

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 359**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/34** (2006.01)

**C07K 14/01** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.1998 E 05014998 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 1741785**

54 Título: **Circovirus porcino, ácidos nucleicos, polipéptidos y vacunas**

30 Prioridad:

**03.10.1997 FR 9712382**

**22.01.1998 FR 9800873**

**20.03.1998 FR 9803707**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.12.2014**

73 Titular/es:

**MERIAL (33.3%)**

**29, Avenue Tony Garnier**

**69007 Lyon, FR;**

**THE QUEEN'S UNIVERSITY OF BELFAST (33.3%)**

**y**

**THE UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN (33.3%)**

72 Inventor/es:

**ALLAN, GORDON;**

**MEEHAN, BRIAN;**

**CLARK, EDWARD;**

**ELLIS, JOHN;**

**HAINES, DÉBORAH;**

**HASSARD, LORI;**

**HARDING, JOHN;**

**CHARREYRE, CATHERINE ELISABETH;**

**CHAPPUIS, GILLES EMILE y**

**MCNEILLY, FRANCIS**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

**ES 2 524 359 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).

**DESCRIPCION**

Circovirus porcino, ácidos nucleicos, polipéptidos y vacunas

**5 Sector de la técnica**

La presente invención se relaciona con nuevas cepas de circovirus porcino (PCV para *Porcine Circo Virus*) responsables del síndrome PMWS (*Porcine Multisystemic Wasting Syndrome* o *Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome*, también denominado síndrome del debilitamiento generalizado posterior al destete), así como con métodos que permiten su detección, métodos de vacunación y vacunas, así como con métodos de producción de estos reactivos y vacunas.

**Estado de la técnica**

15 El PCV ha sido el origen detectado como contaminante no citopatógeno en líneas celulares de riñones de cerdos PK/16. Este virus fue clasificado entre los Circoviridae con el virus de la anemia del polio (CAV para *Chicken Anemia Virus*) y el virus PBFDV (*Psittacine Beak and Feather Disease Virus*). Se trata de pequeños virus (de 15 a 24 nm) no envueltos cuya característica común es contener un genoma en forma de ADN de una sola hebra circular de 1,76 a 2,31 kb. Primeramente se pensó que este genoma codificaba un polipéptido de aproximadamente 30 kDa (Todd y col., Arch. Virol. 1991, 117: 129-135). Trabajos recientes han mostrado, sin embargo, una transcripción más compleja (Meehan B.M. y col., 1997, 78: 221-227). Además, no se conocen homologías significativas de secuencia nucleotídica ni de determinantes antigénicos comunes entre los tres tipos de circovirus conocidos.

25 El PCV resultante de células PK/16 es considerado como no patógeno. Se conoce la secuencia gracias a B.M. Meehan y col., J. Gen. Virol. 1997 (78), 221-227. No ha sido sino muy recientemente que los autores han pensado que cepas del PCV podían ser patógenas y estar asociadas al síndrome PMWS (Gupi PS. Nayar y col., Can. Vet. J., Vol. 38. 1997: 385-387, y Clark E.G., Proc. Am. Assoc. Swine Prac. 1997: 499-501). Nayar y col., detectaron ADN de PCV en cerdos que presentaban el síndrome PMWS por técnicas de PCR. Sin embargo, hasta ahora no se ha aislado ni purificado ninguna cepa silvestre del PCV.

30 El síndrome PMWS detectado en Canadá, en los Estados Unidos y en Francia, se caracteriza desde el punto de vista químico por una pérdida progresiva de peso y por manifestaciones tales como taquipnea, disnea e ictericia. Desde el punto de vista patológico, se traduce por infiltraciones linfocitarias o granulomatosas, linfadenopatías y, más raramente, por hepatitis y nefritis linfocitarias o granulomatosas (Clark E.G., Proc. Am. Assoc. Swine Prac, 1997: 499-501; La Semaine Veterinaire N° 26, suplemento a la Semaine Veterinaire 1996 (834); La Semaine Veterinaire, 1997 (857): 54; Gupi, PS., Nayar y col., Can. Vet. J., Vol. 38, 1997: 386-387).

40 La solicitante ha conseguido aislar cinco nuevas cepas de PCV a partir de muestras pulmonares o ganglionares procedentes de granjas situadas en Canadá, en los Estados Unidos (California) y en Francia (Bretaña), en lo sucesivo denominados circovirus según la invención. Estos virus se han puesto de manifiesto en lesiones de cerdos afectados por el síndrome PMWS, pero no en cerdos sanos.

45 La solicitante ha secuenciado además el genoma de cuatro de estas cepas, a saber, las cepas procedentes del Canadá y de los Estados Unidos, así como dos cepas francesas. Las cepas presentan entre sí una fuerte homología a nivel nucleotídico, que sobrepasa el 96%, y mucho más débil con la cepa PK/16, de aproximadamente el 76%. Las nuevas cepas pueden considerarse por tanto representativas de un nuevo tipo de circovirus porcino, denominado en el presente documento tipo II, estando representado el tipo I por la PK/15.

**Objeto de la invención**

50 La presente invención se define por las reivindicaciones y describe el circovirus porcino del grupo II, tal como se ha definido anteriormente, aislado o en forma de preparación purificada.

55 También se describe cualquier circovirus porcino susceptible de ser aislado de una muestra fisiológica o de una muestra tisular, especialmente de lesiones, de un cerdo enfermo que presente el síndrome PMWS, especialmente siguiendo el método descrito en los ejemplos, en particular con el circovirus de tipo II.

60 La presente invención describe más particularmente preparaciones purificadas de cinco cepas, que fueron depositadas en la ECACC (European Collection of Cell Cultures, Centre for Applied Microbiology & Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Reino Unido) el jueves 2 de octubre de 1997:

-N° de acceso V97100219 (denominado en el presente documento Imp.1008PCV),

-N° de acceso V97100218 (denominado en el presente documento Imp.1010PCV),

65 -N° de acceso V97100217 (denominado en el presente documento Imp.999PCV),

y el viernes 16 de enero de 1998:

-N° de acceso V98 011608 (denominado en el presente documento Imp. 1011-48285),

-N° de acceso V98 011609 (denominado en el presente documento Imp. 1011-48121).

La invención pretende considerar los circovirus porcinos aislados de un cerdo enfermo y/o los circovirus que tengan un parentesco serológico significativo con las cepas de la invención y/o los circovirus que tengan una hibridación cruzada con las cepas de la invención en condiciones estrictas tales que no haya hibridación con la cepa PCV PK/15.

Las cepas víricas aisladas de una muestra fisiológica o de una muestra tisular, especialmente de una lesión, de un cerdo que presente el síndrome PMWS pueden propagarse ventajosamente en líneas celulares tales como especialmente líneas celulares de riñón de cerdo, en particular células PK/15 indemnes a la contaminación (en particular para PCV, así como para pestivirus, adenovirus porcino y parvovirus porcino) con vistas a su multiplicación o específicamente para la producción de antígeno, entero (por ejemplo, virus) y/o subunidades (por ejemplo, polipéptidos).

De un modo muy notable e inesperado, estos aislados han mostrado ser muy productivos en cultivo sobre células PK/15, lo que presenta ventajas innegables para la producción de virus o de antígeno, en particular para la producción de vacuna inactivada.

También se describen preparaciones de circovirus aislados después de hacer pases sobre células, especialmente líneas celulares, por ejemplo células PK, cultivadas *in vitro* estando infectadas por al menos uno de los circovirus descritos en el presente documento, o de cualquier circovirus susceptible de ser aislado de una muestra fisiológica o de una muestra tisular, especialmente de lesiones, de un cerdo que presente el síndrome PMWS. También se describen sobrenadantes o extractos de cultivo, eventualmente purificados por técnicas estándar, y de forma general cualquier preparación antigénica obtenida a partir de los cultivos *in vitro*.

También se describen los principios activos inmunogénicos y las vacunas que contienen al menos un antígeno tal como se define anteriormente.

Puede tratarse de principios activos inmunogénicos basados en virus enteros vivos atenuados, o vacunas preparadas con estos principios activos, efectuándose la atenuación de acuerdo con los métodos habituales, por ejemplo, realizando pases sobre células, preferentemente pases sobre células de cerdo, particularmente líneas, tales como las células PK/15 (por ejemplo de 50 a 150, particularmente del orden de 100 pases). Estas vacunas comprenden en general un vehículo o un diluyente aceptable desde el punto de vista veterinario, eventualmente un adyuvante aceptable desde el punto de vista veterinario así como eventualmente un estabilizador de liofilización.

Estas preparaciones antigénicas y vacunas comprenderán preferentemente de  $10^3$  a  $10^6$  DICT50.

También puede tratarse de principios activos inmunogénicos o de vacunas basadas en antígenos de circovirus de acuerdo con la invención, en estado inactivado. Las vacunas comprenden adicionalmente un vehículo o un diluyente aceptable desde el punto de vista veterinario eventualmente con un adyuvante adicional aceptable desde el punto de vista veterinario.

Los circovirus, con las fracciones que puedan estar presentes, son inactivados según técnicas conocidas por el experto en la materia. Se efectuara la inactivación preferiblemente por vía química, por ejemplo, por exposición del antígeno a un agente químico tal como formaldehído (formol), paraformaldehído, y  $\beta$ -propiolactona o etilenimina o sus derivados. En el presente documento el método de inactivación preferido será la exposición a un agente químico y, en particular, a etilenimina o a la  $\beta$ -propiolactona.

Preferentemente, las vacunas inactivadas divulgadas serán adyuvantes, presentándose ventajosamente en forma de emulsiones, por ejemplo, de agua en aceite o de aceite en agua, según las técnicas bien conocidas por el experto en la materia. El carácter adyuvante podrá también provenir de la incorporación del principio activo de un compuesto adyuvante habitual.

