

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 389 748

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

(2006.01) (2006.01)

	_
14	~ 1
	ZI
1.	_,

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: 08771834 .2
- 96 Fecha de presentación: 24.06.2008
- Número de publicación de la solicitud: 2181189
 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

73) Titular/es:

SOUTH DAKOTA STATE UNIVERSITY (100.0%) ADM 130 BOX 2201 BROOKINGS, SD 57007-1396, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI: 31.10.2012

(72) Inventor/es:

FANG, YING y HENNINGS, JANE

Fecha de la publicación del folleto de la patente: 31.10.2012

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 389 748 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

5

10

15

30

35

40

45

50

55

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; Sniider 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) la, 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 ORFla, siendo la mutación tal que dicho mutante de PRRSV no produce un polipéptido de ORFla 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 ORFla 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).

25 Breve descripción de los dibujos

5

10

15

- 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/∆ES4.
 - 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.
- 40 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/∆ES4.
 - Las FIGS. 14A-14C son gráficas que representan propiedades virológicas e inmunológicas del virus marcador de GFP/ΔES4.
- 45 Las FIGS. 15A-15C representan resultados de ELISA a base de GFP y del epítopo ES4.

Descripción detallada

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

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 v 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} TCID₅₀/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 10⁴ TCID₅₀/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), sequido 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

5

10

15

20

25

30

35

40

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 <i>t</i> 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 GFF	P 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 m	utado para crear el sitio de la enzima de restricción <i>Scal</i> está en negrita y e	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 *Ascl*. 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 *Xbal*. La reacción de transcripción inversa fue seguida mediante PCR con los cebadores E14059F y 018 3'R (Tabla 1).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

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 *BgII* 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 37°C 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 *Scal*, 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	Т	С	Silencioso	Nsp1β
6158	Т	С	Silencioso	Nsp5
8191	A	G	Silencioso	Nsp9
9492	С	Т	PtoL	Nsp10
11261	Т	С	YtoH	Nsp11
14588	G	Т	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 *Scal* 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 *Xbal*, 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 10⁷ 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 *Rsrl1* y *Acl1* y se ligó en el plásmido pSD01-08, que se digirió con las mismas enzimas de restricción.

5

10

15

30

35

40

45

50

55

Transcripción *in vitro* y rescate de PRRSV: El plásmido pSD01-08 o pSD01-08-GFP se linealizó con la enzima de restricción *Xbal*. 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 37°C, 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 10⁴ 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 10⁷ FFU/ml, frente a 2,34 x 10⁷ 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 *Scal* en el nucleótido 42 de ORF7. Como se muestra en la Fig. 4, en el virus clonado se escindió mediante *Scal* 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 *Scal*.

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 10⁵ TCID₅₀ 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 -80°C 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).

	Virus progenitor Virus clonado Vacuna de MLV			Virus clonado			1		
dpi	PCR ^a	ELISA ^b	VN ^c	PCR ^a	ELISAb	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

PCR: número de cerdos con una PCR positiva/número total de cerdos en cada grupo determinado mediante la PCR en tiempo real; DELISA: número de cerdos seropositivos/número total de cerdos en cada grupo determinado mediante ELISA IDEXX HerdChek® PRRS 2XR; 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

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

20

5

10

15

	Puntuación de lesión pulmonar gruesa (%)*						
Número del cerdo	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 v 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

5

10

15

20

25

30

35

40

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@
∆ES4F	5' caa gtc ctc tac agg gcc cat act c SEC ID nº 32	2421 -2426
		2592 -2606
\ES4R	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
ET-EGFP-F	5' cg <i>g gat cc</i> a tgg tga gca agg gcg agg agc SEC ID nº 38	-
ET-EGFP-R	5' cct <u>aag ctt</u> cct tgt aca gct cgt cca tgc cg SEC ID nº 39	-
ET-ES4F1	5' gc <u>aga tct</u> tca gac tcc aag aga gaa SEC ID nº 40	2427 - 2444
DET-ES4F2	5' gc <u>aga tct</u> ggt ggt ggt tcc tca gac tcc aag aga gaa SEC ID nº 41	2427 - 2444
DET-ES4R	5' at ccc <u>aag ctt</u> gcg g <u>gg atc</u> 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/ Δ ES4. 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/ Δ ES4. 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.

5

10

15

20

25

30

El estudio de la genética de crecimiento mostró que los virus marcadores GFP/\Delta ES4 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 10⁴ FFU/ml) fue aproximadamente dos logaritmos menor que el del virus progenitor (2,56 x 10⁶ FFU/ml) (Fig. 9). La Fig. 9 representa la cinética de crecimiento de los virus marcadores GFP/\(\Delta\)ES4. 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 ensavo 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/∆ES4 (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 37°C, 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.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

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 Bg/II, pero sin una secuencia ligadora, mientras que el cebador directo 2, pET-ES4F2, contenía no sólo un sitio de restricción de Bg/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 Bg/ll e HindIII, y después se clonó en pET-28a, que se digirió con BamHI e HindIII. 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 Bg/II e HindIII, y después se clonó en pET-28a-ES4 (+1), que se digirió con BamHI e HindIII. 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 HindIII, 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 10⁶ dosis infecciosas de cultivo tisular del 50% (TCID₅₀) 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.

5

10

15

20

25

30

35

40

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 x 10⁷ 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 x 10⁵ 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

Carga viral en suero (copias/ml)						
GFP/ΔES4	Progenitor	Negativo / expuesto*	Negativo			
0	2,7E + 02	N/A	0			
7,4E + 02	0	N/A	0			
0	1,2E + 04	N/A	0			
N/A	0	3,6E + 04	N/A			
0	2,6E + 03	3,3E + 04	N/A			
1,7E + 02	1,1E + 04	3,6E + 04	N/A			
1,8E + 02	4,3E + 03	3,5E + 04	0			
	0 7,4E + 02 0 N/A 0 1,7E + 02	GFP/ΔES4 Progenitor 0 2,7E + 02 7,4E + 02 0 1,2E + 04 N/A 0 0 2,6E + 03 1,7E + 02 1,1E + 04	GFP/ΔES4 Progenitor Negativo / expuesto* 0 2,7E + 02 N/A 7,4E + 02 0 N/A 0 1,2E + 04 N/A N/A 0 3,6E + 04 0 2,6E + 03 3,3E + 04 1,7E + 02 1,1E + 04 3,6E + 04			

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.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

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 37°C 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 4°C 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 37°C, 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 37°C 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

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

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 - AA764 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.

5

Tabla 7. Secuencia de longitud completa del virus marcador de GFP/ Δ ES4 (SEC ID NO: 43)

atgatgta gggtatecee cetacataca caacactttt tgtgtttgtg tactttggatgetgggtae ageceegee caccettgg ecetgttet ageceaacag gtatectte eettegggge gagtgegeeg eetgetgete eettgeagtg ggaaggacet eeegagtat teeggagage acetgetta egggatetee aceetttaae catgtetggg aegttetee ggtgeatgtg eaceegggtat tttggaaege eggeeaagte ttttgcaca ggtgteteag tgegeggeet ettetetete eggaaettea ggaeactgae eteggtgtat ttggattgtt ttacaageet aaggaeaaga tteaetggaa agtteetate ggeatteet aggtggagtg tactecatee gggtgetget ggeteteage egtatteeet ttggegege tgaetteegg taateacaae tteeteeaae gaettgtaa ggttgetgat gttttgtat gegatggttg ettggegeet egaeacetee gtgaaeteea agttacega egeggttgt getggtaeee aattacgggg eeegtaeee gaatgggttt gtttgegaae teeatgeae tgetgtaeee geggtegee egggeggteeg geageegtte tgteeatttg aggaagetea ttetgaegt tacaggtggaaaatttgt gattttaeg gaeteetee egagaagetea ttetgaegt tacaggtggaaaatttgt gattttaeg gaeteetee eeaacggteg atttegeatg atggaegegaagaagaaatttgt gattttaeg gaeteetee eeaacggteg atttegeatg atggaegegaagaagaaaatttgt gattttaeg gaeteetee eeaacggteg atttegeatg atggaegagaagaagaaaatttgt gattttaeg gaeteetee eeaacggteg atttegeatg atggaegagaagaagaaaatttgt gattttaeg gaeteetee eeaacggteg atttegeatg atggaegaagaagaagaagaagaagaagaagaagaagaagaa	120 180 240 2300 360 2420 420 480 540 480
ccctcggggc gagtgcgccg cctgctgctc ccttgcagtg ggaaggacct cccgagtat tccggagage acctgcttta cgggatctcc accetttaac catgtctggg acgttctcc ggtgcatgtg caccccggct gcccgggtat tttggaacgc cggccaagtc ttttgcacaggtgtctcag tgcgcggcct cttctctctc cggaacttca ggacactgac ctcggtgtagttggattgtt ttacaagect aaggacaaga ttcactggaa agttcctatc ggcattcct aggtggagtg tactccatcc gggtgctgct ggctctcagc cgtattccct ttggcgcgct tgacttccgg taatcacaac ttcctccaac gacttgttaa ggttgctgat gtttgtatt gcgatggttg cttggcgcct cgacacctcc gtgaactcca agtttacgag cgcggttgt gctggtaccc aattacgggg cccgtacccg gaatgggtt gtttgcgaac tccatgcacggggggtgccg gcagccgttc tgtccatttg aggaagetca ttctgacgt tacaggtgggagaaatttgt gattttacg gactcctcc ccaacggtcg atttcgcatg atgtggacgaagaaatttgt gattttacg gactcctctc ccaacggtcg atttcgcatg atgtggacgaagaactca atgtggacgaagaagaagaagaagaagaagaagaagaagaagaa	180 240 300 360 420 480 540 480
teeggagage acetgettta egggatetee accetttaae catgtetggg acgttetee ggtgeatgtg cacecegget geegggtat tittggaaege eggeeaagte tittgeaea ggtgeteeag tgegeggeet ettetetee eggaaettea ggaeaetgae eteggtgaa titggattgtt titacaageet aaggaeaaga titacetggaa agtteetate ggeatteet aggtggagtg tacteeatee gggtgetget ggeteteage egtatteeet titggegege tgaetteegg taateaeaae titeeteeaae gaetigitaa ggitgetgat gittigtate gegatggitg etiggegeet egaeaeetee gigaaeteea agittacega egeggitgit getggtaeee aattaceggg eeegtaeeeg gaatggitt gittigegaae teeatgeaegggitetgaeea geegtteeet ggigeeaeee atgittigae taaetegeet eigeeteagggigeggigeeg geageegtte tgiteeatitig aggaagetea tietgaegit taeaggiggiagaaaattigt gattitaeg gaeteetee eeaaeggieg atticgeatg atgitggaeggagaeggaeggigeeggaeeggaeeggaee	240 300 360 420 480 540 a 600
ggtgcatgtg caccecgget gcccgggtat tttggaacge cggccaagte ttttgcaca ggtgtetcag tgcgcggcet ettetetete eggaacttea ggacactgae eteggtgaa ttggattgtt ttacaageet aaggacaaga ttcactggaa agtteetate ggcatteete aggtggagtg tactccatee gggtgetget ggetetcage egtatteeet ttggegege tgactteegg taatcacaac tteetceaac gacttgttaa ggttgetgat gttttgtate gegatggttg ettggegeet egacacetee gtgaacteea agtttacgag egeggttgte getggtacce aattacgggg eccgtaceeg gaatgggttt gtttgegaac tecatgeace tgtetgacea geegtteeet ggtgecacee atgtgttgae taactegeet etgeetcage gggegtgeeg geageegtte tgteeatttg aggaagetea ttetgaegtt tacaggtggaagaaaatttgt gattttacg gaeteetee eeaacggteg atttegeatg atgtggaege	300 g 360 c 420 a 480 c 540 a 600
ggtgtctcag tgcgcggcct cttctctctc cggaacttca ggacactgac ctcggtgtag ttggattgtt ttacaagcct aaggacaaga ttcactggaa agttcctatc ggcattcct aggtggagtg tactccatc gggtgctgct ggctctcagc cgtattccct ttggcgcgct tgacttccgg taatcacaac ttcctccaac gacttgttaa ggttgctgat gttttgtatc gcgatggttg cttggcgcct cgacacctcc gtgaactcca agtttacgag cgcggttgt gctggtaccc aattacgggg cccgtacccg gaatgggttt gtttgcgaac tccatgcac tgtctgacca gccgttccct ggtgccaccc atgtgttgac taactcgcct ctgcctcag gggcgtgccg gcagccgttc tgtccatttg aggaagctca ttctgacgt tacaggtggaaaatttgt gattttacg gactcctctc ccaacggtcg atttcgcatg atgtggacg	360 C 420 a 480 C 540 a 600
ttggattgtt ttacaagect aaggacaaga tteactggaa agtteetate ggeatteet aggtggagtg tactecatee gggtgetget ggeteteage egtatteeet ttggegege tgacteegg taateacaac tteeteeaac gacttgttaa ggttgetgat gttttgtate gegatggttg ettggeget egacacetee gtgaacteea agtttacgag egeggttgt getggtacec aattacgggg ecegtaceeg gaatgggttt gtttgegaac teeatgeace tgtetgacea geegtteeet ggtgecacee atgtgttgae taactegeet etgeeteaggggegtgeeg geageegtte tgteeatttg aggaagetea ttetgaegtt tacaggtggaagaaatttgt gattttacg gaeteetete ecaacggteg atttegeatg atgtggaege	420 a 480 c 540 a 600
aggtggagtg tactccatcc gggtgctgct ggctctcagc cgtattccct ttggcgcgct tgacttccgg taatcacaac ttcctccaac gacttgttaa ggttgctgat gttttgtate gcgatggttg cttggcgct cgacacctcc gtgaactcca agtttacgag cgcggttgtagctggtaccc aattacgggg cccgtacccg gaatgggttt gtttgcgaac tccatgcacc tgtctgacca gccgttccct ggtgccaccc atgtgttgac taactcgcct ctgcctcagaggggtgccg gcagccgttc tgtccatttg aggaagctca ttctgacgtt tacaggtggaagaaatttgt gattttacg gactcctctc ccaacggtcg atttcgcatg atgtggacga	a 480 C 540 a 600
tgacttccgg taatcacaac ttcctccaac gacttgttaa ggttgctgat gttttgtate gcgatggttg cttggcgcct cgacacctcc gtgaactcca agtttacgag cgcggttgtggctggtaccc aattacgggg cccgtacccg gaatgggttt gtttgcgaac tccatgcacc tgtctgacca gccgttccct ggtgccaccc atgtgttgac taactcgcct ctgcctcagc gggcgtgccg gcagccgttc tgtccatttg aggaagctca ttctgacgtt tacaggtggaagaaatttgt gattttacg gactcctctc ccaacggtcg atttcgcatg atgtggacg	c 540 a 600
gegatggttg cttggegeet egacacetee gtgaaeteea agtttaegag egeggttgtggetggtaeee aattaegggg eeegtaeeeg gaatgggttt gtttgegaae teeatgeaeg tgtetgaeea geegtteeet ggtgeeaeee atgtgttgae taaetegeet etgeeteaggggegtgeeg geageegtte tgteeatttg aggaagetea ttetgaegtt taeaggtggaagaaatttgt gattttaeg gaeteetete eeaaeggteg atttegeatg atgtggaege	a 600
getggtacce aattacgggg ceegtaceeg gaatgggttt gtttgegaac teeatgeac tgtetgacea geegtteeet ggtgecacee atgtgttgac taactegeet etgeeteag gggegtgeeg geageegtte tgteeatttg aggaagetea ttetgaegtt tacaggtgg agaaatttgt gatttttacg gaeteetete eeaacggteg atttegeatg atgtggaeg	
getggtacce aattacgggg ceegtaceeg gaatgggttt gtttgegaac teeatgeac tgtetgacea geegtteeet ggtgecacee atgtgttgac taactegeet etgeeteag gggegtgeeg geageegtte tgteeatttg aggaagetea ttetgaegtt tacaggtgg agaaatttgt gatttttacg gaeteetete eeaacggteg atttegeatg atgtggaeg	
tgtctgacca gccgttccct ggtgccaccc atgtgttgac taactcgcct ctgcctcagggggcgtgccg gcagccgttc tgtccatttg aggaagetca ttctgacgtt tacaggtggacgaaaatttgt gatttttacg gactcctctc ccaacggtcg atttcgcatg atgtggacga	g 660
gggcgtgccg gcagccgttc tgtccatttg aggaagetca ttctgacgtt tacaggtggagagaaatttgt gatttttacg gactcctctc ccaacggtcg atttcgcatg atgtggacga	
agaaatttgt gatttttacg gactcctctc ccaacggtcg atttcgcatg atgtggacg	
cggaatccga tgactcagcc gccctggagg tgctgccgcc cgagttagaa cgtcaggtc	
agatecteae teggagtttt ecegeteate accetateaa cetagetgae tgggagetea	
ctgagtcccc tgagaacggt ttttctttcg gcacgtccca ttcttgcggc cacatcgtc	
agaaccccaa cgtgtttgac ggcaagtgct ggctcacctg ctttttgggc caatcggct	
aagtgtgcta ccacgaggaa catctagcta acgccctcgg ttaccaaacc aagtggggc	
tgcatggtaa gtacetecaa egeaggette aagteegegg catgegtget gtggtegat	c 1200
ctgacggccc tattcacgtt gaagcgctgt cttgctccca gtcttgggtc aggcacctg	
ctctgaataa tgatgtcacc ccaggattcg ttcgcctgac atccatccgc attgtgtcc	
acacagaacc caccgctttc cggatctttc ggtttggagc acataagtgg tatggcgct	
ccggcaaacg ggctcgtgcc aaacgtgcca ccaaaagtgg gaaggattcg gccctcgct	
ccaagattgc cccaccggtc cccacctgtg gaatcaccac ctactctcca ccgacagac	
ggtcttgtgg ttggcacgtt cttgccgcca tagtgaatcg gatgataaac ggtgacttt	
cgtccccct gcctcagtac aacagaccag aggatgattg ggcttctgat tatgatctt	
ctcaggegat tcaatgttta caactgcctg ccaccgtggt teggaatege geetgtect	
acgccaagta cctcataaag ctaaacgggg ttcactggga agtagaggtg agatctgga	
tggctcctcg ttccctttct cgtgaatgtg tagttggcgt ttgctctgaa ggctgtgtc	g 1800
caccgcctta tocageggae gggetteeta aacgtgeact egaggeettg gegtetgee	t 1860
acagactace eteagattgt gttagetetg gtattgetga etttettget gatecacet	c 1920
ctcaggaatt ctggactctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccggag cggtccggc	t 1980
totocagott gtataaatta otottagagg ttgttocgca aaaatgtggt gotacggaa	g 2040
gggetttegt etatgetgtt gagaggatgt taaaggactg teegageece gaacaggee	a 2100
tggcccttct ggcaaaaatt aaagttccat cctcaaaggc cccgtctgtg tccttggac	g 2160
agtgttttcc tgcgggtgtt ccagccgact tcgagccagc atttcaggaa aggccccaa	a 2220
gtcccggtgc tgctgtcgcc ctgtgttcac cggacgcaaa agggttcgag ggaacagcc	
cggaagaage tcaagagagt ggccataagg ccgtccacge tgtacccett gccgaaggt	
ccaataatga acaggtacag gtggttgctg gtgagcagct agagctcggc ggttgtggt	t 2400
tggcaatcgg gagtgctcag atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtg	c 2460
ccatectggt egagetggae ggegaegtaa aeggeeacaa gtteagegtg teeggegag	g 2520
gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaag	
tgcccgtgcc ctggcccacc ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagc	
gctaccccga ccacatgaag cagcacgact tettcaagte cgccatgece gaaggetac	
tccaggagcg caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtg	
agttcgaggg cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggag	
acggeaacat cetggggeac aagetggagt acaactacaa cagecacaac gtetatate	
tggccgacaa gcagaagaac ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgag	
acggcagcgt gcagctcgcc gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggcccc	
tgctgctgcc cgacaaccac tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaac	
agaagegega teacatggte etgetggagt tegtgacege egeegggate actetegge	
tggacgaget gtacaagtee tetacaggge ceatacteeg teatgttgag cactgegge	
cagagicagg cgacagcagt tegeettigg atetgtetti tgegcaaacg tiggaccag	

```
3300
ctttagatet atcettggce gettggcegg tgaaggecae egegtetgat eetggetggg
teegeggtag gtgcgageet gtetttttaa ageeteggaa agetttetet gatggcgatt
                                                                   3360
                                                                   3420
eggeeettea gtteggggag etttetgagt eeagetetgt eategagttt gaeeagaeaa
                                                                   3480
aagatactet ggtggetgae geeectgttg aettgaegae ttegaaegag geeetetetg
cagteqacce tteeqaattt gtegaactea ggegeegge teatteegea caageettaa
                                                                   3540
ttgaccgagg cggtccactt gctgatgtcc atgcgaaaat aaagaaccgg gtgtatgaac
agtgeeteca agettgtgag cetggtagte gtgcaaceee agecaceagg gagtggeteg
acaaaatgtg ggatagggtg gacatgaaaa cttggcgctg cacttcacag ttccaggccg
                                                                   3720
gtogoattot tgogtocoto aaatttotto otgacatgat toaagacacg cogootootg
                                                                   3780
tececaagaa gaacegaget agtgacagtg eeggteagae egteeeteeg eetaeggata
                                                                   3840
tecageaaga ggatgecace ceeteegaeg ggttateeea tgeateggat ttttetagte
                                                                   3900
gagtgageac gagetggagt tggaaaggee ttatgettte eggeaceegt etegeggggt
                                                                   3960
ctgctggtca gcgcctcatg acatgggttt ttgaagttta ctcccatctc ccagctttta
                                                                   4020
tactcacact tttctcgccg cggggctcta tggctccagg cgattggttg tttgcaggtg
                                                                   4080
ttgttttact tgctctcttg ctctgtcgtt cttacccaat actcggatgc cttcccttac
                                                                   4140
tgggtgtett etetggttet ttgeggegtg ttegtetggg tgtttttggt tettggatgg
                                                                   4200
ettttgetgt atttttatte tegaeteeat ceaacceagt eggttettet tgtgaecaeg
                                                                   4260
attegeegga atgreatget gagettttgg etettgagea gegeeaactt tgggaacetg
                                                                   4320
tgegeggeet tgtggttgge eceteaggte tettatgtgt cateettgge aagttacteg
                                                                   4380
gtgggtcacg tcatctctgg catgttatcc tacgtttatg catgcttaca gatttggccc
                                                                   4440
tttctcttgt ttatgtggtg tcccaagggc gttgtcacaa gtgttgggga aagtgtataa
                                                                   4500
ggacagetee tgetgaggtg geteteaatg tattteettt etegegegee aetegeaact
                                                                   4560
ctctcacatc cttqtqtqat cqqttccaaa ctcctaaaqq aqttqatccc qtqcacttqq
                                                                   4620
caacgggttg gcgcgggtgt tggcgtggtg agagtcccat ccatcaacca caccaaaaqc
                                                                   4680
ccatagetta tgccaatttg gatgaaaaqa aaatatetge teaaacqqtg gttgetgtee
catacgacco cagtcagget atcaaatgto tgaaggttot gcaggeggga ggggetateg
                                                                   4800
tggaccagee taegeetgaa gttgttegtg tgtetgaaat cecettttea geeceatttt
                                                                   4860
teccaaaagt tecagteaac ecagattgea ggattgtggt ggatteagat acttttgtgg
                                                                   4920
etgeagteeg etgeggttae tegaeageae aactggteet aggeegggge aactttgeea
                                                                   4980
agttgaatca gaccccctt agggactctg cctccaccaa aacgactggt ggggcctctt
                                                                   5040
atactettge tgtggeteaa gtgtetgtgt ggaetettgt teattteate eteggtettt
                                                                   5100
ggttcacatc acctcaagtg tgtggccgag gaaccgctga cccatggtgt tcaaatccct
                                                                   5160
tttegtatee tgeetaegge cetggagttg tgtgeteete tegaetttgt gtgtetgeeg
                                                                   5220
atggggtcac cctgccattg ttctcagctg tggcacaact ctccggtaga gaggtaggga
tttttatttt agtgettgtt teettgactg cettggeeca tegeetgget ettaaggeag
acatgttagt ggtcttttca gctttttgtg cttacgcctg gcccatgagc tcctggttaa
tetgettett teetataete ttaaagtggg ttaecettea eeeeeteaet atgetttggg
                                                                   5460
tgcactcatt cttggtgttt tgtatgccag cagccggcat cctctcacta gggataactg
                                                                   5520
geettetetg ggeagttgge egetttacee aggttgeegg aattattaca cettatgaca
                                                                   5580
tecaccagta tacctetggg ccacgeggtg cageegetgt agecacagee ccagaaggea 5640
cttatatggc cgccgtccgg agagctgctt taactggacg aactttgatc ttcacccgt
                                                                   5700
ctgcggtcgg atcccttctt gaaggtgctt tcaggactca taaaccctgc cttaacaccg
                                                                   5760
tgaatgttgt gggttcttcc cttggttctg gaggggtttt taccattgat ggcagaaaqa
                                                                   5820
cogtogtoac tgctgctcat gtgttgaacg gcgacacagc tagagttacc ggcgactctt
                                                                   5880
acaacegeat geacactttt aagaceagtg gegattatge etggteecat getgatgaet
                                                                   5940
ggcagggcgt tgcccctgtg gtcaaggttg cgaagqqqta tcgcggtcgt gcctactqqc
                                                                   6000
aaacatcaac cggtgtcgaa cccggcgtca ttgggggaagg gttcgccttc tgtttcacca
                                                                   6060
actgtggega ttcggggtca cccgtcatct cagaatctgg tgatctcatc ggaatccata
                                                                   6120
ccggttcaaa caaactcggt tctggtcttg tgacgacccc tgaaggggaa acctgcgcca
                                                                   6180
teaaagaaac caagetetet gacettteca gacattttgc gggcccgage gtccctcttg
                                                                   6240
gggacattaa attgagtccg gccatcgtcc ctgatgtaac atctattccg agtgacttgg
                                                                   6300
categotect agetteegte cetgtaatgg aaggeggeet etegacegtt caacttetgt
                                                                   6360
gtgtcttttt ccttctctgg cgcatgatgg gccatgcctg gacacccatt gttgccgtgg
                                                                   6420
gettettttt getgaatgaa attetteeag eagttttggt eegageegtg titteetttg
                                                                   6480
cactetttat tettgeatgg gecaeceet ggteegeaca ggtgttaatg attagaetee
                                                                   6540
```

