgc 13260
cgagcatggt ggactcaatt caaccttatc taccgagcac aatatctccg cattatatgc 13320
ggtatattat caccaccaaa tagacggggg taattggttc catttggaat ggctgcggcc 13380
gctttttcc tcctggttgg tgctcaacat atcatggttt ctgaggcgtt cgcctgtaag 13440
ccctgtttct cgacgcatct atcagatatt aagaccaaca cgaccgcggc tgccggtttc 13500
atggtccttc agaacatcaa ttgttcccgg cctcacgagg cctcagcaac gcaaggtcaa 13560

gttccctcca gaaagtcgtc ccaatgccgt gaagccgtcg gtgttcccca atacatcacg 13620
ataacggcca acgtgaccga cgaatcatat ttgtacaacg cggacttgct gatgctttct 13680
gcgtgccttt tctacgcctc ggaaatgagc gagaaaggct ttaaagttat ctttgggaat 13740
gtctctggcg ttgtttctgc ttgtgtcaat ttcacagatt atgtggccca tgtgacccaa 13800
catacccagc agcatcatct ggtgattaat cacatccggt tactgcactt cctgacacca 13860
tctgcaatga ggtgggctac aaccattgct tgtctgttcg ccattctctt ggcgatatga 13920
aatgttctca caaattgggg cattccttga ctccgcactc ttgcttctgg tggctttttt 13980
tgctgtgtac cggcttgtcc tggtcctttg ccgatggcaa cggcaacaac tcgacatacc 14040
aatacatata taatttgacg atatgcgagt tgaatgggac caattggctg tccggccatt 14100
ttgaatgggc agttgagacc tttgtgcttt acccggttgt cactcatatc ctctcactgg 14160
gttttctcac gacaagtcat ttttttgacg cgctcggtct cggcgctgta tccactgcag 14220
gatttgtcgg agggcggtat gtacttagca gcgtctacgg cgcttgtgct ttcgcagcgt 14280
tcgtatgctt cgtcatccgt gctgctaaaa attgcatggc ctgccgctat gcccgtaccc 14340
ggttcaccaa cttcattgtg gacgaccggg ggggagttca tagatggaag tctccaatag 14400
tggtagaaaa actgggcaaa gccgaaattg gcggcaacct tgtcaccatc aaacatgtcg 14460
tcctcgaagg ggttaaagct caacccttga cgagaacttc ggccgagcaa tgggaggcct 14520
agataatttt tgcaacgatc ctaccgccgc acaaaagatc gtgctagcct tcagcatcac 14580
atacacacct ataatgatat acgcccttaa ggtgtcacgc ggccgactcc tggggctgtt 14640
gcacatccta atatttctga actgttcctt tacattcgga tacatgacat atgtgcattt 14700
tcattctacc caccgtgtcg cacttaccct gggggctgtt gtcgcccttt tgtggggtgt 14760
ctacagcctc acagagtcat ggaagtttat cacttccaga tgcagattgt gttgcctcgg 14820
ccggcgatac attctggccc ctgcccatca cgtagaaagt gctgcaggtc tccattcaat 14880
ctcagcgtct ggtaaccgag catacgctgt gagaaagccc ggactaacat cagtgaacgg 14940
cactctagta ccaggacttc ggagcctcgt gctgggcggc aaacgagctg ttaaacgagg 15000
agtggttaac ctcgtcaagt atggccggta aaaatcagag ccagaagaaa aagaaaagta 15060
cggctccaat ggggaatggc cagccagtca atcaactgtg ccagttgctg ggtgcaatga 15120
taaagtccca gcgccagcaa cctaggggag gacaggctaa aaagaaaaag cctgagaagc 15180
cacattttcc cctggctgca gaagatgaca tccggcacca cctcacccaa actgaacgct 15240
ccctctgctt gcaatcgatc cagacggctt tcaatcaagg cgcaggaact gcgtcgcttt 15300
catccagcgg gaaggtcagt ttccaggttg agtttatgct gccggttgct catacagtgc 15360
gcctgattcg cgtgacttct acatccgcca gtcagggtgc aaattaattt gacagtcagg 15420

tgaatggccg cgattggcgt gtggcctctg agtcacctat tcaattaggg cgatcacatg 15480
ggggtcatac ttaatcaggc aggaaccatg tgaccgaaat t 15521

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna frente al virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino de Tipo 1 norteamericano (US1PRRSV), que comprende una secuencia de ácido nucleico recombinante de SEC ID NO: 43.

2. Un método para diferenciar un animal infectado de forma natural con un virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino de Tipo 1 norteamericano (US1 PRRSV) de un animal vacunado con una vacuna marcadora de US 1 PRRSV, en el que dicha vacuna marcadora comprende un US1 PRRSV recombinante en el que se ha insertado un antígeno extraño (marcador positivo) y en el que se ha suprimido un epítopo inmunógeno (marcador negativo), comprendiendo el método de diferenciación:

incubar una muestra de suero procedente de un animal con una primera proteína de PRRSV recombinante que contiene el marcador positivo, y con una segunda proteína de PRRSV recombinante que carece del epítopo inmunógeno (marcador negativo), y

detectar la unión de anticuerpos en la muestra con las proteínas de PRRSV primera y segunda, en el que la unión de anticuerpos a la proteína marcadora positiva es indicativa de un animal vacunado, mientras que la unión de anticuerpos a la proteína marcadora negativa es indicativa de un animal infectado de forma natural.