Entre los adyuvantes que pueden utilizarse, se pueden citar como ejemplo el hidróxido de aluminio, las saponinas (por ejemplo, saponina Quillaja o Quil A, véase Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, editado por Michael F. Powel et Mark J. Newman, Plenum Press, Nueva-York y Londres, p 210), la Avridina® (Vaccine Design p 148), el DDA (bromuro de dimetildioctadecilamonio, Vaccine Design p 167), el polifosfaceno (Vaccine Design p 204), o incluso emulsiones de aceite en agua a base de aceite mineral, escualano (por ejemplo emulsión SPT, Vaccine Design p 147), escualeno (por ejemplo MF59, Vaccine Design p 183), o de agua en aceite a base de aceite metabolizable (preferentemente de acuerdo con el documento WO-A-94 20071) así como las emulsiones

descritas en el documento US-A-5 422 109. También pueden seleccionarse asociaciones de adyuvantes, por ejemplo Avridina® o DDA asociado a una emulsión.

Estas vacunas comprenderán preferentemente de  $10^6$  a  $10^8$  DICT50.

5 Los adyuvantes de vacunas vivas podrán seleccionarse entre los proporcionados para la vacuna inactivada. Se preferirán las emulsiones. A las indicadas para la vacuna inactiva, pueden añadirse las descritas en el documento WO-A-9416681.

10 Como estabilizante de liofilización, se puede citar como ejemplo el SPGA (Bovarnik *et al.*, J. Bacteriology 59, 509, 950), hidratos de carbono, tales como, sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, dextrano o glucosa, proteínas tales como albúmina o caseína, derivados de estos compuestos o tampones tales como tampones de fosfatos de metales alcalinos.

15 La solicitante ha obtenido además el genoma de cuatro de los aislados, identificados como SEC ID N°: 1 a 4 y eventualmente 6. fragmento de ADN que contiene.

20 También se describe un fragmento de ADN que contiene todo o parte de una de estas secuencias. Es obvio que la invención ampara automáticamente las secuencias equivalentes, es decir, las secuencias que no cambian la funcionalidad ni la especificidad de cepa de la secuencia descrita ni de los polipéptidos codificados por esta secuencia. Se entiende que se incluirán las secuencias que difieran por degeneración del código.

25 También se incluyen las secuencias equivalentes en el sentido de que sean capaces de hibridarse con la secuencia anterior en condiciones muy estrictas y/o de que tengan una gran homología con las cepas de la invención y de que pertenezcan al grupo II antes definido.

Estas secuencias y sus fragmentos se utilizan para la expresión de polipéptidos *in vitro* o *in vivo* usando vectores apropiados.

30 En particular, los marcos abiertos de lectura, que forman fragmentos de ADN de acuerdo con la invención, utilizables a este efecto, se han identificado en la secuencia genómica de circovirus de tipo II. Se divulga cualquier polipéptido que contiene al menos uno de estos marcos abiertos de lectura (secuencia de aminoácidos correspondiente). La invención se relaciona con una proteína formada esencialmente por los MAL4, MAL7, MAL10 o MAL13.

35 Para la expresión de subunidades *in vitro*, como medio de expresión, se recurrirá preferentemente a *E. coli* o a un baculovirus (documento US-A-4 745 051). La secuencia, o secuencias, codificantes o sus fragmentos se integran en el genoma del baculovirus (por ejemplo, el baculovirus del Virus de la Polihedrosis Nuclear de Autographa californica AcNPV) y este último se propaga después en células de insecto, por ejemplo, *Sf9 de Spodoptera frugiperda* (depósito ATCC CRL1711). Las subunidades también pueden producirse en células eucariotas tales como las de levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) o en células de mamífero (por ejemplo CHO, BHK).

40 La invención también tiene por objeto los polipéptidos que se producirán *in vitro* por medios de expresión, eventualmente purificados después, de acuerdo con las técnicas clásicas. La invención también tiene por objeto las vacunas subunitarias que comprenden al menos un polipéptido, tal como el que se obtiene de esta manera, o un fragmento, en un vehículo o diluyente aceptable desde el punto de vista veterinario y eventualmente un adyuvante aceptable desde el punto de vista veterinario.

45 Para la expresión *in vivo*, en vista de la realización de vacunas vivas recombinantes, la secuencia o secuencias, codificantes o sus fragmentos se insertan en un vector de expresión apropiado en condiciones que permitan la expresión del polipéptido o polipéptidos. Como vectores apropiados, pueden utilizarse virus vivos, preferentemente capaces de multiplicarse en el cerdo, no patógenos para el cerdo (naturalmente no patógenos o proporcionados como tal), de acuerdo con las técnicas bien conocidas por el experto en la materia. También podrán utilizarse herpesvirus de cerdo, tales como los virus de la enfermedad de Aujeszky, el adenovirus porcino, poxvirus, particularmente el virus de la vacuna, de la viruela aviar, de la viruela del canario y de la viruela porcina. Como vectores también pueden utilizarse ADN plasmídicos (documentos WO-A-90 11092, WO-A-93 19813, WO-A-94 21797, WO-A-95 20660).

50 Por lo tanto la invención también tiene por objeto los vectores y las vacunas vivas recombinantes o plasmídicas (vacunas polinucleotídicas o de ADN) así realizadas, comprendiendo las vacunas adicionalmente un vehículo o diluyente aceptable desde el punto de vista veterinario.

Las vacunas de acuerdo con la invención (subunitarias, vivas recombinantes, plasmídicas) podrán comprender uno o más principios activos (antígenos) de uno o de varios (2 o 3) de los circovirus de acuerdo con la invención.

65 Para cada uno de los tipos de vacunas descritos anteriormente, la vacunación contra el circovirus porcino se describe como que también puede asociarse con una vacunación contra otros patógenos del cerdo, en particular los

que pueden asociarse con el síndrome PMWS. Las vacunas divulgadas, particularmente inactivadas, podrán comprender por tanto otra valencia correspondiente a otro patógeno del cerdo. Entre estos otros patógenos del cerdo, se puede citar preferentemente el SRRP (Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino) (el experto en la materia podrá hacer referencia a los documentos WO-A-93/07898, WO-A-94/18311, FR-A-2 709 966 ; C. Chareyre *et al.*, Proceedings of the 15th IPVS Congress Birmingham, Inglaterra, 5-9 julio de 1998, página 139; incorporadas por referencia) y/o al *Mycoplasma hyopneumoniae* (el experto en la materia podrá hacer referencia a los documentos EP-A-597 852, EP-A-550 477, EP-A-571 648, O. Martinon *et al.*, p 157, p 284, p 285 y G. Reynaud *et al.*, p 150 del Proceedings del 15º IPVS Congress anterior; incorporados por referencia). Entre las otras valencias interesantes, se pueden citar además *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *E. coli*, y Rhinite atrophique porcina o además la enfermedad de Aujeszzk, la peste porcina clásica (cólera porcino), gripe porcina.

También se divulga un método que permite inducir una respuesta inmunitaria en el cerdo con respecto a los circovirus descritos. En particular tiene por objeto un método de vacunación eficaz en el cerdo.

Este método proporciona al cerdo la administración, en una o varias veces, de una vacuna citada anteriormente. Y también es posible combinar muchos tipos de vacunas anteriores en un mismo protocolo de vacunación.

Este método no solo proporciona la administración a cerdos adultos, sino también a cerdos jóvenes o a hembras gestantes. La vacunación de estas últimas permite conferir una inmunidad pasiva a los recién nacidos (anticuerpos maternos).

También se describe la posibilidad de diagnosticar en el cerdo la presencia de circovirus de acuerdo con la invención. Se describen ensayos de diagnóstico y métodos relacionados con estos que aplican los reactivos que van a describirse a continuación.

El conocimiento de secuencias de diferentes circovirus permite definir secuencias comunes que permiten producir reactivos adecuados para reconocer el conjunto de los circovirus porcinos conocidos.

El experto en la materia también podrá seleccionar fragmentos de las secuencias correspondientes a regiones que presentan poca o ninguna homología con la secuencia del circovirus PK/15 correspondiente para poder efectuar un diagnóstico específico.

Las alineaciones de secuencias permiten al experto en la materia seleccionar un reactivo conforme a sus deseos.

Un primer reactivo consiste en las secuencias de ADN divulgadas en el presente documento y sus fragmentos, que se utilizarán particularmente como sondas o cebadores en las técnicas de hibridación o de PCR ("Reacción en Cadena de la Polimersas") bien conocidas.

Un segundo reactivo consiste en los polipéptidos codificados por esas secuencias a partir de virus o expresados usando un vector (ver anteriormente), o sintetizados por vía química según las técnicas clásicas de síntesis peptídica.

Un tercer y cuarto reactivo consiste en anticuerpos policlonales y monoclonales respectivamente que podrán producirse de acuerdo con las técnicas habituales a partir de virus, polipéptidos o fragmentos, extractos o codificados por las secuencias de ADN.

Estos segundo, tercero y cuarto reactivos podrán utilizarse en un método diagnóstico en el que en una muestra de fluido fisiológico (sangre, plasma, suero, etc.) o extracción de tejido (ganglios, hígado, pulmones, riñones, etc.) que proviene de un cerdo a ensayar, se busca la presencia de un antígeno específico de un circovirus de acuerdo con la invención, buscando detectar bien el antígeno en sí mismo o bien anticuerpos dirigidos contra ese antígeno.

Los antígenos y anticuerpos podrán utilizarse en cualquiera de las técnicas de diagnóstico de laboratorio conocidas.

Sin embargo, se preferirá aprovecharlas en técnicas que el veterinario, el ganadero o el propietario del animal puedan realizar directamente sobre el terreno. El experto en la materia dispone del conjunto de técnicas de laboratorio y sobre el terreno y por tanto puede adaptarse perfectamente para la utilización de este antígeno y/o de anticuerpos como reactivo (o reactivos) de diagnóstico.

Las técnicas de diagnóstico que se utilizarán preferentemente son la Transferencia de Western, la inmunofluorescencia, el ELISA y la inmunocromatografía.

En lo que concierne a la realización de métodos por inmunocromatografía, el especialista podrá referirse particularmente a Robert F. Zurk *et al.*, Clin. Chem. 31/7, 1144-1150 (1985) así como a las patentes o solicitudes de patente WO-A-88/08 534, WO-A-91/12528, EP-A-291 176, EP-A-299 428, EP-A-291 194, EP-A-284 232, US-A-5 120 643, US-A-5 030 558, US-A-5 266 497, US-A-4 740 468, US-A-5 266 497, US-A-4 855 240, US-A-5 451 504, US-A-5 141 850, US-A-5 232 835 y US-A-5 238 652.