teaggacto octaacoga aacaagtigt etetigagetti eteagacti gggggtigte 6666 tttegacata etgittetta etagggtet tigeagaget getgaatig gggggettig 6666 tttegacata etgittetta etagggtet tigeagaget getgaatig tecaagte 6780 acaacatget ggttggta gggagtttet caagggett titeetaagt eggigetee 6780 acaacatget ggttggta gggagttet caagggett titeetaaga tattitgeag 6840 agggtaatet tagaaaaggi gitteacaagi ettigagat ggtaacagag tecetgaegg 6900 tegeteage tigeacagig geogagetg actitgaett titeetaaga tattigaag 6860 teaagtgett tigeactige caagagtig geotectaagat titegeagagig actitiget geogagetg gaattitige taagettgag goettigetg aacatgeet acteetagt teaggtigat aacatgeeagaggggggggggggggggggggggggggggg								
teggittiggs egetigaaate ggggettit geggeagget geetgaatig teceasegte 6720 teatiggitgg actecatgee eteggitgid tetgeatggg eagtiaigt teceaseate 6720 teatiggitgg actecatgee eteggitgid tetgitggitgid gggagttete agggtaatet tagaaaaggt gitteacagt eteggitgget giteaaetae eggitgette 6840 agggtaatet tagaaaaggt gitteacagt etigtiggat gagaaagga teeetgaag 6840 etigtigea gggeaggat et eaagagtig getteacagt tittigteag tetatigaagaga 6840 egaattitigte taagettig teegaaggetg acettgaet tittigteag tattgaagaga 7020 egaattitigte tagettigg caagagtigg ectecatig acggeagtat atigaagaga 7020 etigaaaggaa aactigtige gettigea aaaatgegag eggeaggatga acggeatea teeggitgat aagaggagga 7140 acgtiggtigt tetgatigg caacacecte acggateaa ectegatatt aatgtigggga 7200 etigaaaggaa aactigtige gitecaagga eeggeagtat aggtigtie aaattagg 7260 titigeacigt egigtieeaa caccegigg acggeateaa eeggateaa eeggagatea aggaagatga gaaacactig gitecaegte acgetigtig ggaagaagaa tetagaggatg 7360 aagacette attragagaa ggeeggite acgetigtiga eegtigaace acggitgaa eaggateaga aaaggaagaa eaggaagaace 7300 aagacetteg attreaggaa aggeeggig eetteaaaa gagaagatga eaggattata aatgitgigg 7360 aagacetteg attreaggaa aggeeggig eetteaaaa gagaagaa eaggatatat aaaggatga 7360 aagacetteg attreaggaa aggeeggig eetteaaaa gagaagaace eetatagaa aggaagaacega 2750 aaaaceggea eetataaa aggeacetgi eettigaaa eetatagaa aggaggatga 27560 ctigacaactig eettigaagi gegaageeggi eettigaaa eetatagaaga 2760 eetigacaactig eettigaaga gagaacetga eetigaagaa eetigagaga 2760 eetigacaactig eettigaaga gegaagaa eetigagaga 2760 eetigacaactig eettigaaga gaagaatea eetigaagaa eetigaagaa 2760 eetigacaactig eetigaagaa gaaagaaga eetigaagaa eetigaagaa eetigaagaa 2760 eetigacaactig eetigaagaa gaaagaaga eetigaagaa eetigaaga		tcacggcatc	cctcaaccgc	aacaagttgt	ctctggcgtt	ctacgcactt	gggggtgtcg	6600
thtogacata ctgitictic citaggitge titigicales cggitacta (6720) acaacatgit gitigitgal gggagititi caagegotti titicatagi fathatagit gitigaalaa cggitgace (6780) acaacatgit titgaaagtig titicacagi citigitgad gagitaacit tagaaaaggi giticacaaga citigitgad gagitaacit titgacagtig titicacaga citigitgad gagitacit titgacagat titgaagaga (6900) ctgatigacaa ggoccitigic caagagtig accitigati titigicaga titigiagaaga (6900) gaattitigit tagattiga goottigic acaagagtag caccitigati titigiacagaga (6900) ctgaaaggaa aacigitgite citicitigig acaacatocti acagaticaa cicigiatata atagaggaga (6900) ctgaaaggaa aacigitgite citigiagaaga caccitigati titigiacagaga (6900) ctgaaaggaa aacigitgite citigiagaagaa (6900) ctaaaccetet titigagaat ggtocgogi accetigigigi agaaagaaga (7920) caaccetet titigagaat ggtocgogi accetigigigi ggaagagat citiagagigi (7920) caaccetet titigagaat ggtocgogi accetigigigi ggaagagaa citiagagigi (7920) aaagagatgaa gaaacactgi gitigicocca accegigigia accetitigiaga agagagaga agagaacata accegigigia accetitigiaga agagagaga agagaacata accedigigi accetigigigia accetitigigi accetigigiaga (6900) aaagaccigi atcegaagaga aggicagaga accetaagaga agagagata citiagagigi (7920) aaaactigoga citiagaaga aggicacaga caccidaagaga agagagata citigigigia (7920) aaaactigoga citiagaaga aggicacaga caccidaagaga agagagata citigigigia (7920) aaaactigoga citiagaaga cacaagaga caccidaagaga agagagata cacgagaac (7920) aaaattigoga citiagaaga cacaagaga caccidaagaga agaactagaga (7920) aaaattigoga citiagaaga citiagaagaga (7920) aaaattigaa citicaagag citiagaagaga (7920) aaaattigaaga caccida agaacagaga (7920) aaaattigaa caccagaga citiagaagaga (7920) aaaattigaagaga caccidaagaga caccaagaga agaacaacaa (7920) ccgagagaga agaacatta gagaacaaga caccagagaa (7920) aaaattagagaga caccacaagaga caccacaagaga (7920) ccgagagaga agaacatta gagaacaaga (7920) ccgagagaga agaacatta gagaacaaga (7920) ccgagagaga agaacaatta gagaacaaga (7920) ccaccacaaagaga caccacaagaga (7920) ccaccacaaagaga caccacaagaga (7920) ccacacaaagaga (7920) ccacacaagaga (7920) ccacacaaaagaga (7920) ccacacaaaagaga (7920) ccacacaa								6660
teattggtgg actocatgec cteggtgtga ttetgtggtgt gtteaaatac eggtgectec 6880 agagtaatet tagaaaaggt gtteacagt cttgtggtgt gattttageg 6840 agggtaatet tagaaaaggt gtteacagt cttgtggtgt gatttagegag 6860 ctagttetage ttgeaagttg tegaagagtg acattgagtg eggcagtat attgaagaga 7020 cgtatgecaa ggcetgege caagagttgg cettectagt tttgtteag attagagag 7020 cgtatgecaa ggcetgege caagagttgg cettectagt teaggttgac aaaatgaaag 7020 ctgaaaggaa aactgtgtg getttgetg aacaatect acggatet taggtgtgg caacatect taggtggtg 7140 acgtggttgt tetgettggg caacatect acggateat teaggttga aaaatgagaa 7020 ctgaaaggaa aactgtgtg ggcaagaga ccggagtat atgggatec acggateat taggtggtg 7140 acgtggttgt tetgettggg caacatect acggateat taggtggtg 7140 acgtggttgt tetgaagaa gtgecaggg accggateat taggtggtg 7140 acgtggttgt cggtcaac acaccgtgg acggateat tagggatec aattaatgg 7140 gcaacattg gggaaagate acgggtgata cctggaggaggagaa tattagggaagaga 7140 gcaaaattg ggacaagtec acgggtgta cctggaggagagaa tattagggaactg 7140 gcaaaattg ggacaagtec acgggtgta cctggagagagaa aaaccggee 6040 aaaacctgcac cctacaaggt tttgatecaa agtetgaaa cattaatgga aaagtttag 7140 aaactggga ccttaaaget gcgaaggg aaagtagaga 2040 aaacttgga ccttaaaget gcgaaggga 2040 aaacttgga ccttaaaget gcgaaggga 2040 aaagtttgaa cattgaacag gtttaaact gttagaac 2040 aaagtttgaa cattgaacag gtttaaacag ggaaaatt ggaagtetg 7140 aaactggga ttagttgtaa ctgaaaacag ggaaaaatt 2040 ccaccgte cttgtgagt tettettgaa 2040 ccaccgte cttgtgagt actgaacag 2040 ccaccgte cttgtgaga actgaacatt 2040 accacaga ggagaacttg agttgtcaca 2040 accacaga ggagaacttg agttgtcaa 2040 accacaga ggagaacttg agttgtcaaa 2040 accacaaa gcgaacttg agttgtcaaa 2040 accacaaa gcgaacttg agttgtcaaa 2040 accacaaa tggaacttg agttgtcaaa 2040 accacaaa tggaacttg agttgtcaaa 2040 accacaaa tggaacttg agttgtcaaa 2040 accacaaa tggaacttg agttgtcaaa 2040 accacaaa tggaacaaca 2040 agaacacaag agttcaaaaat 2040 agaacacaag agaacacaca 2040 agaacacaag agaacacaca 2040 agaacacaag agaacacaca 2040 agaacaca		•						6720
acaacatgot gyttgytgyt gygagtttet caagcgettt ettectaegg tattttgeag 6900 ctgetetage tigeaagstg tecegagetg 6900 ctgetagetaget tigeaagstg 6900 ctgetagetaget tigeaagstg 6900 ctgetagetaget tigeaagstg 6900 ctgetagetaget tigeaagstg 6900 ctgetagetagetg 1900 ctgetagetgetg ettetetagg 6900 ctgetagetgetg 6900 ctgetagetgetg 6900 ctgetagetgetg 6900 ctgetagetgetgetgetgetgetgetgetgetgetgetgetgetg								6780
aggtaattt tagaaaagg fittcacagt cittgiggat gagtaaggag cittaacgaact (990) ctgetctago ttgacagtig tegaaggtig actitgatt titgitcage titaacgaact (990) ctgatgccaa ggccetgeg caagagtig citcectagt teaggtiga aaaatgaagg 7020 cgtatgccaa ggccetgeg caagagtig citcectagt teaggtigaa aaaatgaagg 7020 cgaaaggaa actitgtig aaacagcaac tecgteect gacgaaggt 7140 acgtiggtigt tetgetiggg caacatacte acggatecat ectegatatt aatgaggag caacaccetet tittgagaat ggteocgtig acggeggta aggaaggat ettaaggig 7260 tittgaatig ggacaagga acggectigata cettitatac ggtagateca atcaagag 7200 caacacctet tittgagaat ggteocgtig ggaagagat ettaaggig 7380 aagggatgaa gaacactg gigteccteg gcticeaac acgtagatat aagggtig 7380 gaaaattig ggacaagtec acgggtgat acgtiggig ggaagagat ettaagtig 7380 gaaaacttg ggacaagtec acgggtgata cettitatac ggtgatece cggtaacacc 7500 aaaccgcccc ccaacaggg titgatecaa agtetgaaac ccctaitigg actitaggig 7560 aaaccggccc ccaacaggg titgatecaa agtetgaaac ccctaitigg actitaggig 7560 aaactgggat cacgtataa aggtacctga teaaaggtaa ggagttig gtecaage 7560 caacacggccc ccaacaagg gcttaaact 2 ccctagaga agggttig gtecaage 7560 aaactgggat cactacagag gccaagaga 2 ccctagaga 2 gggatggig 2 cacgtagaa 2 gaggatggg 2 ccctagaaca 2 gccaacacgg 2 ccctagaaca 2 gccaagaga 2 gggatggig 2 cccgaacacca 2 gccaacacgg 2 gccaacaca 2 gccaacacac 2 gccaacacacacacacacacacacacacacacacacaca								6840
ctgetctage ttgatagttg tegaaggetg acettegatt tttgtceage ttaacgaace capatigett tytatetegs teaaacaga aaaatgege eggecagta attgaagaag 7020 cgtatgecaa ggeectgege caagagttgg ectecetagt teaggttgae aaaatgaaag 7080 qaattttgte taagettgag geetttgetg acacacecte teegteeett gaegagagtg 7140 acgtggttgt tetgettgag cacacacecta ecggaceat cetgatta aatggaggg 7260 ctgaaaggaa aactgtgtee ggeaagaga ceeggagett aggtggteea aaategagg 7260 ctgaaaggaa aactgtgtee ggeaagaga ecceggagett aggtggteea aaategagg 7260 ctgaaaggaa gaaacactgt ggteecaca acacecgtgg aggeetaaca tetaatggg 7260 caaacecett ttttgaagaat ggteegege acacgeegegga ggaagagaa cattaatgga agagatgaa gaaacactgt ggteecheg getteeaaa cattaatgga aaggeetaga aagagatgaa gaaacactg ggteecheg getteeaaa cattaatgga aaggtggtgee 3aaacegee ceaacagagga cacggtgaa acceptatgaa aggteegega aaacecegee ceaacagaga cacttgga acceptagaga aggtegaa acceptaggaga aaggttgaa cecttaaagga aggtgtgee 7560 aagacettg atteeagac ggecaagetg cecttagaage cecttagaaget cecttgaaget cecttgaaget cecttgaaget cecttgaaget gecaagetg gaaaggttga gaggggttga aaagtttga cactgaaacag getttaaact gtaagagaa ggggggggggggggggggggg								6900
chasquett tightetige teaaacatga aaabeetge eggecagtat attgaageag 7020 egtatgecaa ggeeetgege eaagattge eaacatgeta teagtigue aaaatgaaag 7080 gaattitge taagetigag geethigetg aaacageeae teegteett gaegeaggig 7140 aegtegettg tetgetigg eaacateete aeggateeat etegateta aatgigggga 7200 etgaaaggaa ecggagget etegaaggaa ecggagget ettegageeg 7200 etgaaggaag eeggaggaaggaa etgaaggaag 7200 eaacecetet tittgagaat ggteeegge aegeetgag ggaaggaget etaaggigg 7380 agaggatgaa gaaacactgi gigteeegg aegeetgagga ggaaggaga etaaggigg 7380 agaggatgaa gaacactgi gigteeegg accettgagga ggaaggaga etaaggigg 7380 agaggatgaa gaacactgi gigteeegg accettgagga ggaaggaga etaaggiggg 7380 agaggatgaa gaacactgi gigteeegg accettgagga gaagagate etaaggigg 7380 aaacegeece eaacaggge titgateeaa agtetgaace eetatgge actgatgagg 7500 aaacegeece eaacaggge titgateeaa agtetgaace eetatgge actgatgag 7500 aaacegeece eetaacaggge titgateeaa agtetgaace eetatgge actgatgag 7500 aaacegeece eetaacagg gecaagetg eetaagaagaa gggattgit gitteeaag 7620 eeggeggit eetaagatga gecaagetgi gecaagetgi eetaagagga 7500 eeggeggit eetagagee gecaagetgi eetagagaa gecaateetgi gggaaactg 2620 eetigagga ageeateet ageeagee 7500 aaaceggeggit eetagagee gecaagetgi eetagagga gggaaaatee ageeatee 7500 aaacetgagae eetagaagag gecateata ggaagagge 7500 eetigagga ageeateeta gecateeggagga gggaaateggagga gecateagagaa eetagaggaa eetagaggaa eetagagaa eetagaggaa eetagagaa eetagaggaa eetagagaa eetagaggaa eetagagaa e								6960