3. Un método de la reivindicación 2, en el que la vacuna marcadora es la vacuna de la reivindicación 1.

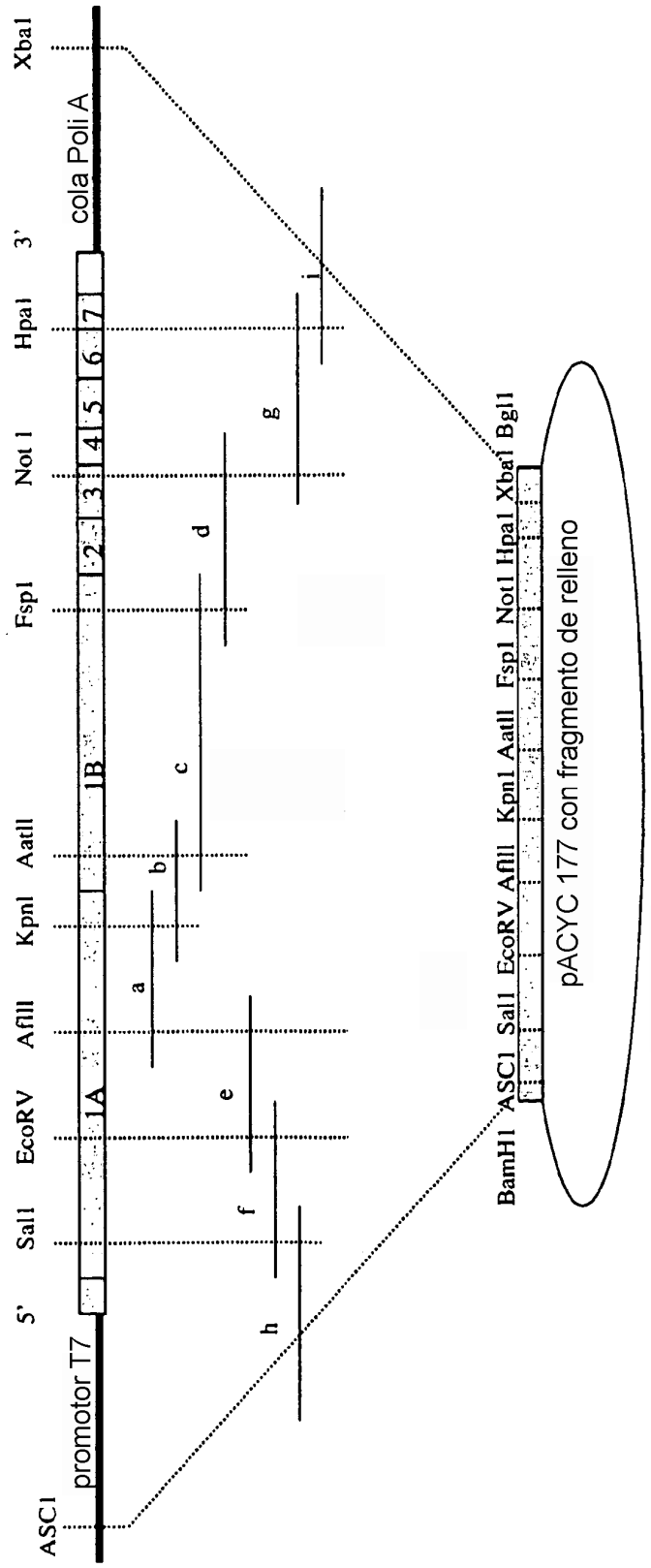

ASC1
promotor T7
5'
Sal1
EcoRV
AflII
KpnI
AatII
Fsp1
Not 1
Hpa1
3'
Xba1
cola Poli A
1A
1B
2
3
4
5
6
7
a
b
c
d
e
f
g
h
i
BamH1
ASC1
Sal1
EcoRV
AflII
KpnI
AatII
Fsp1
Not1
Hpa1
Xba1
Bgl1
pACYC 177 con fragmento de relleno