Además, se busca detectar preferentemente los anticuerpos específicos en la muestra por ensayo directo, por competición o por desplazamiento. Para ello, se utiliza el antígeno en sí mismo como reactivo de diagnóstico o un fragmento de este antígeno, conservando el reconocimiento de los anticuerpos. El marcaje puede ser ventajosamente un marcaje con peroxidasa o un marcaje particular, preferentemente con oro coloidal.

También puede buscarse detectar el antígeno en sí mismo en la muestra usando un anticuerpo de este antígeno marcado específicamente. El marcaje es ventajosamente como se describe anteriormente en este documento.

Por anticuerpo específico del antígeno utilizable particularmente en competición o desplazamiento o para la detección del antígeno en sí mismo, se entiende un anticuerpo monoclonal y policlonal específico del antígeno, fragmentos de estos anticuerpos, preferentemente fragmentos Fab o F(ab)'<sub>2</sub>.

También se describe la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales, específicos del antígeno de acuerdo con la invención, pudiendo después utilizarse estos anticuerpos particularmente como reactivos de diagnóstico para la detección del antígeno en una muestra de fluido fisiológico o en una extracción de tejido, o incluso para la detección de anticuerpos presentes en dicha muestra o extracción. También se divulgan los fragmentos inmunológicamente funcionales de estos anticuerpos, en particular fragmentos F(ab) y F(ab)'<sub>2</sub>.

Los anticuerpos podrán prepararse por las técnicas habituales. Particularmente se puede hacer referencia a Antidobies, A Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, USA o a J.W. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Inc., cuyo contenidos se incorporan en este documento por referencia.

También podrá procederse particularmente, como ya se sabe de hecho, a la fusión de células esplénicas de ratón inmunizadas por el antígeno o por al menos uno de sus fragmentos, con células mielomatosas adecuadas.

También se describe una preparación, preferentemente pura o parcialmente purificada, o incluso bruta de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos del antígeno, en particular anticuerpos de ratón o de conejo.

También es posible determinar epítomos de interés particularmente en base a las secuencias de ADN descritas en el presente documento, bien sean epítomos de interés desde el punto de vista de la vacuna o epítomos de interés en cuanto al diagnóstico. A partir de la secuencia de ADN del genoma del circovirus de acuerdo con la invención, el experto en la materia puede determinar epítomos de acuerdo con los métodos conocidos, por ejemplo, programas informáticos apropiados o PEPSCAN. Los epítomos son regiones de proteínas inmunodominantes y son de este modo regiones expuestas en la superficie de proteínas. Pueden por tanto reconocerse por anticuerpos y también emplearse particularmente en el campo del diagnóstico bien para la preparación de anticuerpos con fines de diagnóstico o bien para la realización de péptidos correspondientes utilizables como reactivos de diagnóstico.

Un epítope es un péptido que tiene como mínimo de 8 a 9 aminoácidos. Se preferirá en general un mínimo de 13 a 25 aminoácidos.

El experto en la materia puede por tanto encontrar, utilizando una o varias de estas técnicas así como las otras técnicas disponibles, epítomos para aplicar los péptidos o anticuerpos definidos con fines de diagnóstico.

También se describe un kit de diagnóstico que comprende este antígeno y/o anticuerpos policlonales o monoclonales específicos de este antígeno. Se trata en particular de kits de diagnóstico correspondientes a las técnicas de diagnóstico descritas anteriormente.

## Descripción de las figuras

Ahora se describen ejemplos de realización no limitativos, tomados en referencia al dibujo, en el que:

Figura 1: secuencia de ADN del genoma de la cepa Imp 1011-48121.

Figura 2: secuencia de ADN del genoma de la cepa Imp 1011-48285.

Figura 3: secuencia de ADN del genoma de la cepa Imp 999.

Figura 4: secuencia de ADN del genoma de la cepa Imp 1010.

Figura 5: alineación de las 4 secuencias según las figuras 1 a 4 con la secuencia de la cepa PCV PK/15.

Figura 6: secuencia de ADN del genoma de la cepa Imp 999 tal como se definió en el primer depósito en Francia del 3 de octubre de 1997.

Figura 7: Alineaciones de la secuencia de la figura 6 con la secuencia de la cepa PK/15.

*Lista de secuencias SEC ID*

- 5 SEC ID N°: 1 secuencia de ADN del genoma de la cepa Imp 1011 -48121
- SEC ID N°: 2 secuencia de ADN del genoma de la cepa Imp 1011 -48285
- SEC ID N°: 3 secuencia de ADN del genoma de la cepa Imp 999
- 10 SEC ID N°: 4 secuencia de ADN del genoma de la cepa Imp 1010.
- SEC ID N°: 5 secuencia de ADN del genoma de la cepa Imp PK/15
- 15 SEC ID N°: 6 secuencia de ADN del genoma de la cepa Imp 999 tal como se define en el primer depósito en Francia del 3 de octubre de 1997.

**Descripción detallada de la invención**

20 **Ejemplos**

Ejemplo 1: *Cultivo y aislamiento de las cepas de circovirus porcinos*

25 Se recogieron muestras de tejidos en Francia, en Canadá y en los EE.UU. a partir de pulmones y de ganglios linfáticos de lechones. Estos lechones presentaban signos clínicos típicos del síndrome de debilitamiento generalizado posterior al destete. Para facilitar el aislamiento de los virus, se congelaron las muestras de tejidos a -70°C inmediatamente después de la autopsia.

30 Para el aislamiento vírico, se prepararon suspensiones que contenían aproximadamente un 16% de muestra de tejido en un medio mínimo que contenía sales de Earl (EMEM, BioWhittaker UK Ltd., Wokingham, RU), penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) (medio MEM-SA), por trituración de los tejidos con arena estéril por medio de un mortero y de una mano de mortero estériles. Se recogió entonces esta preparación triturada en MEM-SA y se centrifugó después a 3.000 g durante 30 minutos a +4°C para recoger el sobrenadante.

35 Previamente a la siembra de los cultivos de células, se añadió un volumen de 100 µL de cloroformo a 2 ml de cada sobrenadante y se mezcló de forma continua durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, esta mezcla se transfirió a un tubo de microcentrífuga, se centrifugó a 3.000 g durante 10 minutos y se recogió después el sobrenadante. Después este sobrenadante se utilizó como inóculo para los experimentos de aislamiento vírico.

40 Todos los estudios de aislamiento vírico se realizaron en cultivos de células PK/15, que se sabía que no estaban contaminadas por el circovirus porcino (PCV), los pestivirus, los adenovirus porcinos y el parvovirus porcino (Alian G. y col., Pathogenesis of porcine circovirus experimental infections of colostrum-deprived piglets and examination of pig foetal material, Vet. Microbiol., 1995, 44, 49-64).

45 El aislamiento de los circovirus porcinos se realizó según la siguiente técnica:

50 Se disociaron monocapas de células PK/15 por tripsinización (con una mezcla de tripsina-verseno) a partir de cultivos confluentes y se recogieron en medio MEM-SA que contenía un 15% de suero fetal de ternera no contaminado por pestivirus (= medio MEM-G) a una concentración final de aproximadamente 400.000 células por ml. Después se mezclaron fracciones alícuotas de 10 ml de esta suspensión celular con fracciones alícuotas de 2 ml de los inóculos antes descritos y las mezclas finales se dividieron en alícuotas en volúmenes de 6 ml en dos frascos Falcon de 25 cm<sup>2</sup>. Después, estos cultivos se incubaron a +37°C durante 18 horas en una atmósfera que contenía un 10% de CO<sub>2</sub>.

55 Tras la incubación, el medio de cultivo de las monocapas semiconfluentes se trató con 300 mM de D-glucosamina (Cat. # G48176, Sigma-Aldrich Company Limited, Poole, UK) (Tischr I. y col., Arch. Virol., 1987, 96, 39-57) y se prosiguió después con la incubación durante un período adicional de 48-72 horas a +37°C. Después de esta última incubación, uno de los dos Falcon de cada inóculo se sometió a 3 ciclos sucesivos de congelación/descongelación. Se trataron las células PK/15 del Falcon restante con una solución de tripsina-verseno, se resuspendieron en 20 ml de medio MEM-G y se sembraron después en Falcon de 75 cm<sup>2</sup> a una concentración de 400.000 células/ml. Después, los frascos recién sembrados se "sobreinfectaron" por adición de 5 ml de lisado correspondiente obtenido después de los ciclos de congelación/descongelación.

65 Ejemplo 2: *Preparación de las muestras de cultivo celular para la detección de los circovirus porcinos por inmunofluorescencia o por hibridación in situ*

Se retiró un volumen de 5 ml de la suspensión "sobreinfectada" y se sembró en una placa de Petri de 55 mm de diámetro que contenía una laminilla de vidrio estéril y desengrasada. Los cultivos se incubaron en frascos y sobre laminillas de vidrio a +37°C y se trataron con glucosamina como se ha descrito en el ejemplo 1. Se recogieron los cultivos sobre laminillas de vidrio 24 a 48 horas después del tratamiento con glucosamina y se fijaron, bien con acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente, bien con un 10% de formaldehído tamponado durante 4 horas. Después de esta fijación, se guardaron todas las laminillas de vidrio a -70°C sobre gel de sílice antes de su utilización para los estudios de hibridación *in situ* y los estudios de marcaje inmunocitoquímico.

Ejemplo 3: *Técnicas de detección de secuencias de PCV por hibridación in situ*

Se realizó la hibridación *in situ* sobre los tejidos extraídos de los cerdos enfermos y fijados con formaldehído y también sobre las preparaciones de cultivos de células inoculadas para el aislamiento vírico (véase el ejemplo 2) y fijadas sobre laminillas de vidrio.