gaattteget aagetagege caagagtegg cetectagt eagetagea aaaatagaaag 7080 aagtstyst tetgetigg caacatect aagsgateat tetgeteet gaageaggtg 7140 acgtggtig tetgetigg caacatect acggaett aggtggteet aattgaggg 7200 caacacectet tittgagaa geacateact acggaett aggtggtee aaattcagtg 7260 titgeactg citgeacaag acacceggg acgcettaact titgagaaga acactig gficecteg gettecacaa caggagatta aggtggtee attgagateg 7380 aaaacactgt gficecteg gettecacaa cataatgg aagattaat 7440 gcaaaattig ggacaagte gficecteg gettecacaa cataatgg aagattaat 7440 gcaaaattig ggacaagte acgcgtaaac cettatage aagattaat 7440 gcaaaattig ggacaagte acgggaaacactg cataagaga caggattaat gaggggtgge 2500 aagacectty attecagga aggteagega aggteagega aggattag caggagagat tegaagggg titgatecaa agtetgaaac cettatigg acttgagga 6200 aagacetty cacagagg cettgagaca aggteagaac cettgagaa aggagttig aaacttgega acttgagaga gecaactga agcttaaac gaggagttig aaacttgga acttgagaga aagttgaga aagttgga cactgagaga gecaactga gegagaggggg aaaagttgg gegaatatt agcaagte 6200 aaggttigac actgagaagg gecaacactg gtagagagg gegaaactg gtagaggaga gagagaggg titgacacactg gtagagaga gagagagaga cactgagaga gagagagaga cactgagaga gagagagaga cactgagaga gagagagaga aagttggagaga aagttgagaga aagttgagaga aagttgagaga gagagaga								7020
acgtggttgt tetigettggg caacatecte acggaceat ectegatatt aatgtgggga 7200 ctgaaagaga actgtgte gtgcaagaga ccggacett aggtggttee aaattcagtg 7260 ctgaaagaga accectett tttggaact gtgcacaaca caccectett ttttggaaat ggtceggtg acgccttaac tggcatecaa ctccagagaca 7320 caaceccett ttttggaaat ggtceggtg acgcggtgg ggaagagag 7360 7360 agagatgaa gaaacactgg gtgtcecae ccggtgata cattaatgge aaatttg ggacaagte accggtgata cctttataa cgatgattee cggtacace 7500 aagacettee attecaggae aggcacageeg actacagagaa cagggattata gagggtgtg 600 caacagagge tttgatecaa agttgaace cctattgge acgtgggtg cacacet 100 ccttgaagt cacacagge tttgatecaa agttgaace acggatatta gagggtgtg 7620 tcggcggtat cacgtataac aggtacetga tecaagagaa ggggtata aaagttgga ccttacaget gccaagetg cccttgaaga ggctcttggt gggaagagaa 7620 ccggggggc ttgtgttgac acggaggtgg aaaagttgag gcgcatatt agccagetce 7800 aaagtttgac acctgaacag ggtttaaact gttagcegac aggggttgg accgggggg ggaagagaga 7700 7740 aaacttggac acctgaacag ggtttaaact gttagcegac aggggttgg accgggggg ggaagagaac 77920 7740 aaacttggac aggcctctgg acctgaaggg ggtaaaactt gagaagaac 77920 tttcacccta ggccctctgg acctgaaactt gttagcegac aggcggtgg accacacagggat accacacagggaact ggggccggga atatggggga ggtaaaact gtaaagaaca 27920 ccacacagggac ggggacggcc acgaacttc gatgtggtcaa accacacagggact ggggacggcc aggaactta ggtfgtccaa accacacagggactt accacacaag gggacccgaactca accacacaag gtttggaacac accacacaag gggacccgaactca accacacaag gtttggaag tcacacacac acaggcatta agacacacac acacacagg gtttggaag tcacacacacaggactca accacacagg gtttggaag gggacccgaacacacagg tccgaaactca acacacacagg tttggaaga tcacacacacagg ttcgcaatacacacagg ttcacacacacacaggacacacacacacacacacacaggac								7080
titgacatgi cgtgiccaac acacccgigg acgoettaac tgggateccaactcagtag caacccctct tittgagaat ggtcocgote acgtgigga ggaagacgat cttaagatgd 7380 agagatgaa gaaaccatgi gigteceteg gettecacaa cattaatgge aaagttact 7440 gcaaaattig ggacaagtc accggtgata cettitaac cgatgattac cggtgateccac 260 aagaccttga attecaggac acggtgata cettitaac cgatgattac cggtgattac gaggactgata cacggtgata cacgtagaac cccaacaggga cacggatata gagggtgigc 7560 aaaccgcccc ccaacaggge titgatecaa gattegaca cettatigg actggigtga cacggatat cacgtataac aggtacctga tcaaaaggaa cagggattat gaggggigc 7680 ctggcagata cacgtaacag gtttgatcaa aggtacatga cacctatigg actggiggac 7680 ctgacaactg ccttgaagct gccaagctgi cccttgagaa ggcgateatat agccagctcc 7680 cagcgggggc cacgttgacacggggggat cactgaacag gcttaaaact gttagaga ggcgatatat agccagctcc 7680 caccggggggc ttagttgaa gccttagacgggggggggg		gaattttgtc	taagcttgag	gcctttgctg	aaacagccac	teegteeett	gacgcaggtg	7140
titigacitgi egigiceaac acaccatgig acgettiaac tiggatecca ctecagaca (7320) caaccectet tittigagaat ggteeggite acetgigita ggaaagaagat cttaagateg 7380 gaaagatgaa gaaacactgi gigteecteg gettecacaa cattaatige aaagittaet 7440 geaaaattig ggaaaagtee aceggigita cacetgigita cectificate cgatgattee cggatacace 7500 aagacetige attecagaa aggiteacega actetaagaga aggagatat gagggitige 7560 aaacegeee ccaacaggge titgatecaa agtetgaaae ecctatige actiggitige 7560 acacegegita cacetaaaa aggaacetga cacetagaga aggagattig gaggatgige 7560 aaactigeaa ectifaaaae gecagagtig cectigaagae aggatetegi giteecaaga ctigacaactig cettgaagae gecagagtig aaaagttigag gaggatigig gagatgigee 7680 aaactigeaa cactagacaag gecagaggiga aaaagttigag gegaateatt agecagetee 7800 aaagittigae cactgaacag getitaaact gtaaceeca aggegetiga cecgeggigg aaaagatee acacgaggage titagitigaa cecgeggigg gigaaggaga aggeetee aggegetiga cecgeggigg 7860 cegaggiggig aacetgaagae gggaaaaaata gaaaaataa gaaaaataa gaaaacaag ggaaceeca acacegtigtig gggaaaaaat gaaaaaaaa gaaaaaaaa gaaaaaaaa		acgtggttgt	tctgcttggg	caacatcctc	acggatccat	cctcgatatt	aatgtgggga	7200
caaccctet tittgagaat ggteegegt acegtgtga ggaagacgat citagagteg agaagacgat ggaagacgat ggaagacgat ggaagacgat ggaagacgat gcaagatgag ggaagacgat gcaagatgag ggaagacgat ggaagacgat cacggtgaga actitatatac ggaagatgaaccc aaaccgcccc caacagggc titgatccaa agtctgaaac ccctatiggc actgrgggat cacggagatat cacgtataac aggtacctga teaagagaga cagggattat gaggaggtga gaagactgag ggaagacgat cacgacaactg cctaacaggg titgatccaa agtctgaaac ccctatiggc actgrgggc 7560 caacacacg ccttcaagacg gccaagacgg ccttaagacga gcctacacgagacg aagttgag ggaagactgg ggaagattgag ggagatcatt agccagctcc aaactcgaga ccttacaaggt gccaagatgg gaaagattgag ggagatcatt agccagctcc 7800 aaggttgac cactgaacag gctttaaact gtaacacga ggaagatgag aggagatcac acagcagaac 7800 aaggttgac cactgaacag gctttaaact gtaacacac ggaagacgac cacgctgtg gacagaacgac ggaaaaatcg ggaagacgaac cacgccggcggc tagttgaa cctgaaaaga caccccacga ggtgagataa agaaatcaa 7980 cccaccacaa ggaggcagga aaatgggcg aaacggctct accagagaca ggggacgac accaccacaaa ggaggacgc aaccgcgaact titcaacaca ggaggacgc cagacctca aactccctaa caccacaa ggaggacgc cagaacctca aactccctaa cacacacacacacacacacac	1	ctgaaaggaa	aactgtgtcc	gtgcaagaga	cccggagctt	aggtggttcc	aaattcagtg	7260
agaggatgaa gaaacactgt gtgtccctcg gcttccacaa cattaatggc aaagtttact ggcaaaatttg ggacaaqscc acggtgata ccttttatac cgatgattatc cggtacaccc 7560 aaaccccttgc attccaggac aggtcagccg actacagaga caggattatg gggggtgg 7560 aaaccgcccc ccacagggc tttgatccaa agtctgaaca ccttattggc actgtggtga 7620 tcggcggtat cacgtataac aggtacctga tcaaaggtaa ggggtcttg gttcccaaagc 7680 ctgacaactg ccttgaagcd gccaagctgt cccttgaagca agctctcgct gggatgggc 7740 aaacttgcga cactgacaag gccaaactg gccaaactg gccaagctgt ccctgagaga aaagttgag gggatgtgg cacggggggg aaaagttgag gggatgtgg ccgcagggggggggg		tttgcactgt	cgtgtccaac	acacccgtgg	acgccttaac	tggcatccca	ctccagacac	7320
gcaaaatttg ggacaagtc acggtgata cettttatac egatgatte eggtacacc 7500 aagacettge attecaggac aggtcageeg actacagga cagggattat gagggtgtge 7560 caacaccg cetcacaggge tttgatecaa agtetgaaac cectattgge actgtggtga 7620 ctggcggtat cacgtataac aggtacetga teaaaggtaa gagggtettg gtteccaage 7680 ctgacaactg cettgaaget gccaagetg cacttgagea agcatecteg gggatgggec 7740 aaacttgcga cettacaget gccaagetg aaaagttag gcgcateatt agccagete 7800 aaggtttgac cactgaacag gccaagetg cacttgagea agcagetettga cecgggggge ttagttgaa ctgaaacag ggtaaaate gtaagecga acacgagate 7800 ccgcgggggc ttagttgtaa ctgaaacag ggtaaaate gataagtacc acacgagaac 7920 tttacaccta ggcectetg acctgaaagt cacetecgag gctgaggtaa agaaatcaac 7920 ttgacaaggg cacgctttg tggcaaactt atgttetggt gtcatettga tgagaactca 8040 accagggcat ggggcggga atatggggt agacggattg ggacaaaaac caggcatta 8100 accagggcat gggggggg atatggggt agacggattg accacaaaac caggcatta 8100 accagggactg cggacacta tcaataccag gtttgaaacacata cagacattg gggacgce cggacetea caatcectta caagcatet catcuttaca agaccetea 8220 gcggcatggg ggccgctta tcaataccag gtttggagat ctatcutaca aaaccetea 8220 gcggcatggg ggcgcctta tcaataccag gtttggagat ctatcutaca aaaccetea 8220 gcggcatgga gtcaccaa atgcggctty ttgcctgac cccaacaggg ggccctgta 8220 aggattgtag tcaacacatag gtaccccga ttcaacactgt ttcgaaactt atgtcccae 8220 taacacgg tcttcaagg ctgctgcaga agacctcaa aaatacgace ttcatcacca 8220 taacacgg tcttcaagg ctgtcgaga agacctcaa aaatacgace ttatcacca 8220 taacatgg agttcccaa ggatcccaa caaggacgt ccagacaca accttattg gccatattgg 8220 taaggaattgt cttcccagg tcttacgcct tgtacgcaga ttcatctttg gccatattgg 8220 cattgcaga gattcccaa caaaggacg ccagacacac tatcactca agaacagaa 8220 cattgcaga ggttcccaa caaagaaca ctatcacaga agaacacaca 8220 cattgcaga gattccaa caaagaaca ctatcacca agaccacaca accttattg gccatattg 820 cattgcaga gatgcacacac caaagaaca ctatcacaga agaccacaca accttattg gccagaacacacacacacacacacacacacacacacac		caacccctct	ttttgagaat	ggtccgcgtc	accgtggtga	ggaagacgat	cttagagtcg	7380
aagacettge attccagac aggtcageg actacagaga cagggattat gagggtgtgc 7560 aaacecgece caacagagge tttgatecaa agtctgaaac cectattgg acttggtga 7620 teggeggtat cacgtataac aggtacetga teaaaggtaa gaggttettg gttccaaage 7680 ctgacaactg cectgaagetg gecaagetgt cecttgagea ageteteget gggatgggec 7740 aaacttgcga cactacaget gecgaggtgg aaaagttgag gegcatcatt agccagetec 7800 aaaggtttgac cactgaacag getttaaact gttageege agetetetge gggatgggec 7740 cecggggggge ttagttgtac cactgaacag getttaaact gttageege ageggettga cecgetgtgg 7860 ceggggggge ttagttgtac ctgaaacag gggataaaaat gagaatcac acagcagaac 7920 tttcaccta ggccctetgg acctgaaagt cacctccgag gctgaggtaa agaaatcaac 7980 tgaggagggg cacgetgttg tggcaaactt atgttetggt gtcatettga tgagacetca 8040 cecacegtee cttgttgatg ttettetgaa acceggactt gacacaaaac ceggcattea 8100 accagggcat gggggecggga atatgggegt agacggetet acttggatt tgaacaceg 8160 accacaaag gcagaacttg agttgtccaa acaaataatt caagcatgtg agggttagggg gggggggggg		agaggatgaa	gaaacactgt	gtgtccctcg	gcttccacaa	cattaatggc	aaagtttact	7440