FIG. 1

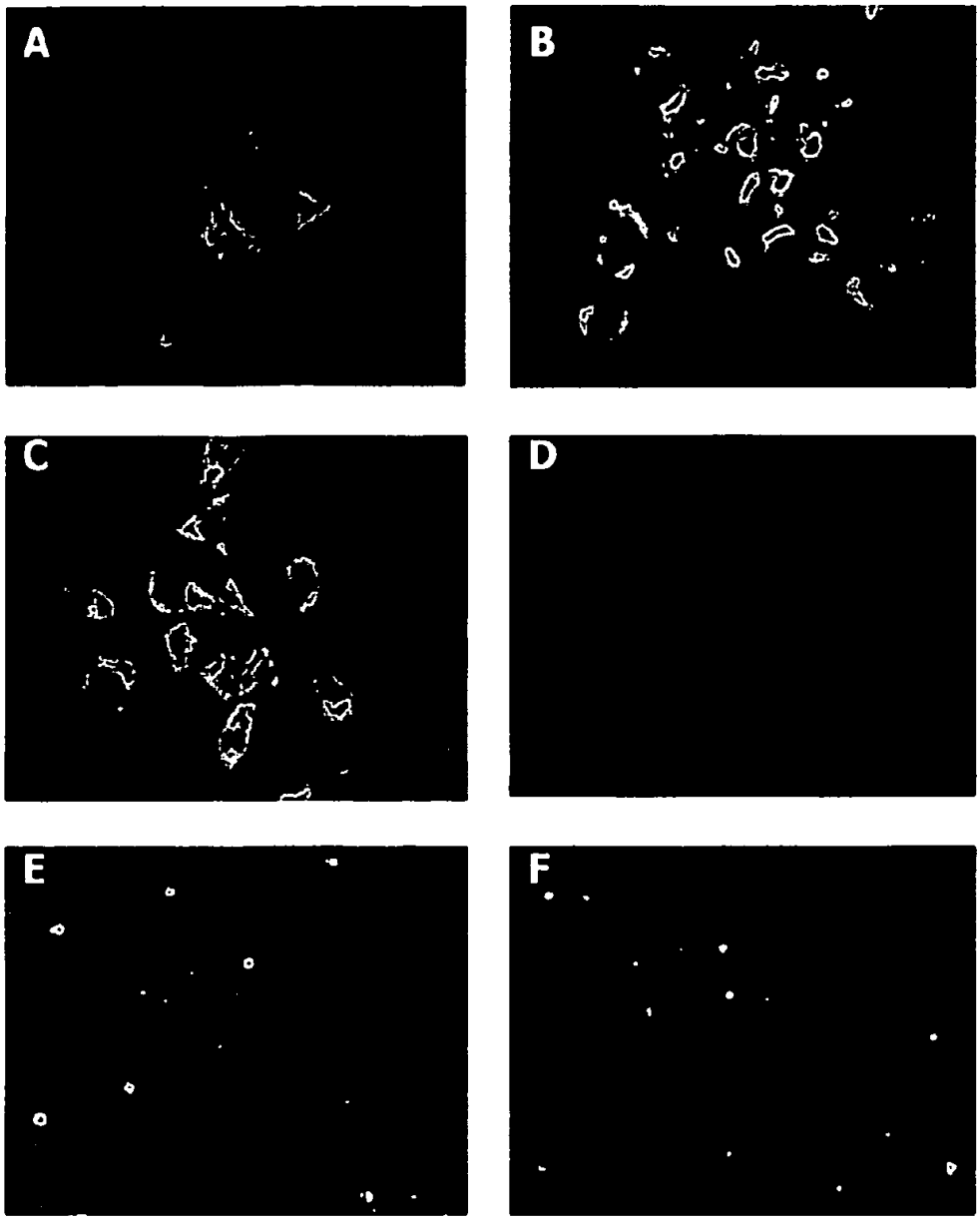


FIG. 2

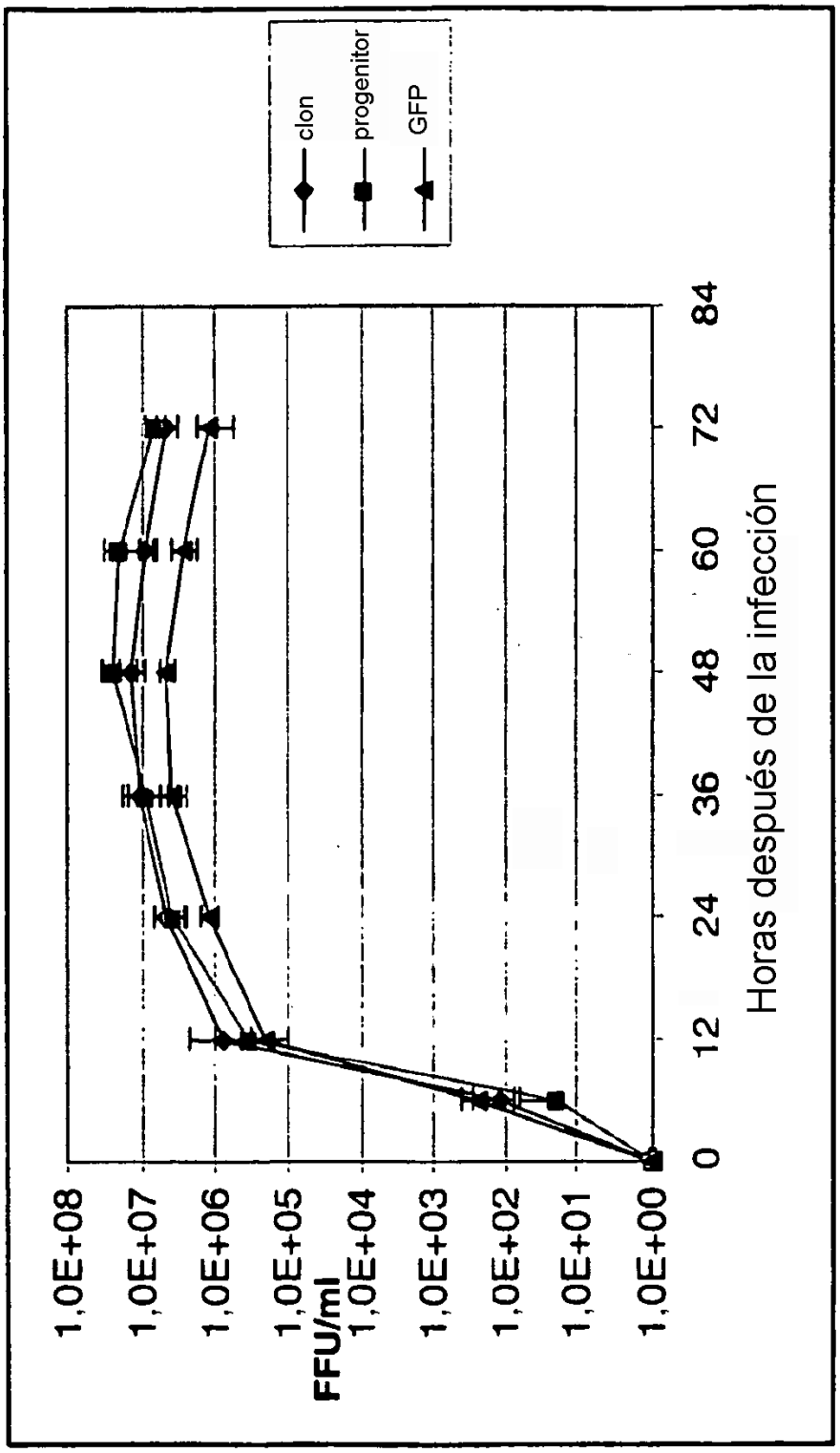

clon
progenitor
GFP
1,0E+08
1,0E+07
1,0E+06
1,0E+05
1,0E+04
1,0E+03
1,0E+02
1,0E+01
1,0E+00
FFU/ml
0
12
24
36
48
60
72
84
Horas después de la infección