Se utilizaron sondas genómicas completas correspondientes al circovirus porcino PK/15 (PCV) y al virus de la anemia infecciosa del pollo (*chicken anemia virus* = CAV). Se utilizó el plásmido pPCVI, que contenía la forma replicativa del genoma PCV clonada en forma de inserción única de 1,7 kilopares de bases (kpb) (Meehan B. y col., Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses, J. Gen. Virol., 1997, 78, 221-227) como fuente de ADN vírico específico para PCV. Se utilizó un análogo plasmídico, pCAAI, que contenía la forma replicativa de 2,3 kpb del circovirus aviar CAV como control negativo. Las existencias de gliceroles respectivos de estos dos plásmidos se utilizaron para la producción y la purificación de los plásmidos según la técnica de lisis alcalina (Sambrook J. y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989) con el fin de que sirvieran después como matrices para la preparación de las sondas. Se produjeron las sondas de circovirus representativas de los genomas completos del PCV y del CAV a partir de los plásmidos purificados antes descritos (1 µg para cada sonda) y de cebadores hexanucleotídicos aleatorios utilizando un kit comercial de marcaje no radiactivo (kit de marcado de ADN con DIG, "DIG DNA labeling kit", Boehringer Mannheim, Lewes, RU) según las recomendaciones del proveedor.

Las sondas marcadas con digoxigenina se recogieron en un volumen de 50-100 µl de agua estéril antes de su utilización para la hibridación *in situ*.

Se prepararon las muestras de tejidos de cerdos enfermos, incluidas en parafina y fijadas con formaldehído, así como las preparaciones de cultivos de células infectadas, fijadas con formaldehído, para la detección de los ácidos nucleicos de PCV según la técnica siguiente:

Se cortaron secciones de 5 µm de espesor a partir de los bloques de tejidos incluidos en parafina, se desparafinaron y después se rehidrataron en soluciones sucesivas de alcohol a concentración decreciente. Las secciones de tejidos y los cultivos de células fijadas con formaldehído se incubaron, durante 16 minutos y 6 minutos, respectivamente, a +37°C en una solución de proteinasa K al 0,5% en tampón Tris-HCl 0,05M, EDTA 6 mM (pH 7,6). Después, las láminas se pusieron en una solución de glicina al 1 % en agua destilada esterilizada con autoclave, durante 30 segundos, se lavaron dos veces con un tampón PBS (*Phosphate Buffer Saline*) 0,01M (pH 7,2) y se lavaron finalmente durante 6 minutos en agua destilada estéril. Se secaron finalmente al aire libre y se pusieron en contacto con las sondas.

Cada preparación de tejido/sonda se recubrió con una laminilla limpia y desengrasada, después se puso en un horno a +90°C durante 10 minutos, y a continuación se puso en contacto con un bloque de hielo durante 1 minuto y se incubó finalmente durante 18 horas a +37°C. Después, las preparaciones se sumergieron brevemente en un tampón salino de citrato de sodio (SSC) 2X (pH 7,0) para eliminar las laminillas protectoras, después se lavaron 2 veces durante 5 minutos en tampón SSC 2X y finalmente se lavaron 2 veces durante 5 minutos en tampón PBS.

Después de estos lavados, las preparaciones se sumergieron en una solución de ácido maleico 0,1M, NaCl 0,15M (pH 7,5) (tampón maleico) durante 10 minutos y después se incubaron en una solución de un 1% de reactivo bloqueante (Cat. # 1096176, Boehringer Mannheim UK, Lewis, East Sussex, RU) en tampón maleico durante 20 minutos a +37°C.

Las preparaciones se incubaron después con una solución al 1/250 de un anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina (Boehringer Mannheim), diluido en tampón bloqueante, durante 1 hora a +37°C, se lavaron en PBS y se incubaron finalmente con un anticuerpo biotinilado anti-inmunoglobulina de ratón durante 30 minutos a +37°C. Se lavaron las preparaciones en PBS y se bloqueó la actividad peroxidasa endógena mediante un tratamiento con una solución de peróxido de hidrógeno al 0,5% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las preparaciones de nuevo en PBS y se trataron con un substrato 3-amino-9-dietilcarbazol (AEC) (Cambridge Bioscience, Cambridge, UK) preparado extemporáneamente.

Después de un último lavado con agua del grifo, las preparaciones se tiñeron con tinción de contraste con hematoxilina, se "azulearon" bajo el agua del grifo, y se montaron en laminillas microscópicas con un líquido de montaje (GVA Mount, Cambridge Bioscience, Cambridge, RU). Los controles del experimento incluyeron la

utilización de una sonda negativa no pertinente (CAV) y de una sonda positiva (PCV) sobre muestras procedentes de cerdos enfermos y de cerdos no enfermos.

Ejemplo 4: *Técnica de detección del PCV por inmunofluorescencia*

El rastreo inicial de todas las preparaciones de cultivo celular fijadas con acetona fue realizado por una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando una dilución al 1/100 de un grupo de sueros de cerdos adultos. Este grupo de sueros comprende sueros de 25 cerdas adultas de Irlanda del Norte y se le conoce por contener anticuerpos contra una gran variedad de virus porcinos, incluyendo el PCV: parvovirus porcino, adenovirus porcino y virus PRRS. Se realizó la técnica IFI por contacto del suero (diluido en PBS) con los cultivos celulares durante una hora a +37 °C, seguido de dos lavados en PBS. Se colorean entonces los cultivos de células con una dilución al 1/80 en PBS de un anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulina de cerdo conjugado con isotiocianato de fluoresceína durante una hora, se lavan después en PBS y se montan en tampón glicerol previamente a la observación microscópica bajo iluminación ultravioleta.

Ejemplo 5: *Resultados de la hibridación in situ sobre los tejidos de cerdos enfermos*

La hibridación *in situ*, utilizando una sonda genómica de PCV, realizada sobre tejidos extraídos de lechones franceses, canadienses y californianos que presentaban lesiones de debilitamiento generalizado y fijados con formaldehído, reveló la presencia de ácidos nucleicos de PCV asociados a las lesiones en varias de las lesiones estudiadas. No se observó señal alguna cuando se utilizó la sonda genómica de PCV sobre tejidos extraídos de cerdos no enfermos o cuando se utilizó la sonda de CAV sobre los tejidos de cerdos enfermos. Se identificó la presencia de ácido nucleico de PCV en el citoplasma y el núcleo de numerosas células mononucleares que infiltraban las lesiones en los pulmones de los lechones californianos. También se evidenció la presencia de ácido nucleico de PCV en los neumocitos, en las células epiteliales bronquiales y bronquiolares y en las células endoteliales de las pequeñas arteriolas, las vénulas y los vasos linfáticos.

Entre los cerdos enfermos franceses, se detectó la presencia de ácido nucleico de PCV en el citoplasma de numerosos linfocitos foliculares y en las células mononucleares intrasinusoidales de los ganglios linfáticos. También se detectó el ácido nucleico de PCV en sincitios ocasionales. En función de estos resultados de detección, se eligieron muestras de pulmones de cerdos californianos, de ganglios linfáticos mesentéricos de cerdos franceses y de órganos de cerdos canadienses con fines de aislamiento de nuevas cepas de circovirus porcino.

Ejemplo 6: *Resultados del cultivo celular de las nuevas cepas de circovirus porcino y detección por inmunofluorescencia*

No se observó ningún efecto citopático (ECP) en los cultivos de células inoculadas con las muestras extraídas de los lechones franceses (cepa Imp.1008), californianos (cepa Imp.999) y canadienses (cepa Imp.1010) que mostraban signos clínicos del síndrome de debilitamiento generalizado. Sin embargo, el inmunomarcaje de las preparaciones procedentes de los cultivos de células inoculadas, tras fijación con acetona y con un grupo de sueros policlonales de cerdos, reveló una fluorescencia nuclear en numerosas células en los cultivos inoculados a partir de los pulmones de lechones californianos (cepa Imp.999), a partir de los ganglios linfáticos mediastínicos de los lechones franceses (cepa Imp.1008) y a partir de órganos de los lechones canadienses (cepa Imp.1010).

Ejemplo 7: *Extracción del ADN genómico de los circovirus porcinos*

Las formas replicativas de las nuevas cepas de circovirus porcino (PCV) fueron preparadas a partir de cultivos de células PK/15 infectadas (véase el ejemplo 1) (10 Falcon de 75 cm<sup>2</sup>) recogidas tras 72-76 horas de incubación y tratadas con glucosamina, como se describe para la clonación de la forma replicativa del CAV (Todd D. y col., Dot blot hybridization assay for chicken anemia agent using a cloned DNA probe, J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 933-939). El ADN de doble hebra se extrajo de estas formas replicativas según una modificación de la técnica de Hirt (Hirt B., Selective extraction of polyoma virus DNA from infected cell cultures, J. Mol. Biol., 1967, 36, 365-369), como describe Molitor (Molitor T.W. y col., Porcine parvovirus DNA: characterization of the genomic and replicative form DNA of two virus isolates, Virology, 1984, 137, 241-254).

Ejemplo 8: *Mapa de restricción de la forma replicativa del genoma de la cepa Imp.999 de circovirus porcino*

El ADN (1-5 µg) extraído según la técnica de Hirt se extrajo con nucleasa S1 (Amersham) según las recomendaciones del proveedor, después este ADN se digirió por diferentes enzimas de restricción (Boehringer Mannheim, Lewis, East Sussex, RU) y se separaron los productos de la digestión por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en presencia de bromuro de etidio, como describen Todd y col. (Purification and biochemical characterization of chicken anemia agent, J. Gen. Virol. 1990, 71, 819-823). El ADN extraído de los cultivos de la cepa Imp.999 posee un sitio único EcoRI y 2 sitios SacI y no posee sitio PstI. Este perfil de restricción es, pues, diferente del perfil de restricción presentado por la cepa PCV PK/15 (Meehan B. y col., Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circovirus, 1997, 78, 221-227), que posee, por el contrario, un sitio PstI y no posee sitio EcoRI.