aaaccgccc caacaggc titgatcaa agtctgaac cctattggc actgtggtga 7620 teggeggtat cactataac aggtacetga teaacagtgat caagtacetga teaacaggat teaacagtgata gaggggtetg ggstaggcc 7740 aaacttgcga ccttgaacag gcttaaacat gccgaggtgg aaaagttaga gagggtetg ggsatgggc 7740 aaacttgcga ccttaacagct gccgaggtgg aaaagttaga gegeatcatt agccagctc 7860 ccgcggcggc ttagttgtaa ctgaacaga gtttaaact gtaacgccc agcggcttga 7740 tttcaccta ggccctctgg acctgaaagt gtaaaagtac acagcagaac 7920 tttcaccta ggccctctgg acctgaaagt cacctccgag gctagggtaa agaaatcaac 7980 tagagcaggc cacctgttg tggcaaactt atgttctggt gccacttgattgaacctca 8040 ccaccgtcc cttgttgatg ttcttctgaa accggactt acttgggata agaaatcaac 7980 accacagaga ggggacegga atatggggt agacggctct acttgggatt ttgaaaccgc 8160 accacacaag gaggacetga ggttgtccaa acaaataat caagcattat tugaaaccgc 8160 accacacaag gaggacetc agttgtccaa acaaataat caagcattat gggatcctga 8280 ggggacegc cgaaactcc aatccctta caagctctat cctgttagag gggatcctga 8280 ggggacagca ccgaactca atgcggcttg ttcgaacat ttagaacccc 8340 agacaccaag tccgcaatcc atgcggcttg ttgcctgcac cccaaacggg ccccttgtg 8400 tgatggtaag tcaacactag gtaccccct tcaacatggt ttcgaacat atgtccccac 8460 tgtgccctat ctgccgggg tcttacccct tcacatggt ttcgaacat atgtccccac 8860 tgtgccctat ctgccgggg tcttacccct tcacatggt ttcgaacac tattcacca 8880 aggatttgc ctgccgggg tcttaccct tcccgtcaac ctatcccaca aaatatct tggcagggat 8700 caatggccag aggttcccaa caaagagacgt cccagaatct ggcacacac ttcatcacca 8860 tgcccggcc gcaagagaga attggcaaac tgtgacacca acctttattg gccatattgg 8760 tgcccgacca ggggttccaa caaagagacgt ccagagacat accttactca agaaacatgt gcctggaga agaacacaa tcaaggacgt ccagagacac accttcaaga ggccccacac aggacacaca acctttattg ccctggctaa ggaccacacaca ggaccacacaca ggaccacacaca		gcaaaatttg	ggacaagtcc	accggtgata	ccttttatac	cgatgattcc	cggtacaccc	7500
teggeggtat cacgtataac aggtacetga teaaaggtaa ggaggtetig gtteceaage 7680 etgacaactg cettgaaget gecaagetgt cecttgagea ageteteget gggaatgaggee 7740 aaacttgega cettacaget gecaagetgt cettgaga aggeeteteget gggaatgaggee 7780 aaagtttgac cettgaacag getttaaact getgagea aggeetetga ceegetgtgg 7860 eeggeggget ttagttgtaa etgaaacage ggtaaaaate gaaagtace acageagaac 7920 tttacectta ggeetettg tggaaaact acecteegag getgaggtaa agaaatcaac 7980 eegaggggete eegagggetgt tetteegaa acecgagagat 7920 eecaagggaa ggggeegee eegaaactt tettetgaa acecgaact gacaaaaca eeggeatte alloo aceagggaat ggggeeggga atatgggegt agaeggetet acttgggatt ttgaaacage gggggggaaccaaacte acecacaaag geagaacttg agttgtecaa acaaataatt caagcatgtg aggtaggged aggagacee eegaacetee aactecetta eaagetetaa etatettaa aaacecetea 8800 eggggacacaag ggeegeetta teaataacaag gtttggagat etatettaa aaacecetea 8800 etgatgggaaggeege eegaacetee aactecetta eaagetetaa etatetaa aaacecetea 8800 etgatggtaag teacaacetag gtacaaceet teaacatggg eecetgtgte 8400 etgatggtaag teacaacatag gtacaaceet teaacatggt teagaacete ataetaceag gttegagaa agaatetga ggaggtetge eecetgtgte 8400 etgatggtaag teacaacatag gtacaaceet teaacatggt teagaacett taatgtgeace 8520 eaaggattte etgecegggg etttaceet tgacegeet teaacatgge eecetgtgte 8400 etgatggtaag teacaacetag ettacaceet teaacatggt etaacaaceet teaacatgge eecetgtgte 8580 aggatttee etgecegggg ettaceet tgacegeet teaacatgge etatetaetea 8580 aggatttee etgecegggg ettaceet tgacegeet teaacaaceet teaaggagat 8700 eaatggecaag aggtteecaa eaaggacgt eecaaaacea eegaaceete teaacaacea eegaaceete etaaceete etaaceet		aagaccttgc	attccaggac	aggtcagccg	actacagaga	cagggattat	gagggtgtgc	7560
ctgacaactg cettgaaget gecaagetgt cecttgagea ageteteget gggatgggee 7740 aaacttgega cettacaget gecgaggtgg aaaagttgag gegateatt agecagetee 7800 cegeggegge ttagttgaa etgaaacag gettacaact gtaacgee ageggettga eegetgtgg 7860 cegeggegge ttagttgaa etgaaacag ggtaaaaate gtaaagtace acageagaac 7920 ttteacecta ggeeetetgg acetgaaagt caceteegag getgaagtaa agaaateaac 7980 ceaceggee eacgetgtgt tgeeaaactt atgttetggt geatettga tagaacetca 8040 cecacegtee ettgttgatg ttettetgaa aceeggaett gacacaaaac ceggeatte accacaaaag geagaacttg agttgeeaa acaaataatt caageatggt gaggtagggg gegggga atatgggegg agacgetet acttgggatt ttgaaaceg 8160 accacacaaag geagaactte aactecetta caagetetat eatgtagag gggatacetga 8280 geggeatggg ggeegeetta teaataceag gtttgeeaa eccacaggge eccetgtge 8280 geggeatggg ggeegeetta teaataceag gtttgeeaa eccacagggg eccetgtge 8400 tgatggtaag tcaacacta atgeggettg ttgeetgea eccaacgggg eccetgtge 8400 tgatggtaag tcaacacatag gtaccacect teaacatggt ttegaacect taatetacea 8520 taaacatggt acttecaagg etgetgecaga agaceteca aaatacgace tatetacea 8520 taaacatggt acttecaagg etgetgecaga agacetecaa aaatacgace tatetaceca 8580 aggatttgte etgeceggg tettaceace etaccgeet gacaccectt teatgtgeac 8520 taaaggacacg ceattgttee tecegteaac etatecceca taccacege gecatatetg 8640 taaggeaceg etatgttee tecegteaac etateccea acetgaattg gecatattgg 8700 caatggeege gteaaggaga attggeaaac tggaacace etatetateta 8820 etgttecaag eccaaaacea ggaceateet gggacacaac acettattg gecatattgg 8700 caatggeege gteaagtggg teaacgagaca etacagaagget tggaacacga 8820 etgttecaag eccaaaacea ggaceateet gggeaceaac aactttattg ecctggetea 8820 etgttecaag eccaacaacaa ggacegaca etacagaagget tggagagget tegteegea 9000 ageegacttg geeteetgg acegagaca etacagacg tggggateetgga gggttettga 9000 ageegacttg gaacateetgg acegagaca etacagacg tgggggggggggggggggggggggggggggg		aaaccgcccc	ccaacagggc	tttgatccaa	agtctgaaac	ccctattggc	actgtggtga	7620
aaacttgga cettacaget geegaggtgg aaaagttgag gegeatett agecagetee 7800 aaggtttgac cactgaacag gettaaact gttagecgee ageggettga eeeggetggg 7860 cegeggeggege ttagttgtaa etgaaacage ggtaaaaate gtaaagtace acageagaac 7920 tttecaceta ggeeetetgg acetgaaagt eaceteegag getgaggtaa agaaateaac 7980 tagagaagge cacgetgtt tggeaaactt atgttetggt gteatettga tggaacetea 8040 aceacggeet ggggeeggga atatgggegt agaeggeet gaacacaaaa eegggatte aceacgagget ttgaaaceg 8160 aceacacaaag geagaactte agttgteeaa acaaataatt caageatgg aagttaggeg 8220 eggggaegee cegaacetee aacteectta caageteta eetgttaaag gggateedga 8220 eggggaege eegaacete aceteetta caageteta eetgttaaag gggateedga 8220 eggggaegg ggeegeetta teaataceag gtttggagat etatettaca aaaceceta 8340 agacaceaag teegaaace atgeggettg ttgeetgaa etatettacaa aaaceceta 8460 tgtgeectat agtgteatgg gtacaceet teaacatggt ttegaacett atgteecac 8460 tgtgeectat agtgteatgg gtacaceet teaacatggt ttegaacett tagtgeeac 8520 taaacatggt acttecaagg etgetgeedga agaceteeaa aaatacagee tatetacea 8580 aggatttgte etgeeegggg tettacgeet tgtacegeag atteatettt geeaatttg 8640 taaggeacg ceattgttee teeegteac etateceet gaacaceet ttggeeaggat 8700 eaatggeag aggtteeaa eaaaggaeg eeaaggeet etateegeet tgtaceecaa aaatteet tggeaggggt 8700 eaatggeag etcatgggg attegagaace tgtaceete ggeacaceae agaaacagta 8820 etgtteeaag eecaaaacea ggaecateet gggeacaceae aactttattg eectggeaga 8820 etgtteeaag eecaaaaacaa gaecaceae ggaecaceae ggeaceae eecgacegge etcagtgggt teaceeagge atteategga agteeteega 9940 tgeetggga aaaaacaaat teaaggaget geattgaaa agggeetgga agteetega 9940 eccatgaeet gtggaaaac aggatggge etcagtggg etcagtggg geaceese etcagaeaet ggaaceegae 9940 eccatgaeet geeteetgga aacegaeet aceeggaeetggeetggggggggggggggggggggggggg		teggeggtat	cacgtataac	aggtacctga	tcaaaggtaa	ggaggtcttg	gttcccaagc	7680
aaggtttgac cactgaacag getttaaact gttageege ageggttga ceegetgtgg 7860 eegeggegge ttagttgtaa etgaaacage ggtaaaaatt gtaaagtace acageeggaac 7920 ttageeggge teggaacact gettageagg acceeeggagg getagggaa agaaatcaac 7980 tgagegggg cacgetgtg tggeaactt acceeggagtt gageacacacacacacagggggggggggggggggggggg		ctgacaactg	ccttgaagct	gccaagctgt	cccttgagca	agctctcgct	gggatgggcc	7740
ccgcggcggc ttagitgtaa ctgaaacagc ggtaaaatt gtaagtacc acaccagaac 7920 tttcacccta ggccctctgg acctgaaagt cacctccgag gctgaggtaa agaaatcaac 7980 caccacgtcc ctgttg tggcaaactt atgttctggt gtcatcttga tgagacctca 8040 cccaccgtcc ctgttgatg ttctctctgaa acccggactt gagacaaaac ccggcattca accacagagcat ggggccggga atatgggcgt agacggctt actggggtt ttgaaaccgc 200 acccacaaag gcagaacttc gagttgtcaa acaaataatt caagcatgtg aagttaggcg 200 cggggacgcc ccgaacctc aactcctta caagctctat ccagttagag gggtactcga 8280 gcggcatggg ggccgctta tcaataccag gtttggaagt cccaagggg cccctgtgtc 8400 tgatggtaag tcaacacac atgcggcttg ttgcctgaa cccaagggg cccctgtgtc 8400 tgatggtaag tcaacacaag gtaccaccct tcaacatggt ttcgaacctt tagtcccaa 8460 tgatggtaag tcaacacag gtaccaccct tcaacatggt ttcgaacctt tatgtcccaa 8520 taaacatggt acttccaagg ctgtgcgaga agacctccaa agacctcaa agactccaa agacttcat aggtccaaga agacttccaa agacctcaa agacttcattgg ccatttggca 8520 taaacatggt acttccaagg ctgtgcgaaga actacccct tcatctttg gccatattgg 8640 tgacggcag aggttccaa caaaggacgt ccagaggaat tcatctttg gccatattgg 8700 caatggcag aggttccaa caaaggacgt ccagaggaat cctgaaattg acgaaatgg 8700 caatggcag cccaaaacca ggaccatcct gggcacaaac aactttattg ccctggcga 8880 ccgatcggcg ccaaaacaca ggaccatcct gggaccaaa aactttattg ccctggctaa 8820 ccgatcggcg ccaaaacaca ggaccatcct gggaccacaa aactttattg ccctggctaa 8800 agccgacttg gcctcctgg accagaccac ccccgccatt gtggggtgg ggtgtttga 9000 agccgacttg gcctcctgg accagaccac ccccgccatt gtggggggt gtgtctga 9000 agccgacttg gcctcctgg accagaca accttacct ggggaccaca accttattgg gcctatagggggg ccaaaacaca aggatggtg cttacacaaa aggatggtgc cttacacaaa aggatggtgc cttacacaaa aggatggtgc cttacacaaa aggatggtgc taaacacaa aggatggtgc taaacacaa aggatggtgc cttacacaaa accttacct gagaacacct gggggtgttca gaacttgctg gcctcataaaa tgggtcaaaa aggacgcaca ccccgcaatt gagacccgaa ggaccccgaa aggaccccgaa aggacgcaca ccccgacatt gagacaccc ttgaccgaa 9000 agccgactt agaacttgga aggacaccaa aaccttaccaaaa aggacgcaacaa aggatggtg cccaaaacaa aggacgacac ttgaccaaa aggacgcacacaacaaa aggacgacacaaacaa		aaacttgcga	ccttacagct	gccgaggtgg	aaaagttgag	gcgcatcatt	agccagctcc	7800
tttaaccta ggcctetgg acetgaaagt cacetcegag getgaggtaa agaaatcaac 7980 tgaggaggg cacggggt tgggaaaactt atgttetggt gtcatettga tgagacetca 8040 cccacegtec ettigttgatg ttettetgaa acecggactt gacacaaaaac ceggcattca 8100 accagggat gggggcagga atatgggggt agacggctet acttgggatt ttgaaaccgg 8160 accacaaaag gcagaacttg agttgtccaa acaaataatt caagcatgtg aagttaggeg 8220 cggggaatggg ggccgcctta tcaataccag gtttggagat ctatettaca acaccctca 8340 agacacacaa tccgcaatcc atgeggetty ttgcctgcac cccaacgggg cccctgtgtc 8400 tgatggtaag tcaacactag gtaccaccct tcaacatggt ttcgaacttt atgtcccac 8460 tgtgcccta acttccaagg attcacccct tcaacatggt ttcgaacttt atgtcccac 8520 taaacactgg acttccaagg ctgctgcaga agacctccaa aaaacacctca 8580 aggattte ctgccegggg tcttacgcc tgtaccacactt tcatgtgcac 8520 taagggaacc catgttcc tccegtcaac ctatcccaa aaaaattcta 8580 aggatttgtc ctgccegggg tcttacgcct tgtaccgaag tcaacacctt tcatgtgcac 8520 taagggaaccg cattgttcc tccegtcaac ctatcccaa aaaaattcta tggcagggat 8700 caatggcca ggtcaaggaa attggcaaca caaaggacgt ccaaggacat cctgaacatgg 8760 tgcccgcgcc gtcaaggaga attggcaacc caaaggacgt ccaagagaact tggaccacca accttatttg 8820 ctgttccaag cccaaaacca ggaccatcct gggcaccaca accttatttg ccctggctca 8800 cgatcgggg ctcaaggaga attggaaga cccaaggacat tcaacccgga aggccacac accttatttg ccctggctca 8800 cgatcgggg ctcaaggaga attggaacac gggaccacac accttatttg ccctggctca 8800 cgatcgggg ctcaaggaga accgcacac aggaccacc tgtgaccacc ggggccacaa acctttattg ccctggccaa 8940 tgcctggga aaaaacaaat tcaaggagg gcattgcacc ggggaccacac acctgaatgtg ttgtcccgaa 9900 agccacct gtggcaccac aggatgggg ccccaggggg cccagggggc cccagggggc cccagggggc cccagggggc cccaggggg cccagggggg cccagggggc ccaaggggg cccagggggc cccagggggg cccagggggg cccagggggg ccaacaccgg aaatccacgg aaatccacgg aaatccacgg acctcctcg gaaacccgt accaggacc ccagggggg gaccccgaa accaggacc caaaggagg caacaccg tatcacca aggaccacc tatcaccag aggaccacc tatcaccag accaccacca ggggggggc gacacccggaccaccaccaccaccaccaccaccaccacca		aaggtttgac	cactgaacag	gctttaaact	gttagccgcc	agcggcttga	cccgctgtgg	7860