FIG. 3

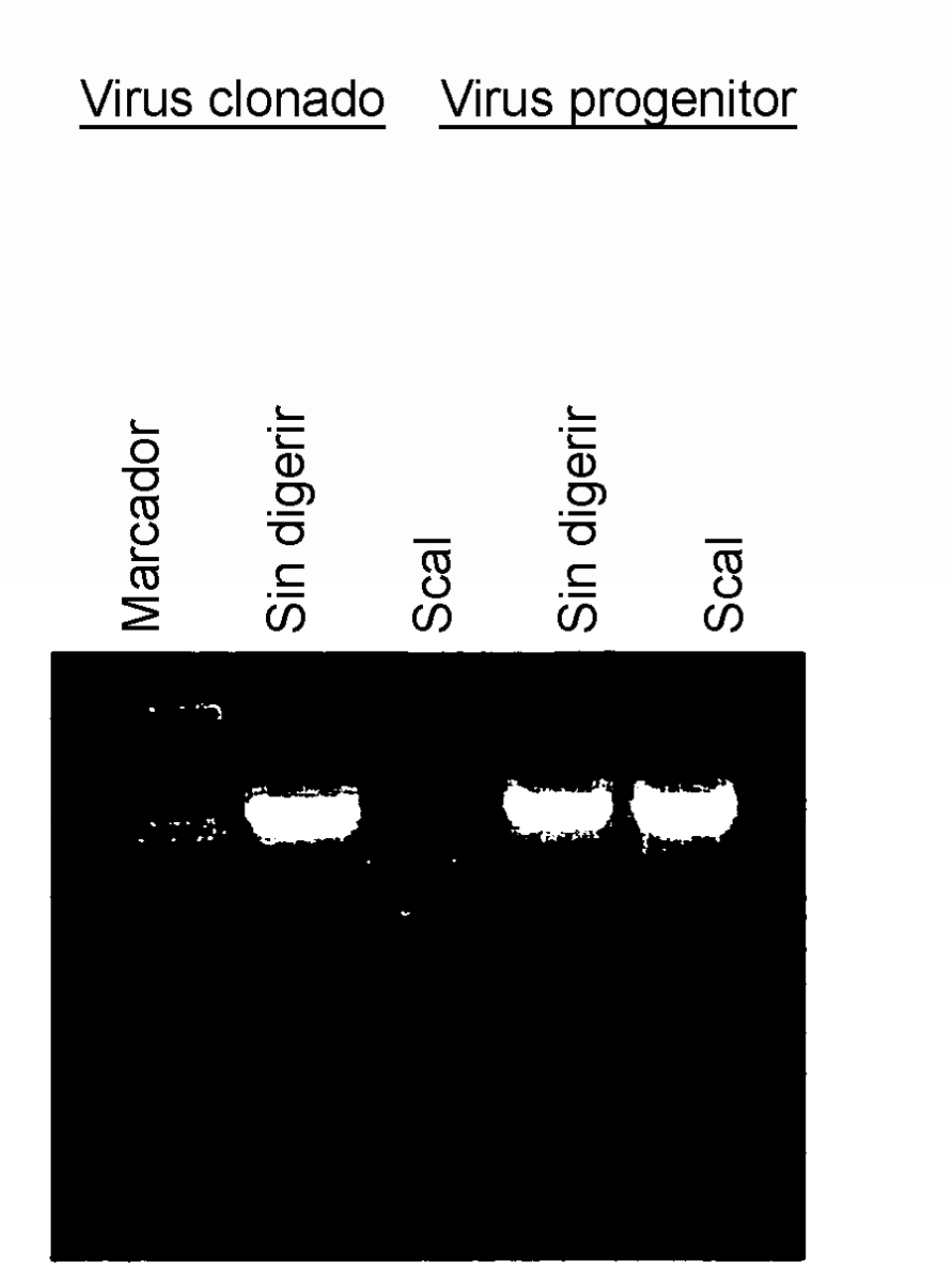

Virus clonado
Virus progenitor
Marcador
Sin digerir
ScaI
Sin digerir
ScaI

FIG. 4

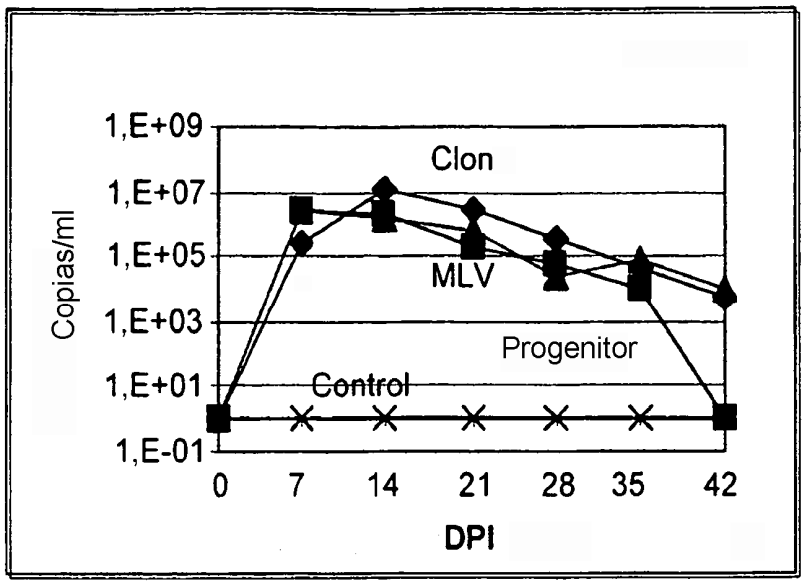

1,E+09
1,E+07
1,E+05
1,E+03
1,E+01
1,E-01
Copias/ml
Clon
MLV
Progenitor
Control
0
7
14
21
28
35
42
DPI

FIG. 5A

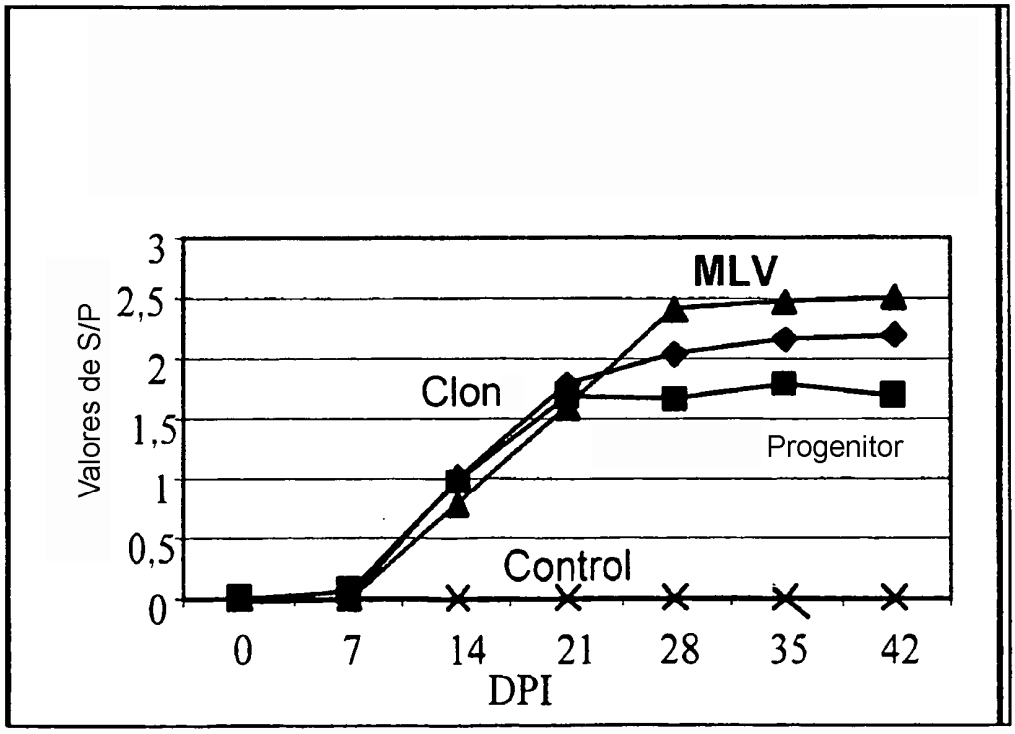

3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Valores de S/P
MLV
Clon
Progenitor
Control
0
7
14
21
28
35
42
DPI

FIG. 5B

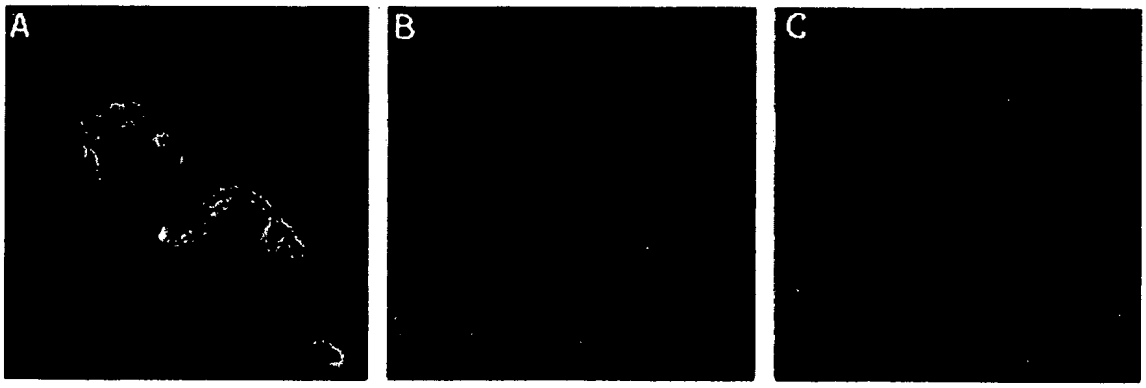


FIG. 6

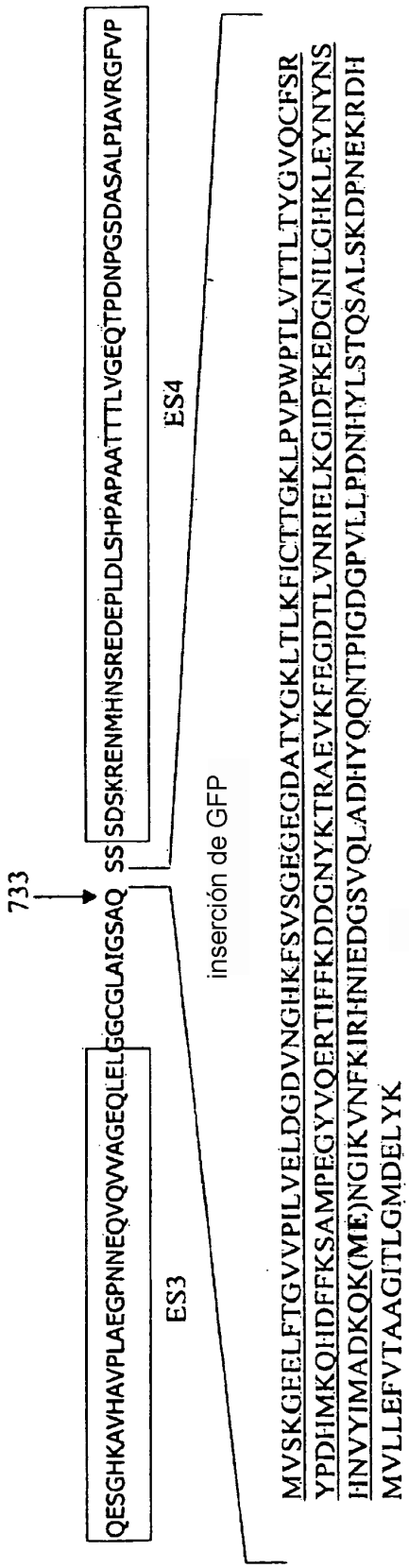

733
QESGHKAVHAVPLAEGPNNEQVQVVAGEQLELGGCGLAIGSAQ
ES3
SS
SDSKRENMHNSREDEPLDLSHPAPAATTTLVGEQTPDNPGSDASALPIAVRGFVP
ES4
inserción de GFP
MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSR
YPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNS
HNVYIMADKQK(ME)NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDH
MVLLEFVTAAGITLGMDELYK