Ejemplo 9: *Clonación del genoma de la cepa Imp.999 de circovirus porcino*

Se aisló el fragmento de restricción de aproximadamente 1,8 kpb generado por digestión de la forma replicativa bicatenaria de la cepa de PCV Imp.999 con la enzima de restricción EcoRI tras electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (véase el ejemplo 3) utilizando un kit comercial Qiagen (QIAEXII Gel Extraction Kit, Cat. # 20021, QIAGEN Ltd., Crawley, West Sussex, RU). Este fragmento de restricción EcoRI-EcoRI se ligó después con el vector pGEM7 (Promega, Medical Supply Company, Dublín, Irlanda), previamente digerido por las mismas enzimas de restricción y desfosforilado, siguiendo las técnicas estándar de clonación (Sambrook J. y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Los plásmidos obtenidos fueron transformados en una cepa huésped de *Escherichia coli* JM109 (Stratagene, La Jolla, EE.UU.) según las técnicas estándar. Se clonó también el fragmento de restricción EcoRI-EcoRI de la cepa de PCV Imp.999 en el sitio EcoRI del vector pBlueScript SK+ (Stratagene Inc., La Jolla, EE.UU.). Entre los clones obtenidos para cada cepa huésped, se seleccionaron al menos 2 clones que contenían los fragmentos del tamaño esperado. Después, se cultivaron los clones obtenidos y se purificaron los plásmidos que contenían el genoma completo de la cepa Imp.999 en un pequeño volumen (2 ml) o en un gran volumen (250 ml) según las técnicas de preparación y de purificación de plásmidos estándar.

Ejemplo 10: *Secuenciación del ADN genómico (forma replicativa de doble hebra) de la cepa de PCV Imp. 999*

Se determinó la secuencia nucleotídica de 2 clones EcoRI Imp.999 (clones pGEM-7/2 y pGEM-7/8) según la técnica de los didesoxinucleótidos de Sanger utilizando el kit de secuenciación "AmpliTaQ DNA polymerase FS" (Cat. # 402079 PE Applied Biosystems, Warrington, RU) y un aparato de secuenciación automática de Applied Bio-systems AB1373A según las recomendaciones del proveedor. Las reacciones de secuenciación iniciales se realizaron con los cebadores universales M13 "directo" (*forward*) e "inverso" (*reverse*). Se generaron las siguientes reacciones de secuenciación según la técnica de "marcha sobre el ADN". Los oligonucleótidos necesarios para estas secuenciaciones ulteriores fueron sintetizados por Life Technologies (Inchinnan Business Park, Paisley, RU).

Las secuencias generadas se agruparon y se analizaron con el programa informático MacDNASIS versión 3.2. (Cat. # 22020101, Appligene, Durham, RU). Se analizaron los diferentes marcos abiertos de lectura por medio del algoritmo BLAST, disponible en el servidor del "National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.).

En la figura 6 se presenta la secuencia completa (fragmento EcoRI-EcoRI) obtenida inicialmente a partir del clon pGEM-7/8 (SEC ID N°: 6). Esta comienza arbitrariamente tras la G del sitio EcoRI y presenta algunas incertidumbres desde el punto de vista de los nucleótidos.

Después se optimizó la secuenciación y la SEC ID N°: 3 (Figura 3) da la secuencia total de esta cepa, a la que se ha hecho comenzar arbitrariamente al inicio del sitio EcoRI, incluyendo G como primer nucleótido.

Se procedió de una manera similar para la obtención de la secuencia de los otros tres aislados según la invención (véanse las SEC ID Nos: 1, 2 y 4 y las figuras 1, 2 y 4).

El tamaño del genoma de estas cuatro cepas es:

Imp 1011-48121	1767 nucleótidos
Imp 1011-48285	1787 nucleótidos
Imp 999	1768 nucleótidos
Imp 1010	1788 nucleótidos

Ejemplo 11: *Análisis de la secuencia de la cepa de PCV Imp.999*

Cuando se utilizó la secuencia generada a partir de la cepa Imp.999 para una búsqueda de homología frente a secuencias contenidas en el banco de datos GenBank, la única homología significativa detectada es una homología de aproximadamente el 76% (a nivel de ácido nucleico) con la secuencia de la cepa PK/15 (Números de acceso Y09921 y U49186) (véase la figura N° 5).

A nivel de aminoácidos, la búsqueda de homología de la traducción de las secuencias en las 6 fases con los bancos de datos (algoritmo BLAST X en el servidor NCBI) permitió poner en evidencia una homología del 94% con el marco abierto de lectura correspondiente a la replicasa teórica del virus BBTV similar a los circovirus de plantas (número de identificación GenBank 1841515) codificada por la secuencia GenBank U49186.

Ninguna otra secuencia contenida en los bancos de datos muestra homología significativa con la secuencia generada a partir de la cepa de PCV Imp.999.

El análisis de las secuencias obtenidas a partir de la cepa Imp.999 cultivada a partir de lesiones extraídas de lechones californianos que presentaban signos clínicos del síndrome de debilitamiento generalizado muestra claramente que este aislado vírico es una nueva cepa del circovirus porcino.

5

Ejemplo 12: *Análisis comparativo de las secuencias*

Se hizo la alineación de las secuencias nucleotídicas de las 4 nuevas cepas de PCV con la secuencia de la cepa PCV PK/15 (figura 5). Se realizó una matriz de homología que tenía en cuenta las cuatro nuevas cepas y la cepa anterior PK/15. Los resultados son los siguientes:

10

- 1: Imp 1011-48121
- 2: Imp 1011-48285
- 3: Imp 999
- 4: Imp 1010
- 15 5: PK/15

15

	1	2	3	4	5
1	1,0000	0,9977	0,9615	0,9621	0,7600
2		1,0000	0,9621	0,9632	0,7594
3			1,0000	0,9949	0,7560
4				1,0000	0,7566
5					1,0000

La homología entre las dos cepas francesas Imp 1011-48121 y Imp 1011-48285 es superior al 99% (0,9977).

20

La homología entre las dos cepas norteamericanas Imp 999 y Imp 1010 es también superior al 99% (0,9949). La homología entre cepas francesas y cepas norteamericanas es un poco superior al 96%.

La homología de todas estas cepas con PK/15 cae a un valor comprendido entre el 75 y el 76%.

25

Se deduce de ello que las cepas según la invención son representativas de un nuevo tipo de circovirus porcino, distinto del tipo representado por la cepa PK/15. Este nuevo tipo, aislado de cerdos que presentan el síndrome PMWS, se denomina circovirus porcino de tipo II, representando la PK/16 el tipo I. Las cepas pertenecientes a este tipo II presentan una notable homogeneidad de secuencia nucleotídica, incluso cuando han sido aisladas en regiones geográficas muy alejadas.

30

Ejemplo 13: *Análisis de las proteínas codificadas por el genoma de las nuevas cepas de PCV*

Se consideró la secuencia nucleotídica del aislado Imp. 1010 como representativa de las otras cepas de circovirus asociadas al síndrome de debilitamiento generalizado. Esta secuencia fue analizada con más detalle con ayuda del algoritmo BLASTX (Altschul y col., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410) y de una combinación de programas del conjunto de programas informáticos MacVector 6.0 (Oxford Molecular Group, Oxford OX4 4GA, RU). Ha sido posible detectar 13 marcos abiertos de lectura (o MAL) de un tamaño superior a 20 aminoácidos sobre esta secuencia (genoma circular). Estos 13 MAL son los siguientes:

35

Nombre	Inicio	Fin	Hebra	Tamaño del MAL (nucleótidos (nt))	Tamaño de la proteína (aminoácidos (aa))
MAL1	103	210	Sentido	108 nt	35 aa
MAL2	1180	1317	Sentido	138 nt	45 aa
MAL3	1363	1524	Sentido	162 nt	53 aa
MAL4	398	1342	Sentido	945 nt	314 aa
MAL5	900	1079	Sentido	180 nt	59 aa

## ES 2 524 359 T3

Nombre	Inicio	Fin	Hebra	Tamaño del MAL (nucleótidos (nt))	Tamaño de la proteína (aminoácidos (aa))
MAL6	1254	1334	Sentido	81 nt	26 aa
MAL7	1018	704	Antisentido	315 nt	104 aa
MAL8	439	311	Antisentido	129 nt	42 aa
MAL9	190	101	Antisentido	90 nt	29 aa
MAL10	912	733	Antisentido	180 nt	59 aa
MAL11	645	565	Antisentido	81 nt	26 aa
MAL12	1100	1035	Antisentido	66 nt	21 aa
MAL13	314	1381	Antisentido	702 nt	213 aa

Las posiciones de inicio y de final de cada MAL se refieren a la secuencia presentada en la figura N° 4 (SEC ID N°: 4), del genoma de la cepa 1010. Los límites de los MAL 1 a 13 son idénticos para la cepa 999. También lo son para las cepas 1011-48121 y 1011-48285, salvo para los MAL 3 y 13:

5

MAL3 1432-1539, sentido, 108 nt, 35 aa.

MAL13 314-1377, antisentido, 705 nt, 234 aa.

10 Entre estos 13 MAL, 4 presentan una homología significativa con MAL análogos situados sobre el genoma del virus clonado PCV PK-15. Se analizó cada uno de los marcos abiertos de lectura presentes sobre el genoma de todos los aislados de circovirus asociados al síndrome de debilitamiento generalizado. Estos 4 MAL son los siguientes:

Nombre	Inicio	Fin	Hebra	Tamaño del MAL (nt)	Tamaño de la proteína (aminoácidos)	Masa molecular
MAL4	398	1342	Sentido	945 nt	314 aa	37,7 kDa
MAL7	1018	704	Antisentido	315 nt	104 aa	11,8 kDa
MAL10	912	733	Antisentido	180 nt	59 aa	6,5 kDa
MAL13	314	1381	Antisentido	702 nt	233 aa	27,8 kDa

15 Las posiciones de inicio y de final de cada MAL se refieren a la secuencia presentada en la figura N° 4 (SEC ID N°: 4). El tamaño del MAL (en nucleótidos = nt) incluye el codón de terminación.

20 La comparación entre la organización genómica de los aislados PCV Imp. 1010 y PCV PK-15 ha permitido la identificación de 4 MAL conservados en el genoma de los dos virus. La siguiente tabla presenta los grados de homología observados:

MAL Imp. 1010/MAL PCV PK-15	Porcentaje de homología
MAL4/MAL1	86%
MAL13/MAL2	66,4%
MAL7/MAL3	61,5% (a nivel del recubrimiento (104 aa))
MAL10/MAL4	83% (a nivel del recubrimiento (59 aa))

Se observó la mayor identidad de secuencia entre el MAL4 Imp. 1010 y el MAL1 PK-15 (86% de homología). Se esperaba esto en la medida en que esta proteína está probablemente implicada en la replicación del ADN vírico y es

esencial para la replicación vírica (Meehan y col., J. Gen. Virol., 1997, 78, 221-227; Mankertz y col., J. Gen. Virol., 1998, 79, 381-384).