tgagcagggc cacgctgttg tggcaaactt atgttctggt gtcatcttga tgagacctca 8040 cccaccgtcc cttgttgagt ttcttctgaa acccggactt gacacaaaac ccggcattca 8100 accagggcat ggggcgggg atatggggct agacggctct acttgggatt ttgaaaccgc 8160 acccacaaag gcagaacttc agttgtccaa acaaataatt caagcatgtg aagttaggcg 8220 cggggacgcc ccgaacctcc aactccctta caagctctat cctgttagag gggatcctga 8280 gcggcatggg tccgaatcc atcaaccag gtttgaagat ctatcttaca aaacccctca 8460 tgatggtaag tcaaccatag gtaccaccct tcaacatggt ttcgaacttt atgtcccac 8460 tgatggcaag tcaacactag gtaccaccct tcaacatggt ttcgaacttt atgtcccac 8580 aggatttgtc ctgcccgggg ctctaaccgct tgaccaccct tcaacatggt catctacta 8580 aggatttgtc ctgcccggggg tcttacgcac ttaccacaa aaataccacc tatctacta 8580 aggatttgtc ctgcccgggg tcttacgccc tgacacccct tatctattgg 8640 taaggcaccg ccattgttc tcccgtcaac ctatcccaca aaatacgacc tatctactca 8580 aggatttgtc ctgcccgggg tcttacgcct tgtacgcag tcatccttt tggccagggat 8700 caatggccag aggttcccaa caaaggacgt ccaagagcat cctgctgcaga aggttcccaa accgaagcag attgccaacc tgtgcccgcc gtcaagagag attggcaaac tgtgacacct tgtaccctca agaacagta 8820 ccgatcggcg gtcaagaga attggcaaac tgtgacaccat tgtaccctca agaacagta 8820 ccgatcggcg gtcaagaga tcaaccaggc attcatgag aaggcttgga agtcccgat 8820 ccgatcggcg gtcaagaga tcaaccacag gcacacacc tgtgacacca agacacatag 8820 ccgatcggcg gtcaagaga tcaaccaggc attcatgaag aaggcttgga agtcccgat 8820 ccgatcggcg gcctcctggg accacacca ggaccacac aggatcgggg gcggaccacac accttatatg gccggattgg accacacagaga gccccgacat gccccgacat gccccgaca gccccgaca gccccgaca gccccgaca gccccgacacacac]	ccgcggcggc	ttagttgtaa	ctgaaacagc	ggtaaaaatc	gtaaagtacc	acagcagaac	7920
cccaccytec ettyttyatg ttettetgaa acceggaett gacacaaaac eeggeattea 8100 accagggeat ggggeeggga atatgggegt agacggett acttgggatt ttgaaacege 8160 accacaaaag geagaactte agttytecaa acaaataatt caagcaty agyttegeg 8220 eggggaegge eegaacetee aactecetta caagetetat eetyttagag gggateetga 8280 geggeatggg ggeegeetta teaataceag gtttggagat etatettaca aaaceeetea 8340 agacaceaag teegeaatee atgeggetty ttgeetgaac eecaacgggg eeeetytgte 8400 tgatggtaag teaacaceag gtaccaceet teaacatggt ttegaaactt atgteeceaa 8460 tgtgeeetat agytteatgg agtaceeega agaceeeet gacaceeet teatgtgaa 8520 taaacatggt acteecagg etgetgeaga agaceeeet gacaceeet teatgtgaa 8520 taaacatggt ettgeeegag atteatettt atgteeceaa 8580 aggatttyte etgeeegggg tettacgeet tgtaegeaga teatettty geeatattgg 8640 taaggeaceg eattgtee teeegteaae etateeega tegtaegeaga teatettty geeatattgg 8760 tgeeeggee gteaaggaga attggeaaae etateaggaega tegtgeagagggggggggg		tttcacccta	ggccctctgg	acctgaaagt	cacctccgag	gctgaggtaa	agaaatcaac	7980
accagggeat ggggccggga atatggggt agacggctct acttgggatt ttgaaaccgc accacaag gcagaacttg agttgtccaa acaattaatt caagcatgtg aggtttaggcg 8220 cggggacgcc ccgaacctcc aactcctta caagcattat cctgttagag gggatcctga 8280 gcggcatggg ggccgcctta tcaataccag gtttggagat ctatcttaca aaaccctca 8340 agacaccaag tccgcaatcc atgcggcttg ttggagat ctatcttaca aaaccctca 8460 tgatggtaag tcaacacta gtaccaccct tcaacatggt ttcgaacttt atgtcccac 8460 tgtgccctat agtgtcatgg agtacctcga ttcaacactggt ttcgaacctt tatgtcccac 8580 aggatttgtc ctgcccgggg tcttacgcct tgtacgccac aaatacgacc tatctactca 8580 aggatttgtc ctgcccgggg tcttacgcct tgtacgcaa attcatcttg gccatattgg 8640 taaggcacg ccattgttcc tcccgtcaac ctatcccad acaaaggcac gtcgcggaa aggatcaac ctatcccad acaaaggcac gtcgcggga attgccaac ctatcccad acaaaggcac gtcgcggga attgccaac ctatcccad acaaaggcat ccagaagcata cctgaaattg acgaaaatgg 8760 tgcccgggc gtcaaggaga atggcaaac gggaccacca aactttattg gccatattgg 8760 tgcccgggc gtcaaggaga atggcaaac gggaccacc tgtacccta agaaacagta 8700 ccaatgggcg cccaaaacca ggaccatcct gggaccacac aactttattg ccctggctca 8880 ccgatcggg ctcaqtggg tcaccaggac cccagacac acctttattg ccctggctca 8860 ccgatcggg ctcaqtggg tcaccagagac cccagacac acctttattg ccctggctca 8860 cctcctgtag aaaaacaaat tcaaggagct gcattgcac ggcgcgga agtgcccgat 8940 tgccttggga aaaaacaaat tcaaggagct gcattgcac ggcgcggac aggtgctctga 9000 agcggacttg gcctcctgtg accgcagaca ccccagacat gtgaggggg ttgtcgga 9000 ccatgacctt gtgcgaacac aggatgggg ccccggcattgggc tgtcgccgg 9180 ggaccccgtc accagtgtg ctaacaccgt atattcactg atattcattg cccagacact 9240 ggtgttgtcg gccttaaaaa tgggtcatga aatcggctc agcgttggc tgtcgccgg 9180 gacgggggtttc agaaccgcct ttcctaatta tcactggtgg gccgggacccc ttgacctaat 9240 ggtgttgtcg gccttaaaaa tgggtcatga aatcggctc aggatgtgc tattctgct ggggaccact tgacctaat 9240 ggtgggtttc agaacggacc caaagaagac agtcatacc ggacaccc ttgacctaat 9240 ggtgggtttc agaacggacc caaaagaagac agtcatacc ggacaccc ttgacctaat 9240 ggtgggtttc agaacggacc caaaagaagac agtcatacc ggacacccc ttgacctaat 9240 ggtgggtttc agaacggacc caaaagaagac agtcataccc gagacgacc ccaaaacca gcccaaccc ggacacccc		tgagcagggc	cacgctgttg	tggcaaactt	atgttctggt	gtcatcttga	tgagacctca	8040
acccacaaag gcagaacttg agttgtcaa acaataatt caagcatgtg aagttagggg gggggggggg		cccaccgtcc	cttgttgatg	ttcttctgaa	acccggactt	gacacaaaac	ccggcattca	8100
egggacgec eggacetec aacteetta caagetetat eetgttagag gggateetga 8280 geggeateggg ggeegetta teaataceag gtttggagat etatettaca aaaceeetca 8340 agacaceaag teegcaatee atgeggettg ttgeetgeae eecaaegggg eecetgtgte 8400 tgatggtaag teaacactag gtaceaecet teaacatggt ttegaacett tatgteeceae 8460 tgtgeectat agtgteatgg agtacetega tteaaegeet gacacecett teatgtgeae 8520 taaacatggt acttecaagg etgetgeaga agacetecaa aaatacgaee tatetacea 8580 aggatttge etgeegggg tettacgeet tgtacgeaga tteatetttg gecatattgg 8640 taaggeaag eecatgttee teeegteaae etateeeget aaaaatteta tggeagggat 8700 eaatggeeag ggtteecaa eaaaggaegt eetgaaatte tggeagggat 8700 eetgacegge gteaaggaaga attggeaaae etgaaeaettg tgtaceetaa agaaacagagggat 8760 tgeeeggeg gecaaaaeea ggaceateet gggeaceaea eetgaaattg aegaaatgtg 8760 tgeeeggeg eecaaaaeea ggaceateet gggeaceaea eacttattg eectggetea 8880 eegateggge eecetgggg teaacaeeagge atteatgaag aaggettgga agteeeegat 8940 tgeetggga aaaaacaaaat teaagggaget geattgeaet gtegeegga ggtgteetga 9000 ageegacttg ggeeteetggt acegeageae eecegeeatt gtgaggtggt tegaggegge eecetggge 9180 ggaceeeget gtggeaaeae aggatggtge ettaaeaeeg atatteaetg agaatetgtg ttaaeeegga 9120 eeatgaggttte eaacacegt aatteeaeg ggeggggggggggggggggggggggg		accagggcat	ggggccggga	atatgggcgt	agacggctct	acttgggatt	ttgaaaccgc	
geggeatggg ggeegeetta teaataccag gtttggagat ctatettaca aaaccectca 8340 agacaccaag teegeaatee atgeggettg ttgeetgeae eecaaggggg ceeetgtgte 8400 tgatggtaag teaacactag gtaccaccet teaacatggt ttegaacttt atgteeceae 8460 tgtgeectat agtgteatgg agtacetega tteaacgeeet gacaccectt teatgtgeae 8520 taaacatggt actteecaagg etgetgeaga agacetecaa aaatacgaee tatetaetea 8580 aggatttgte etgeeegggg tettaegeet tgtaeegaga tteatettg geeatattgg 8640 taaggeaeg ecattgttee teeegteaae etaateceget aaaaatteta tggeagggat 8700 caatggeeag aggtteecaa caaggaegt etgaeegeae etgaeaettg geeatattgg 8760 tgeeeggeeg gteaagggaa attggeaaee tgtgaeaeet tggaeaettg geeatatgg 8760 tgeeeggege gteaagggag attggeaaee etgaeetee ggeaeaeteet gggeaeeeae aactttattg eegggetea 8880 eegateggeg etcaagggag attggeaaee etgaeeeeae aggaeettgga agteeeegae 8840 tgeetgggga aaaaacaaat teaaggaget gggeaeeae aactttattg eegggetea 8880 eegateggeg etcagtgggg teaeeeagge atteatgaag aggeettgga agteeeegae 8940 tgeetggga aaaaacaaat teaaggaget geatetgeaet geetgeegea ggetgeetea 8940 eegatggeegeeae eegeageae eegegaegee eegeggggggeegeeae eegegaegee eegegaegee eegegggggeegeeaee eegegggggeegeeaee eegegaegee eegegaegee eegegagggggggg		acccacaaag	gcagaacttg	agttgtccaa	acaaataatt	caagcatgtg	aagttaggcg	8220
agacaccaag teegeaatee atgeggettg ttgeetgeae eccaaegggg eccetgtgte 8400 tgatggtaag teaacactag gtaccaccet teaacatggt ttegaacttt atgteeccae 8460 tgtgeectat agtgteatgg agtacctega tteaegeect gacacceett teatgtgeae 8520 taaacatggt acteeaagg etgetgeaga agaceteeaa aaatacgace tatetactea 8580 aggatttgte etgeeegggg tettaegeet tgtaegeaga tteatetttg gecatattgg 8640 taaggeaceg ecattgttee teeegteaae etateceget aaaaatteta tggeagggat 8700 caatggeeag aggtteecaa eaaaggaegt eccagageata eetgaaattg acgaaatgtg 8760 tgeeeggee gteaaggaga attggeaaae tgtgaeaeet tgtaecetea agaaacagta 8820 etgtteeag eccaaaaeea ggaeeateet gggeaeeaea aactttattg eeetggetea 8860 eegateggeg eteagtggtg teaeceagge atteatgaag aggeteegaa 8940 tgeettggga aaaacaaat teaaggaget geattgaag geattggaa agteeegaa 8940 ageegaettg geeteettgga aeegeagee eeegeatt gtgaggtggt tegteegaa 9060 eeteetgta gaaettgeag gatgtgaaga gtaettgeet agetatgtge ttaaeetgeg 9120 eeatgaeett gtggeaeaea aggatggtge etteaaaaa eegeggtggee tgtegteegg 9180 ggaeeceett geettaaaaa tgggteatga aaateeagee tatteeteg aggaaeegaee 9300 eaaattegag gaeeteeteg aaateeagee tatgttegte aggaeecaet 9300 eaaattegag gaeeteeteg aaateeagee tatgttegte tatetetgag acettgetet 9360 gtaegetgaa aggeecaett teetaatta teaetggtgg gtegageaee ttgaeetaat 9420 getgggttte agaaegggee gaeageegee eaaagaagae agteataaee gaeegeaee tggetgetet 9360 gtaegetgaa aggeeggge gaeagetggt eectaataee gaeegeaee tggetgetet 9540 egeatateae atgagggeg gaeageeete agagtatat gegetgetge eegaatee tggetgetet 9540 egeatateae atgaggege agaaegeete agagtatata gegetgetge eegaaeee tegeegge tateeteegg tateegeega tateeteegg tateegeega tateeteegg tateegeega tateeteegg tateegeega tateeteegg tateegeega tateegeega tateeteegg tateegeega tateegeega tateegeega tateegeega tateegeega tateegeega tateegeega tateegeega eegaateee tggetgetee eegaateee eegaaggatee eecaaggatee eecaaggatee eecaagaggae eecaagaggee eecaagaggae eecaagagae eecaagagae eecaagagaee eegaagaeeee eagaagaeee e		cggggacgcc	ccgaacctcc	aactccctta	caagctctat	cctgttagag	gggatcctga	8280
tgatggtaag tcaacactag gtaccaccct tcaacatggt ttcgaacttt atgtcccac 8460 tgtgccctat agtgtcatgg agtacctcga ttcacgccct gacacccctt tcatgtgcac 8520 taaacatggt acttccaagg ctgctgcaga agacctccaa aaatacgacc tatctactca 8580 aggatttgtc ctgccgggg tcttacgcct tgtacgcaga ttcatctttg gccatattgg 8640 taaggcaccg ccattgttcc tcccgtcaac ctatcccgct aaaaattctat tggcaggggt 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 aggcttgga agtccccgat 8940 tgccttggga aaaaacaaat tcaaggagct gcattgcact gtcgccggca ggtgtcttga 9000 agccgacttg gcctcctgtg accgcagaca ccccgcatt gtgaggtggt tcgcccaa 9060 cctcttgtat gaacttgcag gatgtgaaga gtacttgcca aggatggtgt tcaccagca 2000 ccatgacctt gtggcaacac aggatggtgc cttcacaaaa cgcggtggcc tgtcgtccgg 9180 ggaccccgtc accagtgtgt ctaacaccgt atattcactag aggatcccgg 9180 ggaccccgtc accagtgtgt ctaacaccgt atattcactag aggaacagct 9300 caaattcgag gacctcctcg aaatccagcc tatgttggtc tattctgatg accttgctt 9360 gtacggtgaa aggcccactt tcctaatta tcactggtgg gtcgagcacc ttgacctaat 9420 gctggtttc agaacggacc caaagaagac agacagctggt ccctaacac gcttcctcgg 9480 ctgcagaatt gaggcggggc gacagcctc acaaggagct cccaaacac gaccgcatcct ggacgcacc ttgcctccg 9480 ctgcagaatt gaggcggggc gacagcctc agagatatat gaggccgcac ttgcctccg 9600 cccatacaca agagaggcc aaaacgcctc agagatataa ggccgcatcc tggctgctc 9540 cgcatacaca agagaggcc agaacgccc aggatatat gcgccgcac tttcatctgg 9660 tatcgccga tgggcccgc aggatggtt tagttccca aggccgcact tttcatctgg 9720 catgtggaa aagcccacc aggatggtt tagttccca ggccgcact tttcatctgg 9720 catgtggaa aagcccacc aggatggtt tagttccca ggccggcat ttttcatgtc 9720 catgtggaa aagccgcac aggatggtt tagttccca ggccggcatcct ggcgcatccc 9720 catgtggaa aagccgcac aggatggtta tagttccca ggccggcat ttttcatgtc 9720 catgtgggaa aagccgac aggatagaa gtcacaatga aggccacac ggccggcatcct ggcgcatccc 9780								