FIG. 7

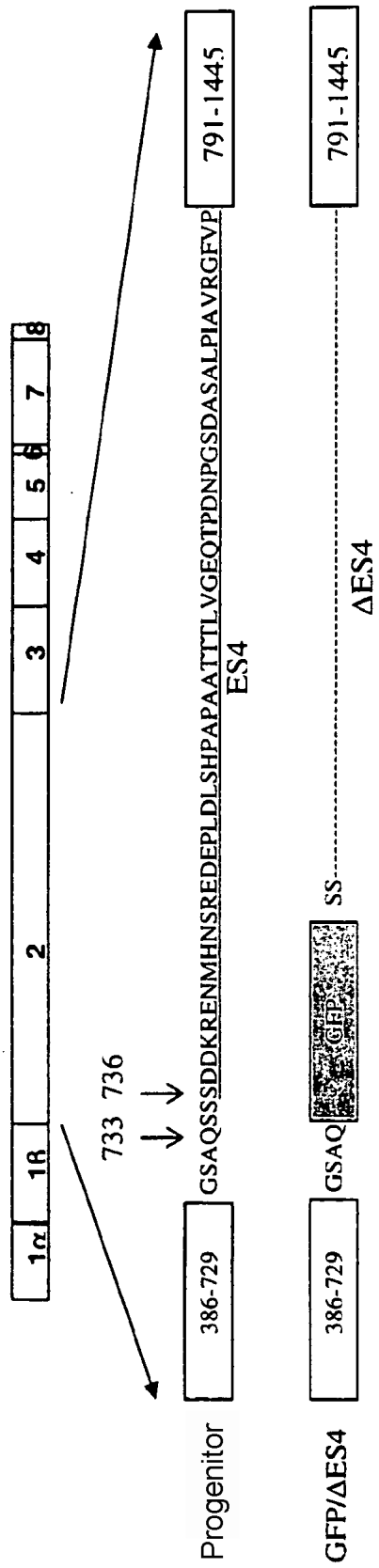

1α
1R
2
3
4
5
6
7
8
733 736
386-729
GSAQSSSDDKRENMHNSREDEPLDLSHPAPAATTTLVGEQTPDNPGSDASALPIAVRGFVP
ES4
791-1445
Progenitor
386-729
GSAQ
GFP
SS
ΔES4
791-1445
GFP/ΔES4

FIG. 8

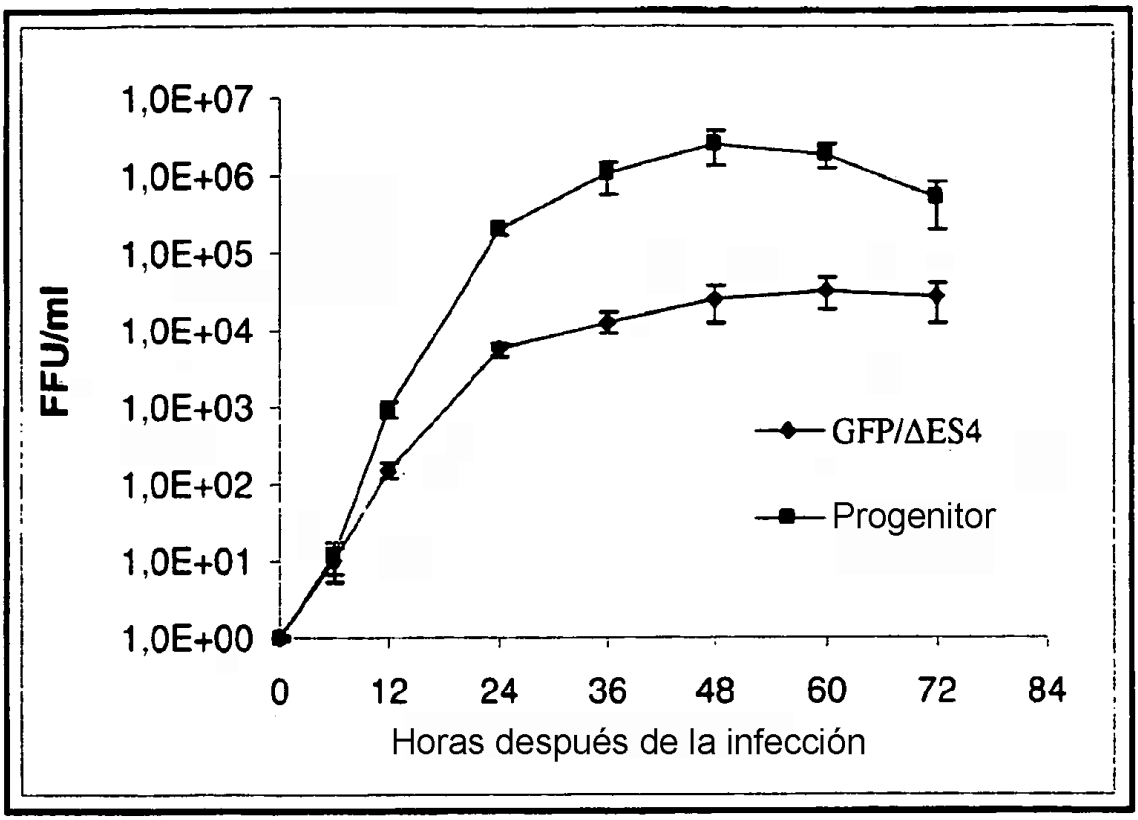
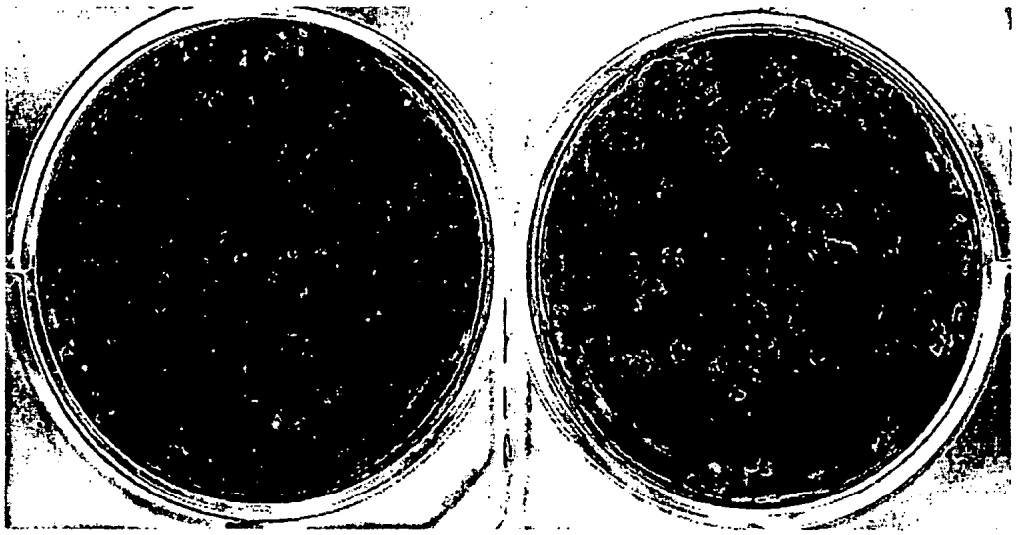
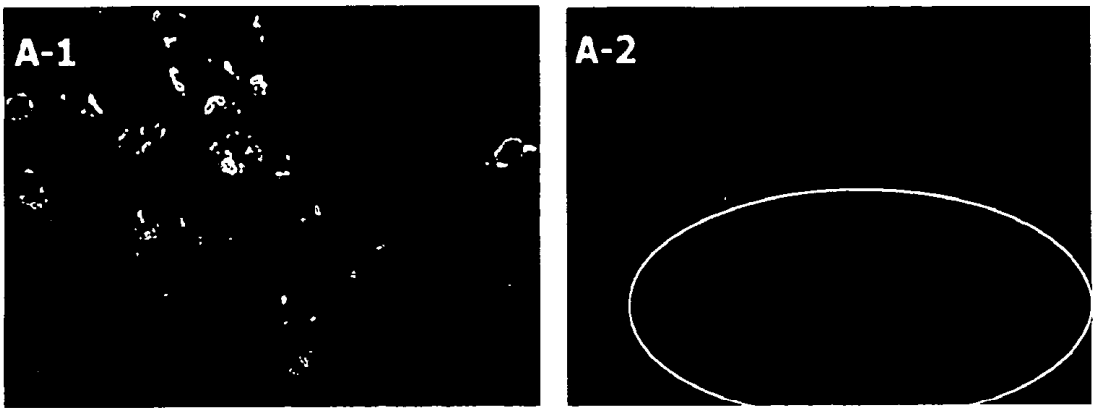