La identidad de secuencia entre el MAL13 Imp.1010 y el MAL2 PK-15 es menos fuerte (66,4% de homología), pero cada uno de estos MAL presenta una región básica N-terminal muy conservada, que es idéntica a la región N-terminal de la proteína estructural mayor del circovirus aviar CAV (Meehan y col., Arch. Virol., 1992, 124, 301-319). Se observan mayores diferencias entre MAL7 Imp.1010 y MAL3 PK-15 y entre MAL10 Imp.1010 y MAL4 PK-15. En cada caso, existe una delección de la región C-terminal de los MAL7 y MAL10 del aislado Imp.1010 cuando se les compara con los MAL3 y MAL4 de PCV PK-15. La homología de secuencia más alta es observada a nivel de las regiones N-terminales de MAL7/MAL3 (61,5% de homología a nivel del recubrimiento) y de MAL10/MAL4 (83% de homología a nivel del recubrimiento).

Parece que la organización genómica del circovirus porcino es bastante compleja por la extrema compacidad de su genoma. La proteína estructural mayor procede probablemente de una unión entre varios marcos de lectura situados en la misma hebra del genoma del circovirus porcino. Se puede considerar, pues, que cualquier marco abierto de lectura (MAL1 a MAL13) tal como se describió en la tabla anterior, puede representar toda o parte de una proteína antigénica codificada por el circovirus porcino de tipo II y es, pues, potencialmente un antígeno utilizable para el diagnóstico específico y/o para la vacunación. La invención se relaciona por tanto con cualquier proteína que contenga al menos uno de estos MAL. Preferiblemente, la invención se relaciona con una proteína formada esencialmente por los MAL4, MAL7, MAL10 o MAL13.

Ejemplo 14: *Carácter infeccioso del genoma de PCV clonado a partir de las nuevas cepas*

Se transfectó el plásmido pGEM-7/8 que contenía el genoma completo (forma replicativa) del aislado Imp.999 en células PK/15 según la técnica descrita por Meehan B. y col. (Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anemia agent: sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments, Arch. Virol., 1992,124, 301-319). El análisis por inmunofluorescencia (véase el ejemplo 4) realizado sobre el primer pase tras la transfección sobre células PK/15 no contaminadas mostró que el plásmido del clon pGEM7/8 era capaz de inducir la producción de virus PCV infeccioso. La disponibilidad de un clon que contenía un material genético de PCV infeccioso permite cualquier manipulación útil sobre el genoma vírico con el fin de producir virus PCV modificados (ya sean atenuados en el cerdo, ya sean defectivos) utilizables para la producción de vacunas atenuadas o recombinantes, o para la producción de antígenos con fines de diagnóstico.

Ejemplo 15: *Producción de los antígenos de PCV por cultivo in vitro*

Se realiza el cultivo de las células PK/15 no contaminadas y la multiplicación vírica según las mismas modalidades que en el ejemplo 1. Las células infectadas son recogidas tras tripsinización después de 4 días de incubación a 37°C y numeradas. Se inocula el pase siguiente con 400.000 células infectadas por ml.

Ejemplo 16: *Inactivación de los antígenos víricos*

Al final del cultivo vírico, se recogen las células infectadas y se lisan por ultrasonidos (Branson Sonifier) o con ayuda de un triturador coloidal de tipo rotor-estator (UltraTurrax, IKA). Después, se centrifuga la suspensión a 3.700 g durante 30 minutos. Se inactiva la suspensión vírica mediante un 0,1% de etilenimina durante 18 horas a +37°C o mediante un 0,5% de beta-propiolactona durante 24 horas a +28°C. Si el título del virus antes de la inactivación es insuficiente, se concentra la suspensión vírica por ultrafiltración utilizando una membrana con un umbral de corte de 300 kDa (Millipore PTMK300). Se conserva la suspensión vírica inactivada a +5°C.

Ejemplo 17: *Preparación de la vacuna en forma de emulsión a base de aceite mineral*

La vacuna se prepara según la siguiente fórmula:

- Suspensión de circovirus porcino inactivado: 250 ml
- Montanide® ISA 70 (SEPPIC): 750 ml

Se esterilizan la fase acuosa y la fase oleosa por separado por filtración. Se prepara la emulsión por mezcla y homogeneización de los ingredientes con ayuda de un emulsor de turbina Silverson.

Una dosis de vacuna contiene aproximadamente 10<sup>7,8</sup> DICT50. El volumen de una dosis de vacuna es de 0,5 ml para administración por vía intradérmica y de 2 ml para administración por vía intramuscular.

Ejemplo 18: *Preparación de la vacuna en forma de emulsión a base de aceite metabolizable*

La vacuna se prepara según la siguiente fórmula:

- Suspensión de circovirus porcino inactivado: 200 ml
- Dehymuls HRE 7 (Henkel): 80 ml

## ES 2 524 359 T3

- Radia 7204 (Oleofina): 740 ml

Se esterilizan la fase acuosa y la fase oleosa por separado por filtración. Se prepara la emulsión por mezcla y homogeneización de los ingredientes con ayuda de un emulsor de turbina Silverson.

- 5 Una dosis de vacuna contiene aproximadamente  $10^{7.6}$  DICT50. El volumen de una dosis de vacuna es de 2 ml para administración por vía intramuscular.

- 10 Ejemplo 19: *Resultados de inmunofluorescencia indirecta frente a las cepas del virus PCV EE.UU. y francesa y del contaminante PK/15 con un suero hiperinmune (PCV-T), un panel de anticuerpos monoclonales F99, preparados a partir de PK/15 y un suero hiperinmune preparado a partir de la cepa canadiense (PCV-C)*

VIRUS			
	PK/15	EE.UU.	Francia
Antisuero PCV-T	≥ 6.400	200	800
Antisuero PCV-C	200	≥ 6. 400	≥ 6. 400
F99 1H4	≥ 10.000	<100	100
F99 4B10	≥ 10.000	< 100	< 100
F99 287	≥ 10.000	100	<100
F99 2E12	≥ 10.000	< 100	< 100
F99 1C9	≥ 10.000	< 100	100
F99 2E1	≥ 10.000	< 100	< 100
F99 1H4	≥ 10.000	100	< 100

\* Inversa de la última dilución del suero o del anticuerpo monoclonal que da una reacción positiva en inmunofluorescencia indirecta.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos de un circovirus porcino de tipo II (PCV II) responsable del síndrome de debilitamiento generalizado posterior al destete (PMWS), en el que dicha secuencia de nucleótidos del vector comprende un marco abierto de lectura (MAL) del circovirus porcino de tipo II (PCV II), seleccionándose dicho marco abierto de lectura del grupo constituido por:
- 10 - el marco abierto de lectura 4 (MAL 4) constituido por los nucleótidos 398 a 1342 de la hebra en sentido de la secuencia de referencia SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6,  
 - el marco abierto de lectura 13 (MAL 13) constituido por los nucleótidos 314 a 1377 de la hebra antisentido de la secuencia de referencia SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 o los nucleótidos 314 a 1381 de la hebra antisentido de la secuencia de referencia SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6,  
 - el marco abierto de lectura 7 (MAL 7) constituido por los nucleótidos 1018 a 704 de la hebra antisentido de la secuencia de referencia SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6, y  
 15 - el marco abierto de lectura 10 (MAL 10) constituido por los nucleótidos 912 a 733 de la hebra antisentido de la secuencia de referencia SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6,
- 20 expresando dicho vector de expresión *in vitro* o *in vivo* dicho marco abierto de lectura del circovirus porcino de tipo II.
2. Vector de expresión según la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos del vector comprende el marco abierto de lectura 4 (MAL 4) o el marco abierto de lectura 13 (MAL 13).
- 25 3. Vector de expresión según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el vector es un baculovirus o un plásmido.
4. Vector de expresión según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el vector es apropiado para la expresión *in vivo*.
- 30 5. Vector de expresión según la reivindicación 4, en el que el vector es un virus vivo o un plásmido.
6. Vector de expresión según la reivindicación 5, en el que el vector se selecciona entre el herpesvirus de cerdo, el adenovirus porcino y los poxvirus.
- 35 7. Vector de expresión según la reivindicación 6, en el que el vector se selecciona entre el virus de la enfermedad de Aujeszky, el virus de la vacuna, de la viruela aviar y de la viruela porcina.
8. Vector de expresión según la reivindicación 7, en el que el vector es el virus de la viruela del canario.
- 40 9. Vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que el vector de expresión se utiliza para inducir una respuesta inmunitaria en el cerdo contra un circovirus porcino de tipo II (PCV II).
10. Una célula que expresa *in vitro* un polipéptido de un circovirus porcino de tipo II (PCV II), comprendiendo la célula un vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 45 11. Célula según la reivindicación 10, en la que la célula es una célula de *E. coli* o una célula eucariota.
12. Célula según la reivindicación 11, en la que la célula eucariota es una levadura.
- 50 13. Célula según la reivindicación 11, en la que la célula eucariota es una célula de mamífero.
14. Célula según la reivindicación 11, en la que la célula eucariota es una célula de insecto.
- 55 15. Polipéptido codificado por un fragmento de ADN que comprende un marco abierto de lectura (MAL) de un circovirus porcino de tipo II (PCV II), seleccionándose el marco abierto de lectura del grupo constituido por:
- 60 - el marco abierto de lectura 4 (MAL 4) constituido por los nucleótidos 398 a 1342 de la hebra sentido de la secuencia de referencia SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6,  
 - el marco abierto de lectura 13 (MAL 13) constituido por los nucleótidos 314 a 1377 de la hebra antisentido de la secuencia de referencia SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 o los nucleótidos 314 a 1381 de la hebra antisentido de la secuencia de referencia SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6,  
 - el marco abierto de lectura 7 (MAL 7) constituido por los nucleótidos 1018 a 704 de la hebra antisentido de la secuencia de referencia SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6, y  
 65 - el marco abierto de lectura 10 (MAL 10) constituido por los nucleótidos 912 a 733 de la hebra antisentido de la secuencia de referencia SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6,

16. Polipéptido según la reivindicación 15, en el que el marco abierto de lectura del PCV II es el marco abierto de lectura 4 (MAL 4) o el marco abierto de lectura 13 (MAL 13).
- 5 17. Polipéptido según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en el que el polipéptido se utiliza para inducir una respuesta inmunitaria en el cerdo contra un circovirus porcino de tipo II (PCV II).
18. Vacuna subunitaria que comprende al menos un polipéptido de la reivindicación 15 o de la reivindicación 16, en un vehículo o diluyente aceptable desde el punto de vista veterinario.
- 10 19. Vacuna subunitaria según la reivindicación 18 que comprende adicionalmente un adyuvante aceptable desde el punto de vista veterinario.
20. Vacuna que comprende al menos un vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 en un vehículo o diluyente aceptable desde el punto de vista veterinario.