tgtgeectat agtgteatgg agtacetega tteaegeett gacacecett teatgtgeae 8520 taaacatggt actteeaagg etgetgeaga agaceteeaa aaatacgaee tatetaetea 8580 aggatttgte etgeeegggg tettaegeet tgtaegeaga tteatetttg gecatattgg 8640 taaggeaeg ecattgttee teeegteaae etateeeget aaaaatteta tggeagggat 8700 caatggeeag aggtteeeaa eaaaggaegt ecagageata eetgaaattg aegaaatgtg 8760 tgeeeggee gteaaggaag attggeaaee tgtgaeaeet tgtaeeetea agaacagta 8820 etgtteeag eceaaaacea ggaeeateet gggeaeeaae aactttattg eeetggetea 8880 eegateggeg eteagtggtg teeaeeagge atteatgaag aaggettgga agteeeegat 8940 tgeettggg aaaaacaaat teaaggaget geattgeaet gtgaggetga agteeeegat 8940 eeteetggg aeeteetgtg aeegeageae eeegeeatt gtgaggtggt tegtegeeaa 9060 eeteetgta gaaettgeag gatgtgaaga gtaettgeet agetatgtge ttaaeetgetg 9120 eeatgeetgt gtggeaeae aggatggtge etteeaaaa eggatggtge etteeaeaa eggatgtgee etteeaeaa eggatgegee tgtegteegg 9180 ggaeeeegte aeeagtgtgt etaaeaeegt atateeaetg ataateetatg eeeagaeaet 9240 ggtgttgeg geettaaaaa tgggteatga aateeggtee aateetgete ggegggeee eggagaeegee 9300 eaaattegag gaeeteeteg aaateeagee tatgttggte tatteetgatg aeettgeett 9300 eaaattegag gaeeteeteg aaateeagee tatgttggte tatteetgat aeettgeett 9300 eaaattegag gaeeteeteg aaateeagee tatgttggte tatteetgat aeettgeett 9300 eaaattegag gaeeteeteg aaateeagee tatgttggte tatteetgat aeettgeet 9480 etgeaggttee agaaegggeg gaeagetggt eeetaataeet gataaaeee 9420 getgggtte agaaegggg gaeagetggt eeetaataeet gataaaeeea getteetegg 9480 etgeagaatt gaggggggg gaeagetggt eeetaataeet gataaaeee 9420 egeatatee atgaggggg gaeagetggt eeetaataeet gataaaeee 9420 egeatatee atgaggggg gaeagetget eeetaatege gaeegeatee tggetgetet 9540 egeatatee atgaggggg gaeagetggt eeetaataeet gaggtattat gegtetgete egeaateeet 9600 gatggattea tgtgetege aggaegetee aggatgtta tatgaggaee teatetgegg 9660 tategeega teggeegee aggatggtaa tatgtteeea ggeeeggeat ttteategte 9720 eatgtgggaa aagetggaa aagetggaa gaeagetggt aaggaagaaa ttteateet geggeeggeateet 9780								
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 gtcaagggaa attggcaaac tgtgacacct tgtaccctca agaaacagta 8820 ccgatcggcg cccaaaacca ggaccatcct gggcaccaac accttgategg accaggggt tcacccagge attcatgaag aggccttgga aggcccgat 8940 tgccttggga aaaaacaaat tcaaggaget gcattggact gtcgccggca ggtgtcttga 9000 agccgacttg gcctcctgtg accgcagcac ccccgccatt gtgaggtgt tcgtcccgat 9060 cctcctgtat gaacttgcag gatgtgaaga gtacttgcct agctatgtgc ttaactgctg 9120 ccatgacctt gtggcaacac aggatggtc cttcacaaaa cgcggtggcc tgtcgtccgg 9180 ggaccccgtc accagtgtgt ctaacaccgt atattcactg ataatctatg cccagcacat 9240 ggtgttgtcg gccttaaaaa tgggtcatga aatcggtct aaatctatg cccagcacat 9240 ggtgttgtcg gacctcctcg aaatccagcc tatgttggt tattctgatg accttgtctt 9360 gtacgctgaa aggcccactt tcctaatta tcactggtgg gtcgagcacc ttgacctaat 9420 gctggtttc agaacggacc caaagaagac ccaaagacca ggtcataccc gacagcact ttcctaatta tcactggtgg gtcgagcacc ttgacctaat 9420 gctggtttc agaacggacc caaagaagacc cccaacatcgc gacagcaccc ttgacctaat 9420 gctggtttc agaacggacc aaaacacaca gccttcctcgg 9480 cgcatatcac gagggggc gacagctgt ccctaatcgc gacagcacc tggctgctct 9540 cgcatatcac atgaagggcc agaacgcctc aggatatat gccccgaatcc tggctgctct 9540 cgcatatcac atgaagggcc aagacgcctc aggatgtta tagtgtctcca ggcccgcat ttttcatgtc 9600 gatggattca tggcccgcc aggatggtta tagttccca ggcccgcat ttttcatgtc 9720 catgtgggaa aagctggaa gtcacaatga aggcagaaaacacca gccccgcatct tttcatatta ccctgagtgg tatgaagac tcatctcgg 9660 tatcgccga tggcccgcc aggatggtta tagttccca ggcccgcatct gcgcaatcct 9720 catgtgggaa aagctggaa gtcacaatga agggaagaaaa ttttcgaccc ggcgcatcct 9780								
aggatttgtc ctgccgggg tcttacgct tgtacgcaga ttcatctttg gccatattgg 8640 taaggcacg ccattgttc tcccgtcaac ctatccgct aaaaattcta tggcagggat 8700 caatggccag aggttcccaa caaaggacgt ccagagcata cctgaaattg acgaaatgtg 8760 tgcccgcgcc gtcaaggaga attggcaaac tgtgacacct tgtaccctca agaaacagta 8820 ctgttccaag cccaaaacca ggaccatcct gggcaccaac aactttattg ccctggtca 8880 ccgatcgggg ctcagtggtg tcacccaggc attcatgaag aaggcttgga agtccccgat 8940 tgccttggga aaaaacaaat tcaaggagct gcatgcact gtcgccggca ggtgtcttga 9000 agccgacttg gacttcctgtg accgcagcac cccgccatt gtgaggtggt tcgtcgcaa 9060 cctcctgtat gaacttgcag gatgtgaaga gtacttgcct agcatgtgt ttaactgctg 9120 ccatgacctt gtggcaacac aggatggtg cttcacaaaa cgcggtggcc tgtcgtccgg 9180 ggaccccgtc accagtgtgt ctaacaccgt atattcactg ataatctatg cccagcacat 9240 ggtgttgtcg gccttaaaaa tgggtcatga aatccagcc tatgttggtc aagtcctctcg aggaccacct ttcctaatta tcactggtgg gtcgagcacc ttgacctaat 9420 gctggtttc agaacgcact ttcctaatta tcactggtgg gtcagacacc gcttcctcgg 9480 ctgcagaatt gaggcgggc agaacgccc ccaaagaagac agtcataacc ggatcaccac ttggctgcc 9480 cgcatatcac atgaaggcg agaacgccc aggatatat gcgtctgctg ccgcaatcct 9600 gatggattca tgtgcttgca aggacgccc aggatggtt tagtcgcac aggatgtat tagttgccac ggccgcat tttcatgt 9720 catgtgggaa aagctgaaa aggccaataga gtcacaatga ggcccggaat ttttcatgtc 9780		tgtgccctat	agtgtcatgg	agtacctcga	ttcacgccct	gacacccctt	tcatgtgcac	
taaggcacg ccattgttc tecegtcaac ctateceget aaaaatteta tggcagggat 8700 caatggccag aggtteccaa caaaggacgt ccagagcata cetgaaattg acgaaatgtg 8760 tgcccgcgcc gtcaaggaga attggcaaac tgtgacacct tgtaccetca agaaacagta 8820 ctgttccaag cccaaaacca ggaccatcet gggcaccaac aactttattg ccctggctca 8880 ccgatcggcg ctcagtggtg tcacccaggc attcatgaag aaggcttgga agtccccgat 8940 tgccttggga aaaacaaat tcaaggagct gcattgcact gtcgccggca ggtgtettga 9000 agccgacttg gcctcctgtg accgcagcac ccccgcatt gtgaggtggt tcgtcgccaa 9060 cctcctgtat gaacttgcag gatgtgaaga gtacttgcct agctatgtgc ttaactgctg 9120 ccatgacctt gtggcaacac aggatggtgc cttcacaaaa cgcggtggcc tgtcgtccgg 9180 ggaccccgtc accagtgtgt ctaacaccgt atattcactg atattcattg accagcacat ggtgttttcg gccttaaaaa tgggtcatga aatcggtcc aaatccagc gatgtgtgc caaatccagg gacctcctccg aaatccagcc tatgttggtg tattctgatg accttgtctt ggcgcaacac ttcctaatta tcactggtgg gtcgagcacc ttgacctaat 9300 gaccgctgaa aggcccactt ttcctaatta tcactggtgg gtcgagcacc ttgacctaat 9420 gctgggttc agaacggcc caaagaagac agtcataacc gataaaccca gcttcctcgg 9480 ctgcagaatt gaggcggggc gacagctggt ccctaatcgc gaccgcatcc tggctgctc 9540 cgcatatcac atgaaggcg agaacgcctc agagtattat gcgtctgctg ccgcaatcct 9600 gatggattca tgtgcttgca ttgaccaatga aggccagcat ttttcatgtc 9720 gatggaaa aagctggaa aagctggaa aggcagaaa attccaca ggcccggcat ttttcatgtc 9720 catgtgggaa aagctgggaa aaggtggtaa aggcagaaaa aggcacact ggcgcaatct ggcgcatct ggcgcatct ggcgcatct ggccatct ggcgcatct ggcccgca aggatggtta tagttccca ggcccgcatct ggcgcatct ggcccgca ttttcatgtc 9720 gatggaaa aagctgagaa aggcagaaaa aggcaaataa agggaagaaa tttcatggc gccgcatct ggcgcatct ggcccgca aggatggta tagttccca ggcccggcat ttttcatgtc 9720 gatgggaa aagctgagaa aggcaaataa agggaagaaa attccaaaaa aggccaact ggcgcaatct ggcgcaatct ggcccgaaaccaaggaaaaaaggaaaaaggaaaaaaggaaaaaa								
caatggccag aggttccaa caaaggacgt ccagagcata cctgaaattg acgaaatgtg 8760 tgcccgcgc gtcaaggaga attggcaaac tgtgacacct tgtaccctca agaaacagta 8820 ctgttccaag cccaaaacca ggaccatcct gggcaccaac aactttattg ccctggctca 8880 ccgatcggcg ctcagtggtg tcacccagge attcatgaag aaggcttgga agtccccgat 8940 tgccttggga aaaaacaaat tcaaggagct gcattgcact gtcgccggca ggtgtcttga 9000 agccgacttg gcctcctgtg accgcagcac ccccgcatt gtgaggtggt tcgtcgccaa 9060 cctcctgtat gaacttgcag gatgtgaaga gtacttgcct agctatgtgc ttaactgctg 9120 ccatgacctt gtggcaacac accagtgtg ctaacaccgt atattcactg ataatctatg cccagacat 9240 ggtgttgcg gccttaaaaa tgggtcatga aatcggtct aagttcctcg aggaacacgc accagtgtg ctaacaccgt atattcactg aggaacacgc aagttcgtcg gctgggcc ttgcgccaat 9300 ccaattcgag gacctcctcg aaatccagcc tatgttggtc atattctgat acctggtctt gtgcgccact ttcctaatta tcactggtgg gtcgagcacc ttgacctaat 9420 gctgggtttc agaacggacc caaagaagac agtcataact gataaaccca gcttcctcgg 9480 ctgcagaatt gaggcgggc agaacgctggt ccctaatcgc gaccgcatct tggctgctct 9540 cgcatatcac atgaaggeg agaacgcctc aggatatat gcgtctgctg ccgcaatcct 9600 gatggattca tgtgcttgaa aggacgctc aggatggtta tagttccca ggcccgcat ttttccatgtc 9720 gatgggaa aagctggaa gtcacaatga agggaagaaa tttcgaccat gcggcatctg 9780								
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 tcgtcgcaa 9060 cctcctgtat gaacttgcag gatgtgaaga gtacttgcct agctatgtgc ttaactgctg 9120 ccatgacctt gtggcaacac aggatggtgc cttcacaaaa cgcggtggcc tgtcgtccgg 9180 ggaccccgtc accagtgtgt ctaacaccgt atattcactg ataatctatg cccagcacat 9240 ggtgttgtgg gccttaaaaa tgggtcatga aatcggtcc 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 agaacgcctc agagtattat gcgtctgctg ccgcaatcct 9600 gatggattca tgtgcttgca ttgatcatga ccctgagtgg tatgaggacc tcatctgcgg 9660 gatggattca tgtgcttgca ttgatcatag ccctgagtgg tatgaggacc tcatctgcgg 9660 tatcgccga tgcgcccgc aggatggtta tagtttcca ggcccgcat ttttcatgtc 9720 catgtgggaa aagctgagaa gtcacaatga agggaagaaa ttttcgacact gcggcatctg 9780								
ctgttccaag cccaaaacca ggaccatcet gggcaccaac aactttattg ccctggctca 8880 ccgatcggcg ctcagtggtg tcacccagge 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 aatcggtct aagttcctcg aggaacagct 9300 caaattcgag gacctcctcg aaatccagce tatgttggtc tattctgatg accttgtct 9360 gtacgctgaa aggcccactt tcctaatta tcactggtgg gtcgagcacc ttgacctaat 9420 gctgggtttc agaacggacc caaagaagac agtcataact gataaaccca gcttcctcgg 9480 ctgcagaatt gaggcggggc gacagctggt ccctaatcgc gaccgcatcc tggctgctc 9540 cgcatatcac atgaaggcgc agaacgcctc agagtattat gcgtctgctg ccgcaatcct 9600 gatggattca tgtgcttgca ttgatcatga ccctgagtgg tatgaggacc tcatctgcgg 9660 tatcgccga tgcgcccgcc aggatggtta tagtttccca ggcccggcat ttttcatgtc 9720 catgtgggaa aagctgagaa gtcacaatga agggaagaaa tttcgacact gcggcatctg 9780								
ccgatcggcg ctcagtggtg tcacccagge 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 aatcggtct 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 gaggcgggc gacagctggt ccctaatcgc gaccgcatcc tggctgctct 9540 cgcatatcac atgaaggcgc agaacgcctc agagtattat gcgtctgctg ccgcaatcct 9600 gatggattca tgtgcttgca ttgatcatga ccctgagtgg tatgaggacc tcatctgcgg 9660 tatcgcccga tgcgcccgcc aggatggtta tagtttcca ggcccggcat ttttcatgtc 9720 catgtgggaa aagctgagaa gtcacaatga agggaagaaa tttcgacact gcggcatctg								