1,0E+07
1,0E+06
1,0E+05
1,0E+04
1,0E+03
1,0E+02
1,0E+01
1,0E+00
FFU/ml
0
12
24
36
48
60
72
84
Horas después de la infección
GFP/ΔES4
Progenitor

FIG. 9



10-1. Virus marcador de ΔES4/GFP 10-2. Progenitor

FIG. 10



Expresión de GFP

Tinción con mAb anti-N

FIG. 11

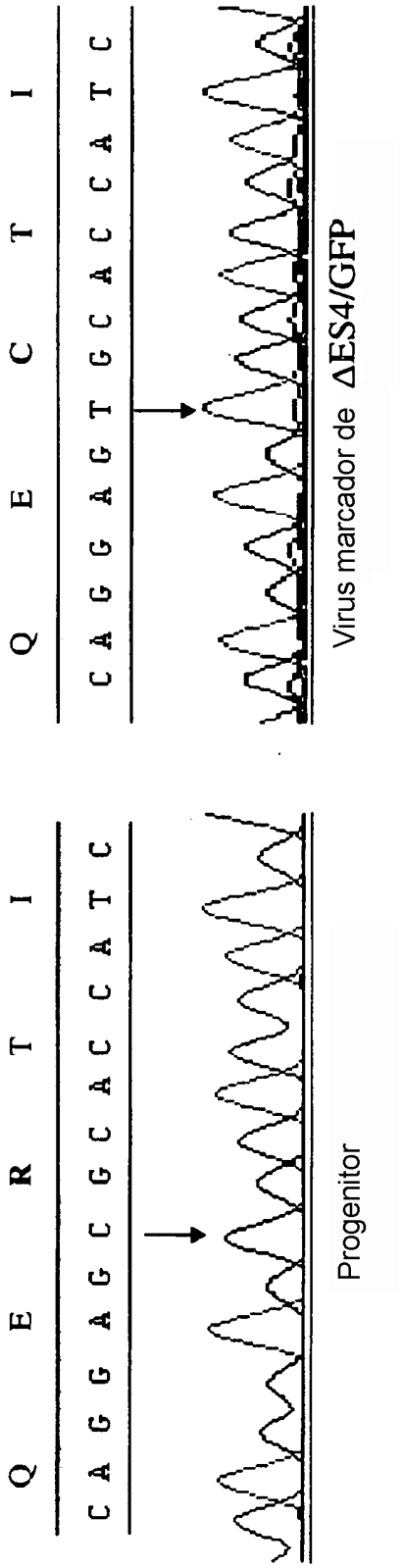
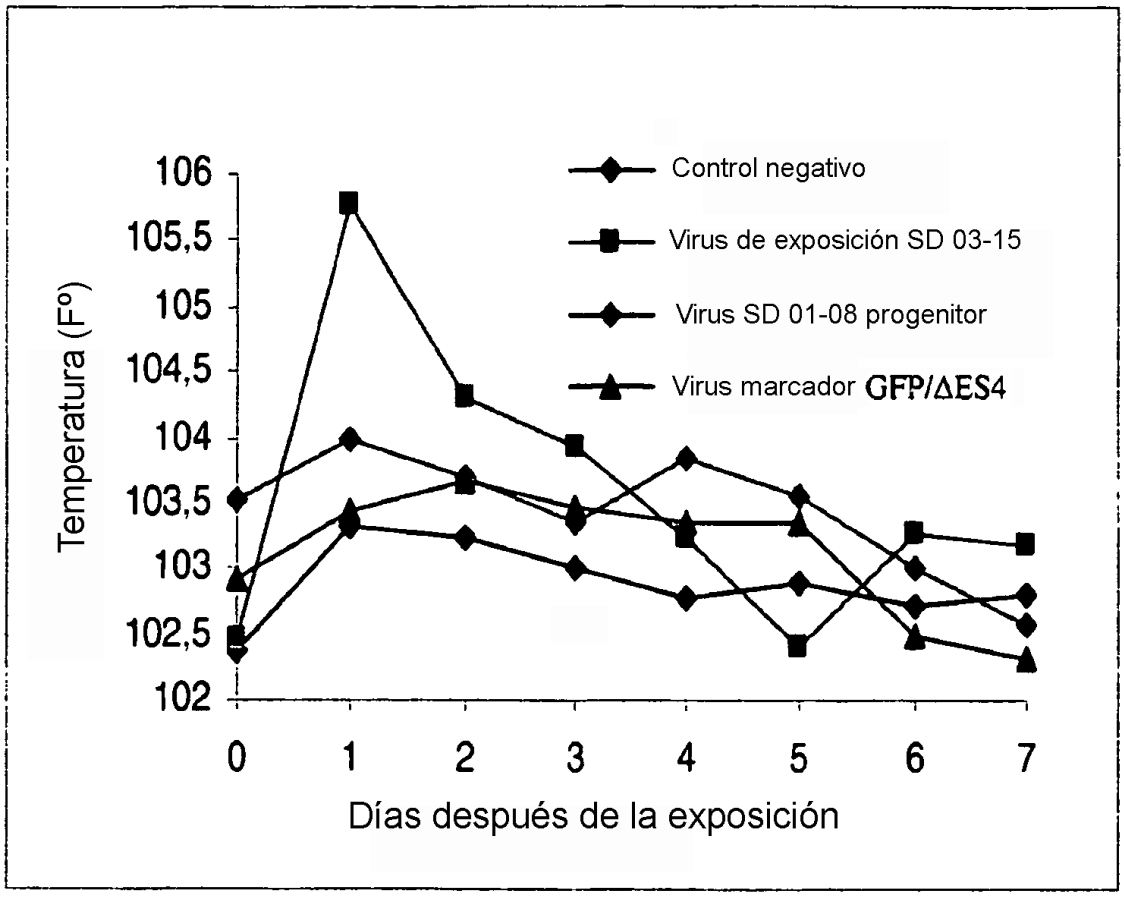