Figura N° 1

Secuencia del aislado PVC Imp1011-48121 (SEC ID N° 1)

```

1  AATTCACCT TAACCTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG
51  GGGGTTTGAG CCCCCTCCTG GGGGAAGAAA GTCAATAATA TTGAATCTCA
101 TCATGTCCAC CCCCAGGAG GCGCTTCTGA CTGTGGTTTG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TCGGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCTTCT
201 CCAGCGTAA CGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGGGG CCGCGGAGGA
251 TCTGGCCAG ATGGCTGCG GGGCGGTGT TCTTCTCCG GTAACGCCTC
301 CTTGGATAG TCAATCTGA AAACGAAGA AGTGGCTGT AGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGCA GCACCTCGG ASCACTCAG CAGCAACATG
401 CCGAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCCATA AAGGTGGGT
451 GTTCACTTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGATC
501 TTCCAADATC CCTATTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTT GCTAATTTG TGAAGAAGCA
601 GACTTTTAT AAGTGAAGT GGTATTGGG TCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCGAAGG AACAGATCAG CCAATAAAG AATACTCCAG TAAGAAGGC
701 AACTTACTGA TCGATGTGG AGCTCCTAGA TCTCAGGAC AACGGAGTA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTTGTGGA GAGCGGAGT CTGGTGACG
801 TTGCAGAGCA GCACCTGTA ACCTTGTCA GAAATTTCCG CCGGCTGGCT
851 GAACTTTGA AAGTGAGCG GAAATGCAG AAGCGTATT GGAAGACTAA
901 TGTACACTC ATTGTGGGG CACTGGGTG TGGTAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTTGC AGACCGGAA ACCACATCT GGAACCACC TAGAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCGTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGACTGTAGA GACTAAGGT GGAACGTAC CTTTTTGGC CCGCAGTAT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGA TGGTACTCCT CACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGA
    
```

Figura N° 1 (continuación y fin)

1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCTT  
 1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTAAT GAGTCTTTTT  
 1351 TATCACTTCC TAATGGTTTT TATTATTCAI TAAGGGTEAA GTGGGGGGTC  
 1401 YTTAAGATTA AATTCTCTGA ATTGTACATA CATGGTTACA CGGATATTGT  
 1451 ATTCCTGGTC GTATATACTG TTTTCGAACG CAGTCCCGAG GCCTACGTGG  
 1501 TCEACATTTT CAGCAGTTTG TAGTCTCAGC CACAGCTGGT TTCTTTTGT  
 1551 GTTTGGTTGG AAGTAATCAA TAGTGGAAIC TAGGACAGGT TTGGGGGTAA  
 1601 AGTAGCGGGA CTGGTAGGAG AAGGGCTGGG TTATGGTATG GCGGGAGGAG  
 1651 TAGTTACAT AGGGGTCATA GGTGAGGGCT GTGGCCTTTG TTACAAAGTT  
 1701 ATCATCTAGA ADAACAGCAC TGGAGCCCAC TCCCCTGTCA CCCTGGGTGA  
 1751 TCGGGGAGCA GGGCCAG

Figura N° 2

Secuencia del aislado PCV Imp1011-48285 (SEC ID N° 2)

1 AATCAACCT TAACCTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG  
 51 GGGGTTTGAG CCCCCTCTG GGGGAAGAAA GTCATTAATA TTGAATCTCA  
 101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGGTTTGA CTGTGGTTCG CTTGACAGTA  
 151 TATCCGAAGG TGCGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCTTCT  
 201 CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCGCGGCGG CGCGGGAGGA  
 251 TGTGGCEAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGC TTCTTCTCG GTAACGCCTC  
 301 CTGGATACG TCATATCTGA AACGAAAGA AGTGGGCTGT AAGTATTACC  
 351 AGCGCACTC GGCAGCGGCA GCACCTCGG AGCACTCAG CAGCAACATG  
 401 CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACC CAACCCATA AAAGGTGGGT  
 451 GTTCACTCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGATC  
 501 TTCCAATATC CCTATTTGAT TATTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG  
 551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTT GCTAATTTTG TGAAGAAGCA  
 601 GACTTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA  
 651 AAGCGAAAGG AACAGATCAG CAGAATAAG AATACTGCAG TAAAGAAGGC  
 701 AACTTACTGA TGGAGTGTGG AGCTCCTAGT TCTCAGGGAC AACGGAGTGA  
 751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTGTGTGGA GAGCGGGAAT CTGGTGACCG  
 801 TTGCAGAGCA GCACCCGTGA ACGTTTGTCA GAAATTTCCG CCGGCTGGCT  
 851 GAACTTTGA AAGTGAGCGG GAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACTAA  
 901 TGTACACGTC ATTGTGGGGC CACTGGGTG TGGTAAAGC AAATGGGCTG  
 951 CTAATTTTGC AGACCCGGAA ACCACATACT GGAACCACC TAGAACAAG  
 1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA  
 1051 TGGCTGGCTG CCCTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT  
 1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GAACTGTAC CTTTTTTGGC CCGCAGTATT  
 1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT  
 1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTTT ATCGGAGGAT TACTTCCTG GATTATTGGA

## Figura N° 2 (continuación y fin)

1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCTTT  
 1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTAAT GAGTCCTTTT  
 1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TAAGGGTTAA GTGGGGGGTC  
 1401 TTTAAGATTA AATTCTCTGA ATTGTACATA CATGGTTACA CGGATATTGT  
 1451 ATTCTCTGGTC GTATATACTG TTTTCGAAGC CAGTCCCGAG GCCTACGTGG  
 1501 TCTACATTTT CAGTAGTTTG TACTCTCAGC CACAGCTGAT TTCCTTTGTT  
 1551 GTTTGGTTGG AAGTAATCAA TAGTGGATC TAGGACAGGT TTGGGGGTAA  
 1601 AGTAGCGGGA GTGGTAGGAG AAGGGCTGGG TTATGGTATG GCGGGAGGAG  
 1651 TAGTTACAT AGGGGTCATA GGTGAGGGCT GTGGCCTTTG TTACAAAGTT  
 1701 ATCATCTAGA ATACAGCAC TGGAGCCAC TCCCCTGTCA CCTGGGTGA  
 1751 TCGGGAGCA GGGCCAG

Figura N° 3

Secuencia del aislado PCV Imp999 (SEC ID N° 3)

```

1  AATTC AACCT TAACCTTTT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GTATAGAGAT
51  TTTGTGGTC CCCCCTCCCG GGGGAACAA GTCTCAATA TTAAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGTTCCTGA CTGTGGTAGC CTTGACAGTA
151 TATCCGAAG TCGGGGAGG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTCT
201 CCAACGGTAG CGGTGGCGG GGTGGACGAG CCAGGGCCGG CGCGGGAGGA
251 TCTGGCCAG ATGGCTGCG GGGCGGTGC TTCTTCTCG GTAACGCCTC
301 CTTGGATACG TCATAGCTGA AAACGAAAGA AGTGGCGCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCCAGCAAG AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCACATA AAAGGTGGGT
451 GTTCACGCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGAGC
501 TCCCAATCTC CCTATTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGA CACCTCACCT CCGGGGCTC GCTAATTTTG TGAAGAGCA
601 AACTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCCAAAG AACTGATCAG CAGAATAAG AATATTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTTA TTGAATGTG AGCTCCTCGA TCTCAAGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTTGTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCTGTA ACGTTTGTCA GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTGA AAGTGAGCG GAAATGCAG AAGCTGATT GGAAGACCA
901 TGACACGTC ATTGTGGGG CACCTGGGTG TGGTAAAGC AATGGGCTG
951 CTAATTTTGC AGACCCGGA ACCACATACT GGABCCACC TAGAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TCAAGAAAGT GTTGTIATG ATGACTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCGTGGGATG AACTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGA CTGTAGA GACTAAAGGT GGA ACTGTAC CTTTTTGGC CGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTCT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGA
    
```

Figura N° 3 (continuación y fin)

1251 AGAATGCTAC AGAACAAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT COTCACCCIT  
 1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTAAT GAGTCCTTTT  
 1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TTAGGCTTAA AGTGGGGGGT  
 1401 CTTAAGAIT AAATTCCTCG AATTGTACAT ACATGGTTAC ACGGATATTG  
 1451 TAGTCCTGGT CGTATAIACT GTTTTCGAAC GCAGTCCCGA GGCCTACGTG  
 1502 GTCCACATTT CTAGAGGTTT GTAGCCTCAG CCAAGCTGA TTCCTTTTGT  
 1551 TATTTGGTTG GAAGTAATCA ATAGTGGAGT CAAGAACAGG TTTGGGTGTG  
 1601 AAGTAACGGG AGTGGTAGGA GAAGGTTGG GGCATGTAT GCGGGAGGA  
 1651 GTAGTTTACA TATGGGTCAT AGGTTAGGGC TGTGGCCTTT GTTACAAAGT  
 1701 TATCATCTAG AATAACAGCA GTGGAGCCCA CTCCCCTATC ACCCTGGGTG  
 1751 ATGGGGGAGC AGGGCCAG

Figura N° 4

Secuencia del aislado PCV Imp1010 (SEC ID N° 4)