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 gaggcgggc gacagctggt ccctaatcgc gaccgcatcc tggctgctct 9540 cgcatatcac atgaaggcgc agaacgcctc agagtattat gcgtctgctg ccgcaatcct 9600 gatggattca tgtgcttgca ttgatcatga ccctgagtgg tatgaggacc tcatctgcgg 9660 tatcgcccga tgcgcccgcc aggatggtta tagttccca ggcccgcat ttttcatgtc 9720 catgtgggaa aagctgagaa gtcacaatga agggaagaaa tttcgacact gcggcatctg								
agccgacttg gcctcctgtg accgcagcac ccccgccatt gtgaggtggt tcgtcgcaa 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 gaggcgggc 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								
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 gaggcgggc 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								
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 gaggcgggc 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								
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								
ggtgttgtcg gccttaaaaa tgggtcatga aatcggtctc aagttcctcg aggaacagct 9300 caaattcgag gacctcctcg aaatccagce tatgttggtc tattctgatg accttgtctt 9360 gtacgctgaa aggcccactt ttcctaatta tcactggtgg gtcgagcacc ttgacctaat 9420 gctgggtttc agaacggacc caaagaagac agtcataact gataaaccca gcttcctcgg 9480 ctgcagaatt gaggcgggc 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								
caaattcgag gacctcctcg aaatccagce tatgttggte tattetgatg acettgtett 9360 gtacgetgaa aggeccactt tteetaatta teactggtgg gtegageace ttgacctaat 9420 getgggttte agaacggace caaagaagae agteataact gataaacea getteetegg 9480 etgeagaatt gaggeggge gacagetggt cectaatege gaccgcatee tggetgetet 9540 egeatateae atgaaggege agaacgeete agagtattat gegtetgetg eegeaateet 9600 gatggattea tgtgettgea ttgateatga eeetgagtgg tatgaggaee teatetgegg 9660 tategeeega tgegeeege aggatggtta tagtteeea ggeeeggeat tttteatgte 9720 eatgtgggaa aagetgagaa gteacaatga agggaagaaa tttegacact geggeatetg								
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 tgcgccgcc aggatggtta tagttccca ggcccggcat ttttcatgtc 9720 catgtgggaa aagctgagaa gtcacaatga agggaagaaa tttcgacact gcggcatctg								
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								
ctgcagaatt gaggcgggc 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								
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	İ						_	
gatggattca tgtgcttgca ttgatcatga ccctgagtgg tatgaggacc tcatctgcgg 9660 tatcgcccga tgcgcccgcc aggatggtta tagtttccca ggcccggcat ttttcatgtc 9720 catgtgggaa aagctgagaa gtcacaatga agggaagaaa tttcgacact gcggcatctg 9780								
tategecega tgegecegee aggatggtta tagttteeca ggeceggeat tttteatgte 9720 catgtgggaa aagetgagaa gteacaatga agggaagaaa tttegacaet geggeatetg 9780	J							
catgtgggaa aagctgagaa gtcacaatga agggaagaaa tttcgacact gcggcatctg 9780							-	
	l							
egacyccaaa geegaceatg cateegeetg tgggettgat ttgtgtttgt tecaeteaca 9840	l							
	Į.	cgacgccaaa	geegaeeatg	catecgeetg	tgggcttgat	ttgtgtttgt	tccactcaca	9840

```
ctttcatcaa cactgccccg tcactctgag ctgtggtcat catgccggtt caagggaatg
ttcgcagtgt cagtcacctg ttggggctgg cagatctcct cttgatgccg tgctaaaaca
aatcetqtac aaaccteete gtacagteat catgaaggtg ggtaacaaaa caacggeeet 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 geeteaggae tteettteee accaectgee aggteeggge egtgggttag 10380
gctcgtggcc agcgggcacg tccccggccg aacatcatac ctcgatgagg ctggatattg 10440
taatcatctq qacattctca qactqctttc caaaacaccc ctcqtqtqtt tgggtgacct 10500
tcaacaactt caccetqtcq qctttqactc ctactqttat qtqtttqatc aqatqcctca 10560
aaagcaactg accactattt atagatttgg ccctaacatc tgcgcagcca tccagccttg 10620
ttacagggag aagcttgaat ctaaggctag gaacaccagg gtggtcttta ccacctggcc 10680
tgtggccttt ggtcaggtgc tgacaccata ccataaagat cgcatcggct ctgcgataac 10740
catagactca teccaggggg ceaetttega cattgtgaca ttgcatetac catcaccaaa 10800
gtccctaaat aaatcccgag cacttgtagc catcactcgg gcaagacacg ggttgttcat 10860
ttatgaccct cacaaccage tecaggagtt tttcaacctg atccctgage geactgattg 10920
caaccttgtg ttcagccgtg gggatgatct ggtagttctt agtgcggaca atgcagtcac 10980
aactgtagcg aaggccctag ggacaggtcc atctcgattt cgagtatcag acccgaggtg 11040
caagtetete ttagetgett gtteggeeag tetggagggg agetgtatge caetaceaca 11100
agtggcacat aacctggggt tttacttctc cccagacagt ccagcatttg cacctctgcc 11160
aaaggagtta gcgccacatt ggccagtggt tactcaccag aacaatcggg cgtggcccga 11220
tegactigie getagtatge geccaatiga tgecegetae ageaageeaa tggteggtge 11280
agggtatgtg gtcgggccgt ccacctttct tggtactcct ggtgtagtgt catactacct 11340
cacgetatac atcaggggtg agececagge cttgccagag acactegttt caacaggacg 11400
catagccact gactgccggg agtatctcga cgcggctgag gaagaggcag caaaagaact 11460
ccccacgca ttcattggcg atgtcaaagg taccacggtc ggggggtgtc accacatcac 11520
atcaaaatac ctacccagga ccctgcctaa ggactctgtt gctgtagttg gagtaagctc 11580
gcccggcagg gctgctaaag ccatgtgcac tctcactgat gtgtatctcc ccgaactccg 11640
gccatacetg caacetqaga eggcgtegaa atgctggaaa etcaaattag acttcaggga 11700
cqtccqacta atqqtctqqa aaqqaqccac cqcctatttc caqttqqaaq qacttacatq 11760
qtcaqcqctq cctgactatq ccaggtttat tcaqcttccc aaqgacgccg 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
ctacactgae tacaactggg attgtgtteg agaacgeeca cacgecatet acgggegtge 12120
tegtgaceat acatateatt ttgeceeegg caeggaattg eaggtagage tgggtaaace 12180
ceggetgeeg cetggaegag ageegtaaac ttggagtgat geaatggggt caetgtggag 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
tototogoog catttaccag accatggaac attcaggtca agoggootgg aaatatgtgg 12600
teggtgagge caeteteaeg aagetateaa agettgatat agttaeteat tteeaacate 12660
tggccgcagt agaggcggat tcttgccgct ttctcagctc acgactcgtg atgctaaaaa 12720
atottgccgt tggcaatgtg agcctacagt acaacaccac gttggatcgc gttgaactca 12780
ttttccccac gccaqqtacq aggcccaaqt tgaccqactt caqacaatqq ctcatcaqtg 12840
tgcatgcttc cattttttcc tctgtggctt catctgttac cttgttcata gtgctttggc 12900
tgcgaattcc agctctacgc tatgtttttg gtttccattg gcccacggca acacatcatt 12960
egagetgace ateaattata ecatatgeat geeetgtett accagteaag eagetegeea 13020
aaggetegag eeeggtegta acatgtggtg cagaataggg catgataggt gtgaggageg 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
qcttttttcc tcctggttgg tgctcaacat atcatggttt ctgaggcgtt cgcctgtaag 13440
coetgtttet egacgeatet ateagatatt aagaccaaca egacegegge tgeeggttte 13500
atggtccttc agaacatcaa ttgttcccgg cctcacgagg cctcagcaac gcaaggtcaa 13560
gttccctcca gaaagtcgtc ccaatgccgt gaagccgtcg gtqttcccca atacatcacg 13620
ataacggcca acgtgaccga cgaatcatat ttgtacaacg cggacttgct gatgctttct 13680
gegtgeettt tetaegeete ggaaatgage gagaaagget ttaaagttat etttgggaat 13740
gtetetggeg ttgtttetge ttgtgteaat tteacagatt atgtggeeca tgtgaeceaa 13800
catacccaqc agcatcatct ggtgattaat cacatccggt tactgcactt cctgacacca 13860
tetgeaatga ggtgggetac aaccattget tgtetgtteg ceattetett ggegatatga 13920
aatgttetea caaattgggg catteettga eteegeacte ttgettetgg tggetttttt 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
togtatgett egteateegt getgetaaaa attgeatgge etgeegetat geeegtaeee 14340
ggttcaccaa cttcattgtg gacgaccggg ggggagttca tagatggaag tctccaatag 14400
tggtagaaaa actgggcaaa gccgaaattg gcggcaacct tgtcaccatc aaacatgtcg 14460
tectegaagg ggttaaaget caaccettga egagaactte ggeegageaa tgggaggeet 14520
agataatttt tgcaacgatc ctaccgccgc acaaaagatc gtgctagcct tcagcatcac 14580
atacacact ataatgatat acqcccttaa ggtgtcacgc ggccgactcc tggggctgtt 14640
gcacatecta atattetga actgtteett tacattegga tacatgacat atgtgcattt 14700
teattetace cacegtgteg caettaceet gggggetgtt gtegeeettt tgtggggtgt 14760
ctacagecte acagagteat ggaagtttat cacttecaga tgcagattgt gttgcctcgg 14820
coggogatac attotggccc otgcccatca ogtagaaagt gotgcaggto tocattcaat 14880
ctcagcgtct ggtaaccgag catacgctgt gagaaagccc ggactaacat cagtgaacgg 14940
cactctagta ccaggacttc ggagcctcgt gctgggcggc aaacgagctg ttaaacgagg 15000
agtggttaac ctcgtcaagt atggccggta aaaatcagag ccagaagaaa aagaaaagta 15060
eggeteeaat ggggaatgge eagecagtea ateaactgtg eeagttgetg ggtgeaatga 15120
taaagteeca gegeeageaa eetaggggag gacaggetaa aaagaaaaag eetgagaage 15180
cacattttcc cctggctgca gaagatgaca tccggcacca cctcacccaa actgaacgct 15240
contetgett geaategate eagacggett teaateaagg egeaggaact gegtegettt 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.

5

15

- 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.
- 10 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.
- 20 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.
- 15 32. Keffaber, K. K. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. Am. Assoc. Swine Pract. Newsl. 1:1-9.

5

25

35

- 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.

5

15

- 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.
- 45 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.
- 10 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.
- 15 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

25 Fang, Ying

5

20

Nelson, Eric A.

Hennings, Jane

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

30 <130> 1210. 1112111

<150> 60/496, 080

<151> 2007-06-25

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

35 <210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial; cebador

<400> 1

40 gcatggctct taaggcagac 20

<210>2

<211> 20

<212> ADN

	<213> artificial; cebador	
	<400> 2	
	cagcttcaag gcagttgtca	20
	<210>3	
5	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> artificial; cebador	
	<400> 3	
	tgttgtgatc ggcggtatta	20
10	<210>4	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> artificial; cebador	
	<400> 4	
15	cggcgcgggc acacatttcg tcaattt	27
	<210>5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> artificial; cebador	
20	<400> 5	
	tacgacctat ccacccaagg	20
	<210>6	
	<211> 22	
	<212> ADN	
25	<213> artificial; cebador	
	<400> 6	
	gaatctatgg ttatcgcaga gc	22
	<210>7	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> artificial; cebador	
	<400> 7	
	cctcgatgag gctggatatt	20
	<210>8	
35	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> artificial; cebador	

	<400> 8	
	gcaccaacca ggaggaaaaa agc	23
	<210>9	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> artificial; cebador	
	<400> 9	
	cattcttgcg tccctcaaat	20
	<210> 10	
10	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> artificial; cebador	
	<400> 10	
	cgacagtctt tctgccatca atg	23
15	<210> 11	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> artificial; cebador	
	<400> 11	
20	gctgctgttg tcctgtgtt	19
	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> artificial; cebador	
25	<400> 12	
	ccgtcgaagg gggtggcatc c	21
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> artificial; cebador	
	<400> 13	
	tcattcgagc tgaccatcaa	20
	<210> 14	
	<211> 21	
35	<212> ADN	
	<213> artificial; cebador	
	<400> 14	

	ctttatcatt gcacccagca a	21				