Q E R T I
C A G G A G C G C A C C A T C
Progenitor
Q E C T I
C A G G A G T G C A C C A T C
Virus marcador de ΔES4/GFP

FIG. 12



GFP/ΔES4

FIG. 13

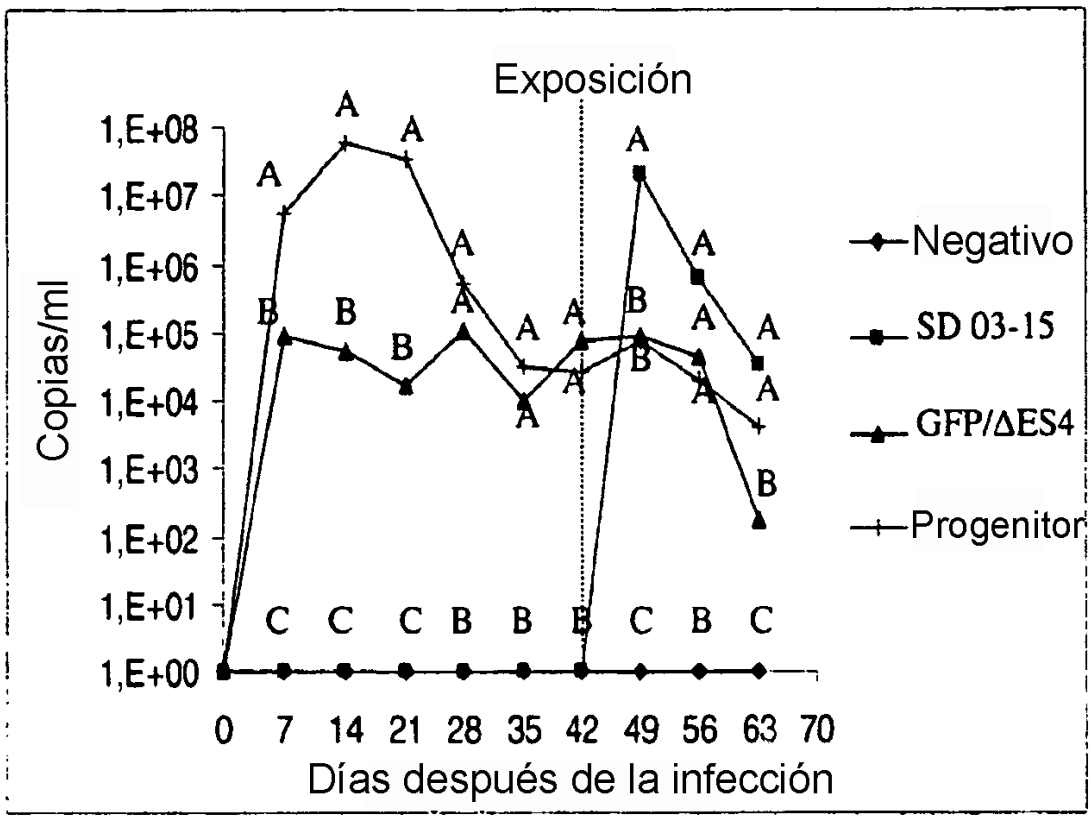

Exposición
Copias/ml
1,E+08
1,E+07
1,E+06
1,E+05
1,E+04
1,E+03
1,E+02
1,E+01
1,E+00
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70
Días después de la infección
Negativo
SD 03-15
GFP/ΔES4
Progenitor