	<210> 15					
	<211> 42					
	<212> ADN					
5	<213> artificial; cebador					
	<400> 15					
	ggcgcgccta atacgactca ctatagatga	tgtgtagggt at	42			
	<210> 16					
	<211> 25					
10	<212> ADN					
	<213> artificial; cebador					
	<400> 16					
	cgcgggcgcc tgagttcgac aaatt	25				
	<210> 17					
15	<211> 22					
	<212> ADN					
	<213> artificial; cebador					
	<400> 17					
	caacgateet acegeegeae aa	22				
20	<210> 18					
	<211> 79					
	<212> ADN					
	<213> artificial; cebador					
	<400> 18					
	ggcgatcggg cgtctaggaa	ttctagattt	ttttttttt	ttttttttt t	tttttttt	60
25	tttttttaa tttggtcac					79
	<210> 19					
	<211> 23					
	<212> ADN					
	<213> artificial; cebador					
30	<400> 19					
	ggcgatcggg cgtctaggaa ttc	23				
	<210> 20					
	<211> 22					
	<212> ADN					
35	<213> artificial; cebador					

	<400> 20		
	caacgatcct accgccgcac aa	22	
	<210> 21		
	<211> 22		
5	<212> ADN		
	<213> artificial; cebador		
	<400> 21		
	ggccccagtg ctgcaatgat ac	22	
	<210> 22		
10	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> artificial; cebador		
	<400> 22		
	agaagaaaaa gaaaagtact gctccaatgg g		31
15	<210> 23		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> artificial; cebador		
	<400> 23		
20	ccccattgga gcagtacttt tctttttctt	30	
	<210> 24		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> artificial; cebador		
25	<400> 24		
	gctcagatgg tgagcaaggg cgaggagc	28	
	<210> 25		
	<211> 31		
	<212> ADN		
30	<213> artificial; cebador		
	<400> 25		
	gagtetgaag aggaettgta eagetegtee a	31	
	<210> 26		
	<211> 28		
35	<212> ADN		
	<213> artificial; cebador		

<400> 26

	tgctgacttt cttgctgatc cacctcct	28
	<210> 27	
	<211> 26	
	<212> ADN	
5	<213> artificial; cebador	
	<400> 27	
	ccttgctcac catctgagca ctcccg	26
	<210> 28	
	<211> 29	
10	<212> ADN	
	<213> artificial; cebador	
	<400> 28	
	gctgtacaag tcctcttcag actccaaga	29
	<210> 29	
15	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> artificial; cebador	
	<400> 29	
	gcggacccag ccaggatcag ac	22
20	<210> 30	
	<211> 100	
	<212> PRT	
	<213> Virus del síndrome reproductiv	o y respiratorio porcino; 691 a 790 de ORF1a
	<100> 20	

Gln Glu Ser Gly His Lys Ala Val His Ala Val Pro Leu Ala Gly Gly

Pro Asn Asn Glu Gln Val Gln Val Val Ala Gly Glu Gln Leu Glu Leu

Gly Gly Cys Gly Leu Ala Ile Gly Ser Ala Gln Ser Ser Ser Asp Ser

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

Ser His Pro Ala Pro Ala Ala Thr Thr Thr Leu Val Gly Glu Gln Thr

80

Pro Asp Asn Pro Gly Ser Asp Ala Ser Ala Ser Ala Leu Pro Ile Ala Val Arg

Gly Phe Val Pro

100

<210> 31

<211> 241

5 <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 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr 50 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 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

<210> 32

Lys

<211> 25

	<212> ADN	
	<213> Artificial; Cebador	
	<400> 32	
	caagtcctct acagggccca tactc	25
5	<210> 33	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial; Cebador	
	<400> 33	
10	ggccctgtag aggacttgta cagctc	26
	<210> 34	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial; Cebador	
15	<400> 34	
	cttgctgatc cacctcctca gg	22
	<210> 35	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial; Cebador	
	<400> 35	
	ccgtcggagg gggtggcatc c	21
	<210> 36	
	<211> 21	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial; Cebador	
	<400> 36	
	gtctgtgtcc ttggacgagt g	21
	<210> 37	
30	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial; Cebador	
	<400> 37	
	ccaagcggcc aaggatagat c	21
35	<210> 38	
	<211> 30	

<212> ADN

	<213> Artificial; Cebador	
	<400> 38	
	cgggatccat ggtgagcaag ggcgaggagc 30	
	<210> 39	
5	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Artificial; Cebador	
	<400> 39	
	cctaagcttc cttgtacagc tcgtccatgc cg 32	
10	<210> 40	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial; Cebador	
	<400> 40	
15	gcagatcttc agactccaag agagaa 26	
	<210> 41	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Artificial; Cebador	
20	<400> 41	
	gcagatctgg tggtggtggt tcctcagact ccaagagaga a	41
	<210> 42	
	<211> 34	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial; Cebador	
	<400> 42	
	cccaagcttg cggggatccc gggacaaatc ctcg	34
	<210> 43	
	<211> 15521	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial; virus marcador de SD01-08 GFP/ES4	
	<400> 43	

60	tactttggag	tgtgtttgtg	caacactttt	cctacataca	gggtatcccc	atgatgtgta
120	gtatccttct	agcccaacag	cccctgttct	caccccttgg	agccccgccc	gcgtgggtac
180	cccgagtatt	ggaaggacct	ccttgcagtg	cctgctgctc	gagtgcgccg	ccctcggggc
240	acgttctccc	catgtctggg	accctttaac	cgggatctcc	acctgcttta	tccggagagc
300	ttttqcacac	cooccaagtc	tttooaacoc	acccaaatat	caccccaact	aatacatata

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	aacagac cag	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	<u>a</u> ctctcggca	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	agctt g tgag	cctggtagtc	gtgcaacccc	agccaccagg	gagtggctcg	3660
acaaaatgtg	ggatagggtg	gacatgaaaa	cttggcgctg	cacttcacag	ttccaggccg	3720
gtcgcattct	tgcgtccc tc	aaatttcttc	c tgacatgat	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	ccccttttca	gccccatttt	4860
tcccaaaagt	tccagtcaac	ccagattgca	ggattgtggt	ggattcagat	acttttgtgg	4920
ctgcagtccg	ctgcggttac	tcgacagcac	aactggtcct	aggccggggc	aactttgcca	4980
agttgaatca	gaccccctt	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
atgggg tca c	cctgccattg	ttctcagctg	tggcacaact	ctccggtaga	gaggtaggga	5280
tttttatttt	agtgcttgtt	tccttgactg	ccttggccca	tcgcctggct	cttaaggcag	5340
acatgttagt	ggtcttttca	gctttttgtg	cttacgcctg	gcccatgagc	tcctggttaa	5400
tctgcttctt	tcctatactc	ttaaagtggg	ttacccttca	cccctcact	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
	tgctgctcat					5880
	gcacactttt					5940
ggcagggcgt	tgcccctgtg	gtcaaggttg	cgaaggggta	tcgcggtcgt	gcctactggc	6000

aaacatcaac	cggtgtcgaa	cccggcgtca	ttggggaagg	gttcgccttc	tgtttcacca	6060
		cccgtcatct				6120
		tctggtcttg				6180
		gacctttcca				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	gccaccccct	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	a g gtggttcc	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	сссаааасса	ggaccatcct	gggcaccaac	aactttattg	ccctggctca	8880
ccgatcggcg	ctcagtggtg	tcacccaggc	<u>a</u> ttcatgaag	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
cgcatatca c	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 caacct	gaga c <mark>ggcgtcg</mark> aa	atgctggaaa	ctcaaattag	acttcaggga	11700
cgtccgacta atggtc	tgga aaggagccac	cgcctatttc	cagttggaag	gacttacatg	11760
gtcagcgctg cctgact	tatg ccaggtttat	tcagcttccc	aaggacgccg	ttgtgtacat	11820
tgatccgtgt atagga	ccgg caacagccaa	ccgcaaggtc	gtgcgaacca	cagactggcg	11880
ggccgacctg gcagtg	acac cgtatgatta	cggtgcccag	aacattttga	caacagcctg	11940
gttcgaggac ctcggg	ccgc agtggaagat	tttggggttg	cagcccttca	ggcgggcatt	12000
tggctttgaa aatact	gagg attgggcaat	ccttgcacgc	cgtatgagtg	acggcaaaga	12060
ctacactgac tacaac	tggg attgtgttcg	agaacgccca	cacgccatct	acgggcgtgc	12120
tcgtgaccat acatate	catt ttgcccccgg	cacggaattg	caggtagagc	tgggtaaacc	12180
ccggctgccg cctgga	cgag agccgtaaac	ttggagtgat	gcaatggggt	cactgtggag	12240
taaaatcagc cagctg	ttcg tggatgcctt	cactgagttt	cttgtcagtg	tggttgatat	12300
tgtcattttc cttgcc	atac tgtttgggtt	caccgtcgca	ggatggttat	tggtctttct	12360
tctcagagtg gtttgc	tccg cgcttctccg	ttcgcgctct	gccattcact	ctcccgaact	12420
atcgaaggtc ctatgaa	aagc ttgttgccca	actgcaggcc	ggatgtccca	caatttgcat	12480
ttaagcaccc attggg	tata ctttggcaca	tgcgagtttc	ccacctgatt	gatgagatgg	12540
tctctcgccg cattta	ccag accatggaac	attcaggtca	agcggcctgg	aaatatgtgg	12600
tcggtgaggc cactcte	cacg aagctatcaa	agcttgatat	agttactcat	ttccaacatc	12660
tggccgcagt agaggc	ggat tcttgccgct	ttctcagctc	acgactcgtg	atgctaaaaa	12720
atcttgccgt tggcaa	tgtg agcctacagt	acaacaccac	gttggatcgc	gttgaactca	12780
ttttccccac gccagg	ta <mark>cg a</mark> ggcccaagt	tgaccgactt	cagacaatgg	ctcatcagtg	12840
tgcatgcttc catttt	ttcc tctgtggctt	catctgttac	cttgttcata	gtgctttggc	12900
tgcgaattcc agctcta	acgc tatgtttttg	gtttccattg	gcccacggca	acacatcatt	12960
cgagctgacc atcaatt	tata ccatatgcat	gccctgtctt	accagtcaag	cagctcgcca	13020
aaggctcgag cccggt	cgta acatgtggtg	cagaataggg	catgataggt	gtgaggagcg	13080
tgaccatgat gagttg	ttaa tgtccatccc	gtccgggtac	gacaacctca	aacttgaggg	13140
atattatgct tggctg	gctt ttttgtcctt	ttcctacgcg	gcccaattcc	atccggagct	13200
gttcgggata gggaat	gtgt cgcgcgtctt	cgtggacaag	cgacaccagt	ttatttgtgc	13260
cgagcatggt ggactca	aatt caaccttato	taccgagcac	aatatctccg	cattatatgc	13320
ggtatattat caccac	caaa tagacggggg	taattggttc	catttggaat	ggctgcggcc	13380
gcttttttcc tcctggf	ttgg tgctcaacat	atcatggttt	ctgaggcgtt	cgcctgtaag	13440
ccctgtttct cgacgca	atct atcagatatt	aagaccaaca	cgaccgcggc	tgccggtttc	13500
atggtccttc agaaca	tcaa ttgtt <mark>cccg</mark> g	cctcacgagg	cctcagcaac	gcaaggtcaa	13560

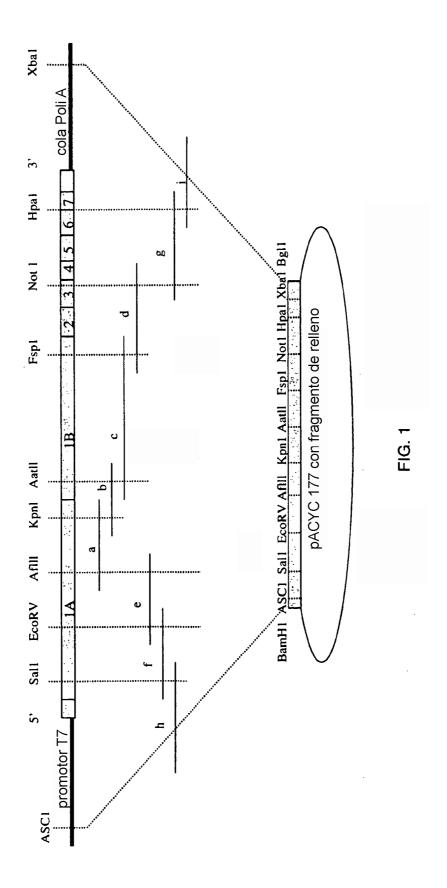
gttccctcca	gaaagtcgtc	ccaatgccgt	gaagccgtcg	gtgttcccca	atacatcacg	13620
ataacggcca	acgtgaccga	cgaatcatat	ttgtacaacg	cggacttgct	gatgctttct	13680
gcgtgccttt	tctacgcctc	ggaaatgagc	gagaaaggct	ttaaagttat	ctttgggaat	13740
gtctctggcg	ttgtttctgc	ttgtgtcaat	ttcacagatt	atgtggccca	tgtgacccaa	13800
catacccagc	agcatcatct	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	t agatg gaag	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
tgaatqqccq	cgattggcgt	gtggcctcta	agtcacctat	tcaattaggg	cgatcacato	15480
	ttaatcaggc					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.
- 15 3. Un método de la reivindicación 2, en el que la vacuna marcadora es la vacuna de la reivindicación 1.

5

10



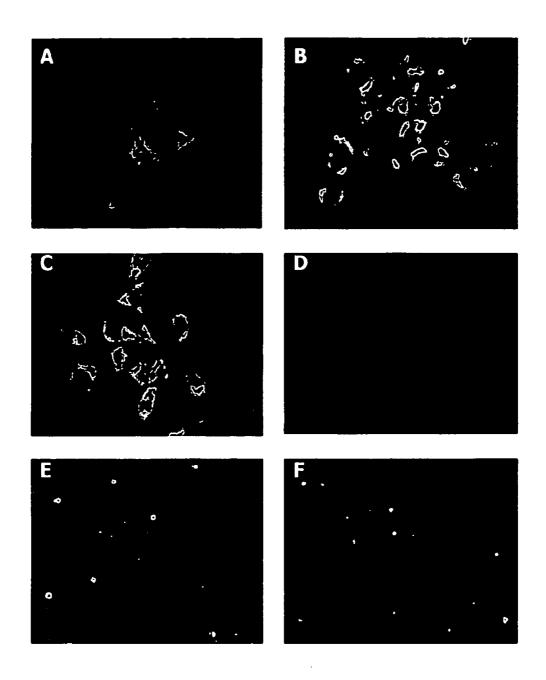


FIG. 2

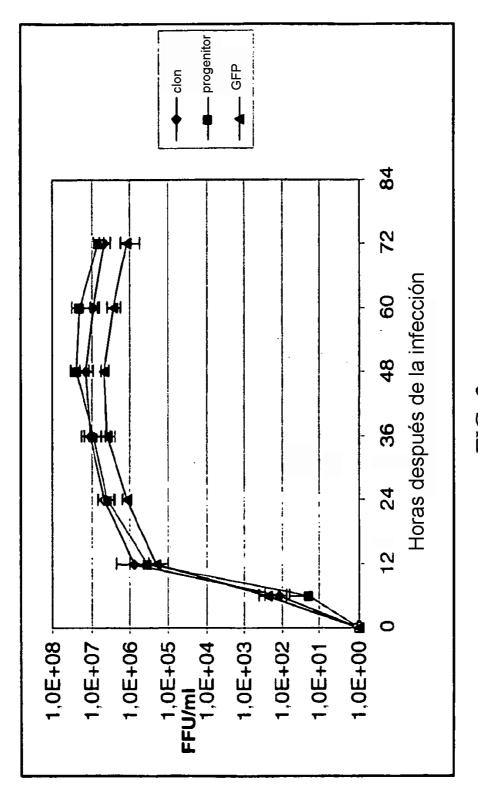


FIG. 3

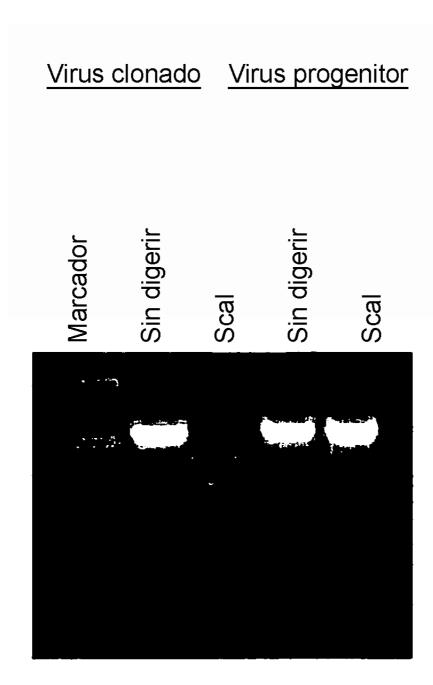


FIG. 4

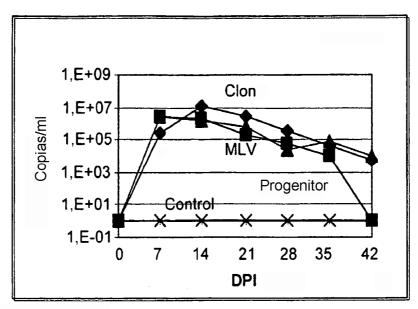


FIG. 5A

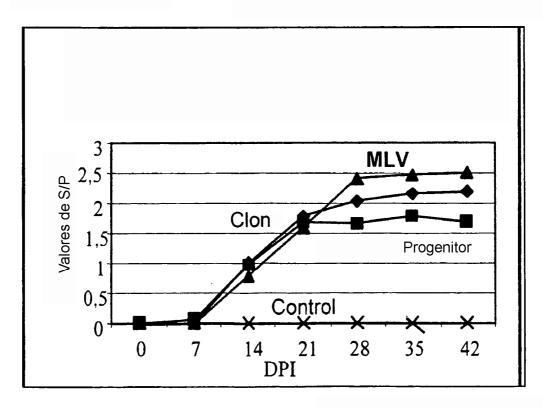


FIG. 5B

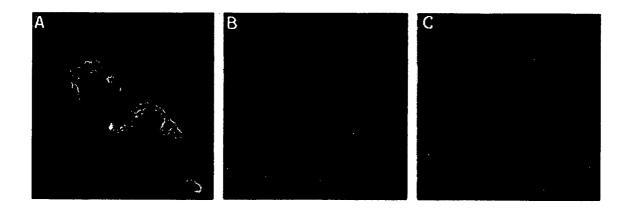
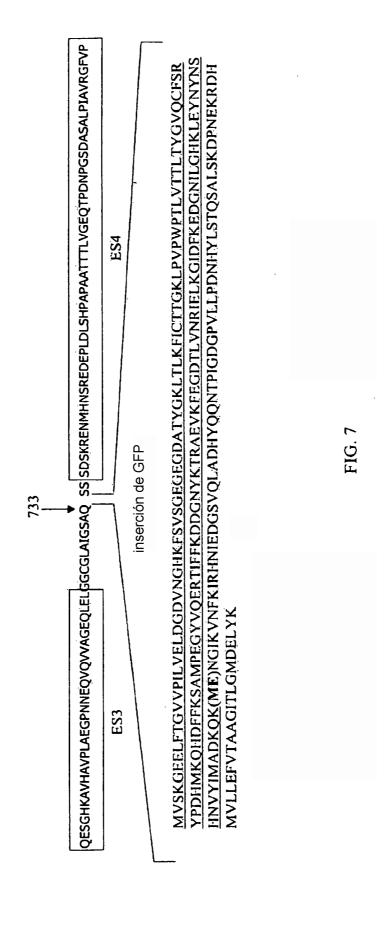
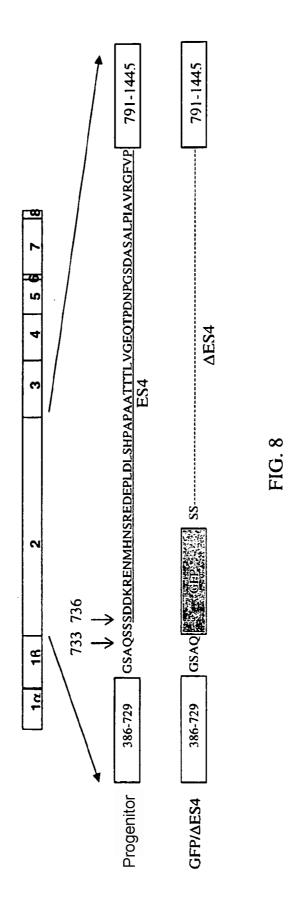


FIG. 6





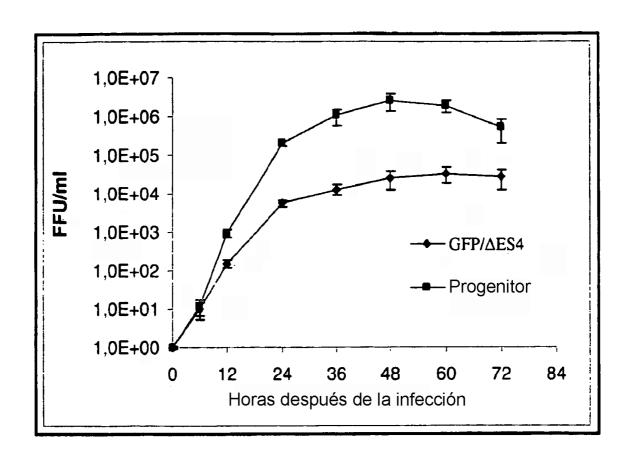


FIG. 9

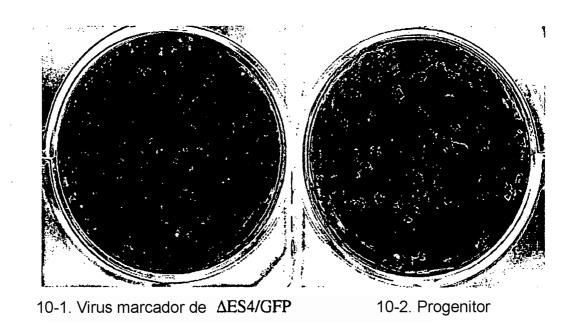
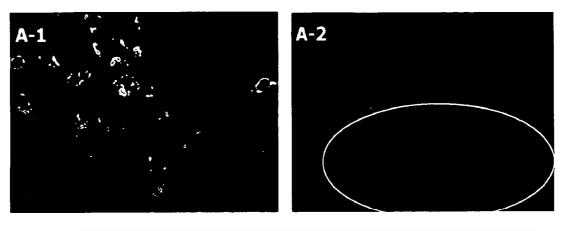


FIG. 10



Expresión de GFP

Tinción con mAb anti-N

FIG. 11

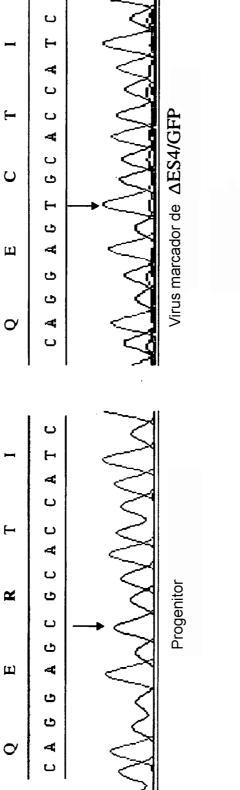


FIG. 12

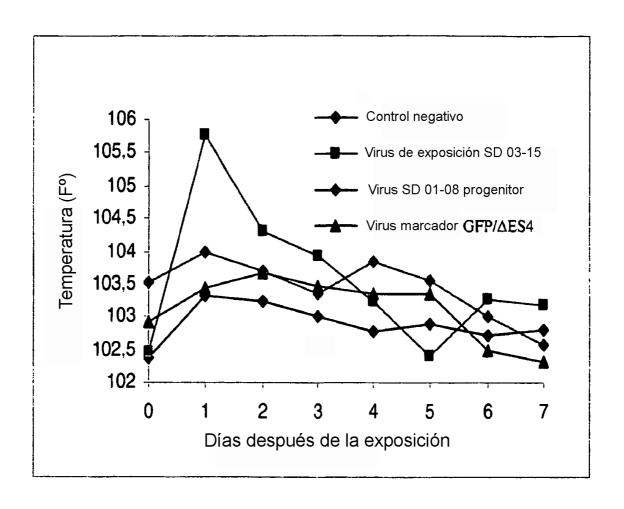


FIG. 13

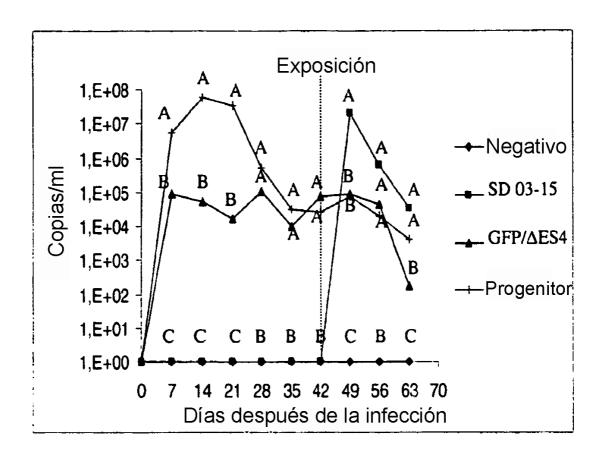


FIG. 14A

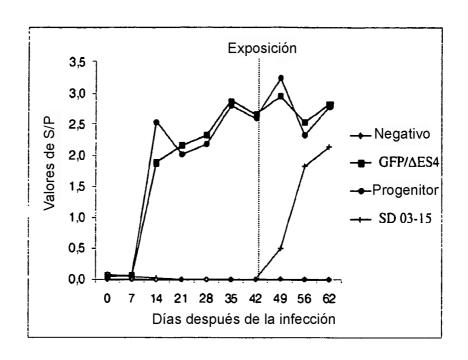


FIG. 14B

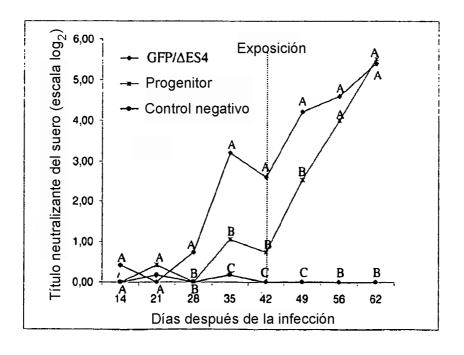


FIG. 14C

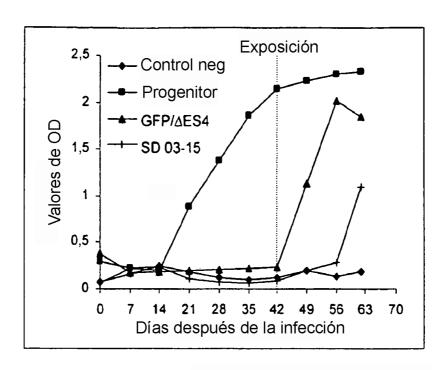


FIG. 15A. ELISA a base del epítopo de ES4

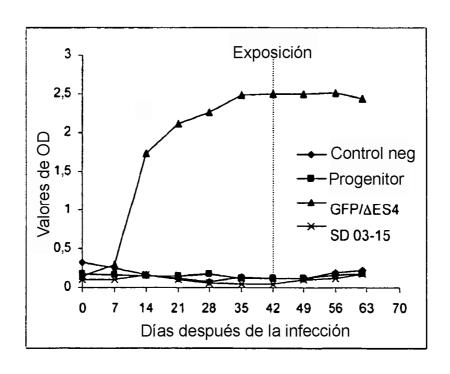


FIG. 15B. ELISA a base del antígeno de GFP

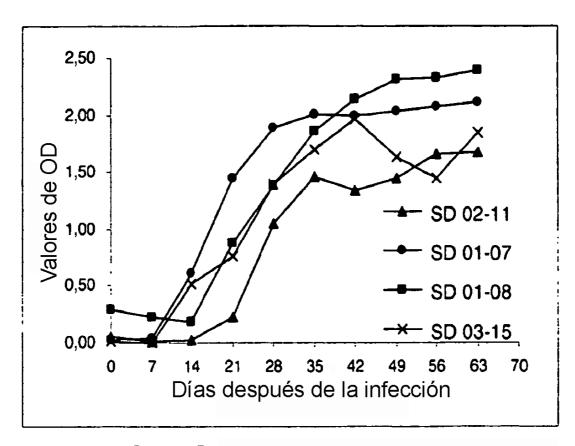


FIG. 15C. ELISA a base del epítopo de ES4