FIG. 14A

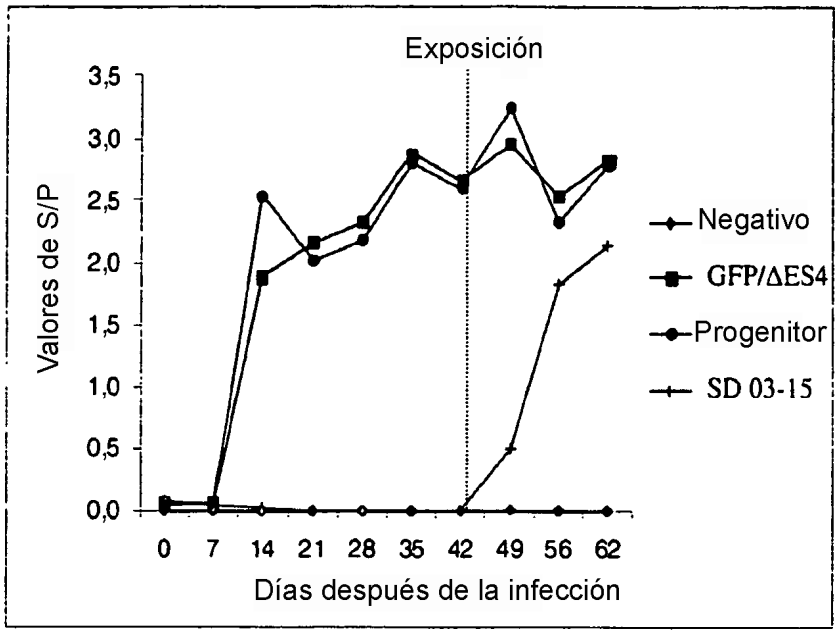


FIG. 14B

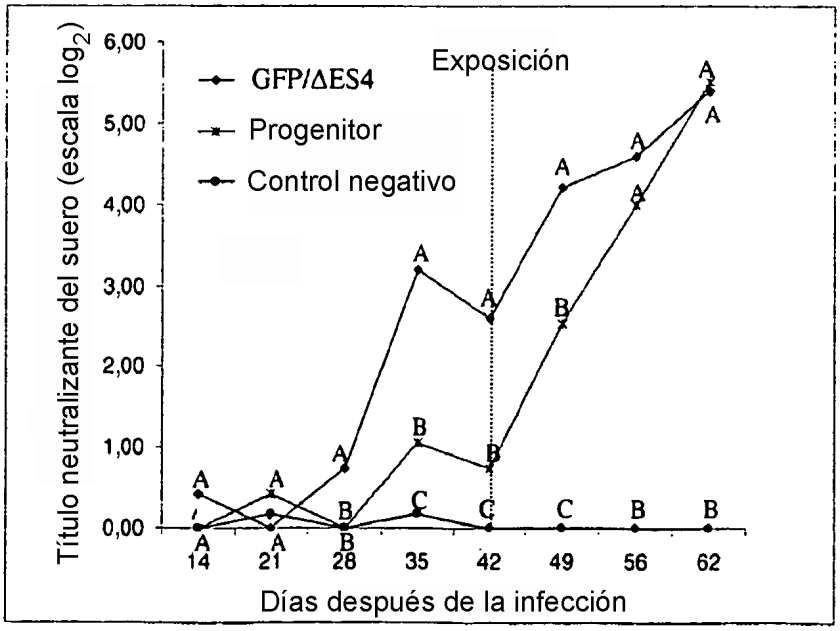


FIG. 14C

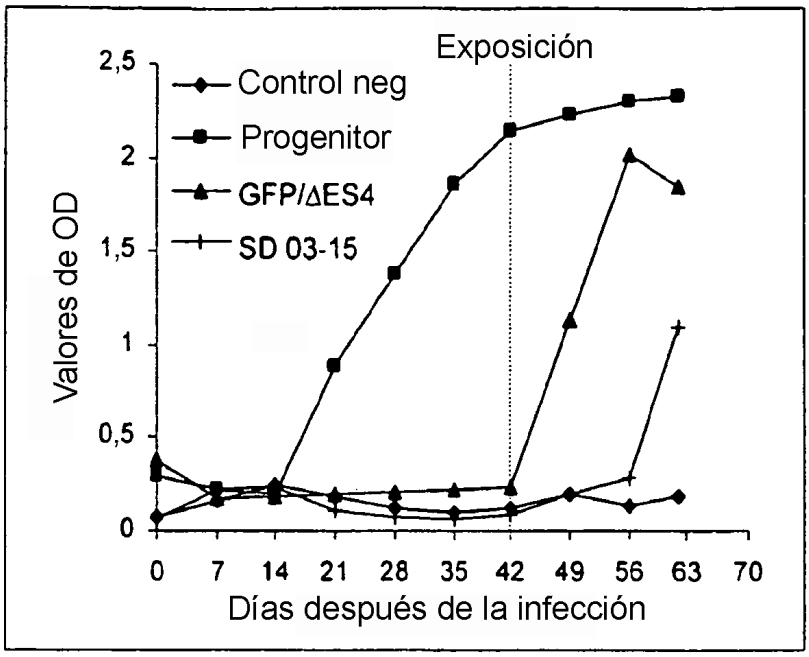


FIG. 15A. ELISA a base del epítopo de ES4

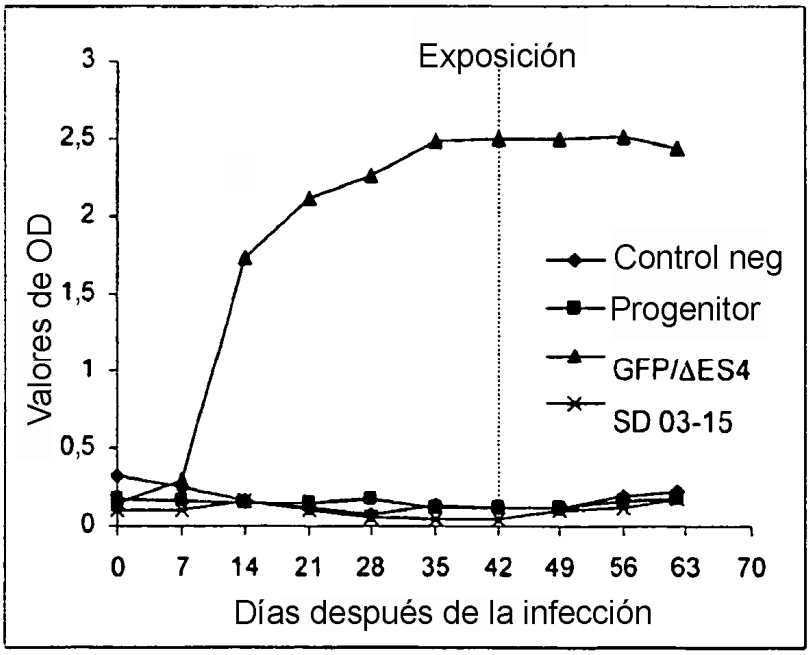


FIG. 15B. ELISA a base del antígeno de GFP

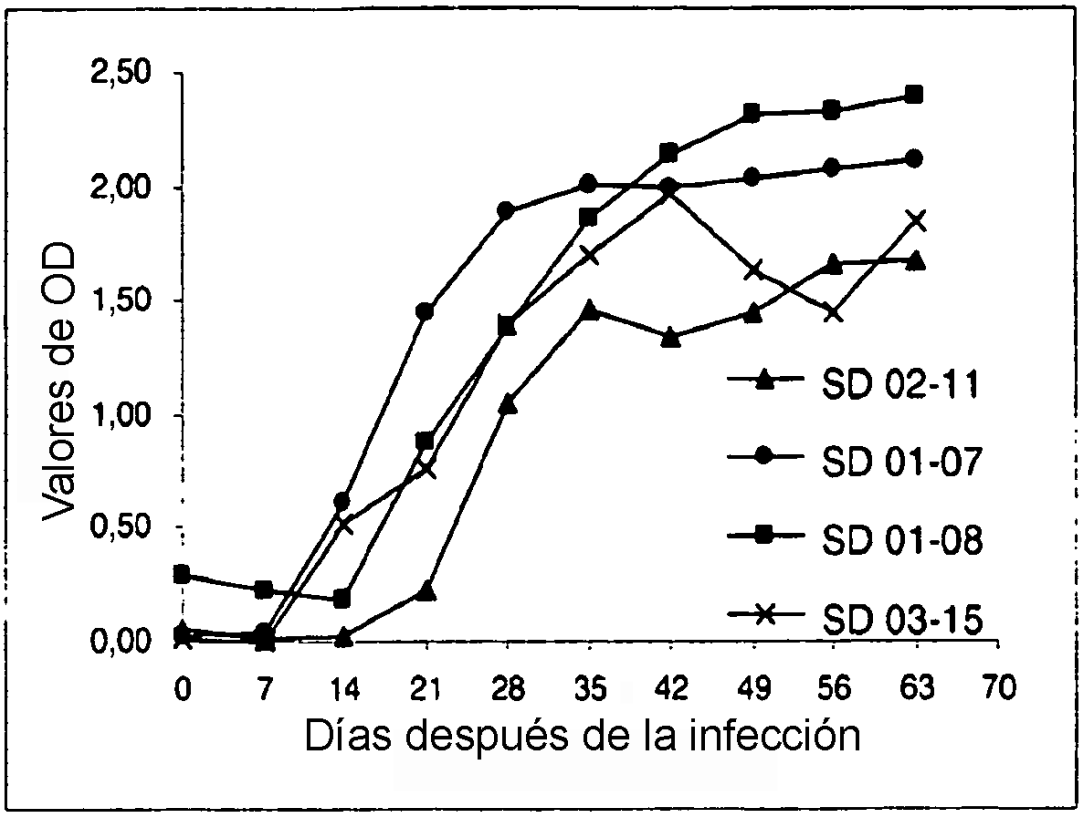


FIG. 15C. ELISA a base del epítopo de ES4