1 AATTC AACCT TAACCTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GTATAGAGAT  
 51 TTTGTTGGTC CCCCCTCCCG GGGGAACAAA GTCGTCAATT TTAATCTCA  
 101 TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GCGGTTGTGA CTGTGGTACG CTTCACASTA  
 151 TATCCGAAGG TCGGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT  
 201 CCAACGGTAG CGCTGGCCGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA  
 251 TCTGGCCAAg ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TCTTCTGCG GTAACGCCTC  
 301 CTTGGATACG TCATAGCTGA AAACGAAGA AGTGGCGTGT AAGTATTACG  
 351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG  
 401 CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACACATA AAAGGTGGGT  
 451 GTTCACGCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGAGC  
 501 TCCCAATCTC CCTATTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG  
 551 GAAGGACCAA CACCTCACCT CCAGGGGTC GCTAATTTTG TGAAGAAGCA  
 601 AACTTTTAAAT AAAGTGAAGT GGTATTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA  
 651 AAGCCAAAGG AACTGATCAG CAGAATAAG ANTATTGCAG TAAAGAAGGC  
 701 AACTTACTTA TTGAATGTGG AGCTCCTCGA TCTCAAGSAC AACGGAGTGA  
 751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTTGTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG  
 801 TTGCAGAGCA GCACCTGTA ACGTTTGTCA GAAATTTCCG CGGGCTGGCT  
 851 GAACTTTTGA AAGTGAGCGG GAAAATCCAG AAGCGTGATT GGAAGACCAA  
 901 TGTACACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGSTAAAGC AAATGGGCTG  
 951 CTAATTTTGC AGACCCGGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAG  
 1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA  
 1051 TGGCTGGCTG CCGTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT  
 1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGAACGTGAC CTTTTTGGC CCGCAGTATT  
 1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT  
 1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTCT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGA

Figura N° 4 (continuación y fin)

1251 AGAATGCTAC AGAACAAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAATT COTCACCCCT  
 1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT  
 1351 TATCACTTCG TAAJGGTTTT TATTATTCAT TTAGGGTTTA AGTGGGGGGT  
 1401 CTTAAGATT AAATTCTCTG AATTGTACAT ACATGGTEAC ACGGATATTG  
 1451 TAGTCTGGT CGTATTTACT GTTTTCGAAC GCAGGCCCGA GGCCTACGTG  
 1501 GTCCACATTT CCAGAGGTTT GTAGTCTCAG CCAAGCTGA TTCCTTTGT  
 1551 TATTTGGTTG GAAGTAATCA ATAGTGGAST CAAGAACAGG TTTGGGTGTG  
 1601 AAGTAACGGG AGTGGTAGGA GAAGGGTTGG GGGATTGTAT GCGGGGAGGA  
 1651 GTAGTTTACA TATGGTTCAT AGGTTAGGGC TGTGGCCTTT GTTACAAAGT  
 1701 TATCATCTAG AATAACAGCA GTGGAGCCCA CTCCCCTATC ACCCTGGGTG  
 1751 ATGGGGGAGC AGGGCCAG

Figura N° 5

Alineación múltiple de secuencias CLUSTAL W

```

PCVPK-15      RAATCATAATTTAGCCTTTCTAATACGGTAGTATTGGAAAGGTAGGGGTAGGGGGTTGGTG
IMP999-ECO    AATTC AACCTTAACCTTTTCTATTCTGTAGTATTCAAAGGGTATAGAGATTTTGTGGTC
IMP1010-ST    AATTC AACCTTAACCTTTCTATTCTGTAGTATTCAAAGGGTATAGAGATTTTGTGGTC
IMP1011-48    AATTC AACCTTAACCTTTCTATTCTGTAGTATTCAAAGGGCACAGAGCGGGGGTTTGAG
IMP1011-48    AATTC AACCTTAACCTTTCTATTCTGTAGTATTCAAAGGGCACAGAGCGGGGGTTTGAG
*****      *** ***** * ** * ***** ** ** * *      *** *

PCVPK-15      CCGCCTGAGGGGGGAGGAACCTGGCCGATGTTGAATTTGAGGTAGTTAACATTC CAAGAT
IMP999-ECO    CCCCCTCCCGGGGAACAAAGTCGTCAATATTTAAATCTCATCATGTCCACCGCC CAGGAG
IMP1010-ST    CCCCCTCCCGGGGAACAAAGTCGTCAATTTTAAATCTCATCATGTCCACCGCC CAGGAG
IMP1011-48    CCCCCTCCTGGGGGAAGAAAGTCATTAAATATGAATCTCATCATGTCCACCGCC CAGGAG
IMP1011-48    CCCCCTCCTGGGGGAAGAAAGTCATTAAATATGAATCTCATCATGTCCACCGCC CAGGAG
** ** *      ***** * ** * * ** ** ** ** * * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

PCVPK-15      GGC--TGCGAGTATCCTCCTTTT-ATGGTGAGTACAAATTCGTAGAAAGCGCGGAATG
IMP999-ECO    GGCCTTCTGACTGTGGTAGCCTTGACAGTATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGGCGGTGTTG
IMP1010-ST    GGCCTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGTATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGGCGGTGTTG
IMP1011-48    GGCCTTCTGACTGTGGTTGCTTGACAGTATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGGCGGTGTTG
IMP1011-48    GGCCTTTTGACTGTGGTTGCTTGACAGTATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGGCGGTGTTG
*** * ** * * *      ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

PCVPK-15      AAGATACCCGCTCTTCGCGCCATCTGTAAACGGTTCTGAAGGCGGGGTGTGCCAAATAT
IMP999-ECO    AAGATGCCATTTTTCTTCTCCACCGGTAGCGGTGGC-GGGGTTGA-CGAGCCAGGGGC
IMP1010-ST    AAGATGCCATTTTTCTTCTCCACCGGTAGCGGTGGC-GGGGTTGA-CGAGCCAGGGGC
IMP1011-48    AAGATGCCATTTTTCTTCTCCACCGGTAAACGGTGGC-GGGGTTGA-CGAGCCAGGGGC
IMP1011-48    AAGATGCCATTTTTCTTCTCCACCGGTAAACGGTGGC-GGGGTTGA-CGAGCCAGGGGC
***** ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

PCVPK-15      GGTCTTCTCCGAGGATGTTTCCAAGATGGCTGCGGGGGCGGGTCTTCTTCTCCGGTAA
IMP999-ECO    GG----CGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGGGCGGTCTTCTTCTCCGGTAA
IMP1010-ST    GG----CGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGGGCGGTCTTCTTCTCCGGTAA
IMP1011-48    GG----CGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGGGCGGTCTTCTTCTCCGGTAA
IMP1011-48    GG----CGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGGGCGGTCTTCTTCTCCGGTAA
** * *      ***** * ***** ***** ***** ***** *****

PCVPK-15      CGCCTCCTTGCCACGTCATCCTATAAAAAGTGAAGAAGTCCCTGCTGTAGTATTACCA
IMP999-ECO    CGCCTCCTTGATACGTCATAGC-TGAAAACGAAAGAAGTCCGCTGTA--AGTATTACCA
IMP1010-ST    CGCCTCCTTGATACGTCATAGC-TGAAAACGAAAGAAGTCCGCTGTA--AGTATTACCA
IMP1011-48    CGCCTCCTTGATACGTCATATC-TGAAAACGAAAGAAGTCCGCTGTA--AGTATTACCA
IMP1011-48    CGCCTCCTTGATACGTCATATC-TGAAAACGAAAGAAGTCCGCTGTA--AGTATTACCA
***** ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

PCVPK-15      GCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCCAGCAAGAA
IMP999-ECO    GCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCCAGCAAGAA
IMP1010-ST    GCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCCAGCAAGAA
IMP1011-48    GCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCCAGCAAGAA
IMP1011-48    GCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCCAGCAAGAA
***** ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **
    
```

Figura N° 5 (continuación)

```

PCVPR-15      -----AAGCGGCCCGCAACCCCATAGAGGTGGGTGTTCACTCTAATAATCCTTC
IMP999-ECO    GAATGGAAGAAGCGGACCCCAACCAATAAAGGTGGGTGTTCACTCTAATAATCCTTC
IMP1010-ST    GAATGGAAGAAGCGGACCCCAACCCCAATAAAGGTGGGTGTTCACTCTAATAATCCTTC
IMP1011-40    GAATGGAAGAAGCGGACCCCAACCCCAATAAAGGTGGGTGTTCACTCTAATAATCCTTC
IMP1011-40    ***** ** ** ** **

PCVPR-15      CAGAGAGGAGAAAACAAATAAGGGAGCTTCCAATCTCCCTTTTGATTATTTTGTGTG
IMP999-ECO    CGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGAGCTCCCAATCTCCCTATTTGATTATTTTATTTG
IMP1010-ST    CGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGAGCTCCCAATCTCCCTATTTGATTATTTTATTTG
IMP1011-40    CGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGAGCTCCCAATCTCCCTATTTGATTATTTTATTTG
IMP1011-40    *** ** ** ** **

PCVPR-15      CGGAGAGGAGGTTTGGAGAGGGTAGAACTCTCACCTCCAGGGGTTTCCGAATTTTGC
IMP999-ECO    TGGCGAGGAGGGTAAATGAGGAAGGACGAACTCACCTCCAGGGGTTCCGTAATTTTGT
IMP1010-ST    TGGCGAGGAGGGTAAATGAGGAAGGACGAACTCACCTCCAGGGGTTCCGTAATTTTGT
IMP1011-40    TGGCGAGGAGGGTAAATGAGGAAGGACGAACTCACCTCCAGGGGTTCCGTAATTTTGT
IMP1011-40    ** ***** ** ** **

PCVPR-15      TAAGAGCAGACTTTTAAACAAGGTGAAGTGGTATTTTGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAA
IMP999-ECO    GAAGAGCAAACCTTTTAAATAAGTGAAGTGGTATTTGGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAA
IMP1010-ST    GAAGAGCAAACCTTTTAAATAAGTGAAGTGGTATTTGGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAA
IMP1011-40    GAAGAGCAGACTTTTAAATAAGTGAAGTGGTATTTGGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAA
IMP1011-40    ***** ***** ** *****

PCVPR-15      AGCGAAAGGAACCGACCCAGCAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAGGCCACATACITAT
IMP999-ECO    AGCCAAAGGAACCTGATCAGCAGAAATAAAGAATATTGCAGTAAAGAAGGCCAACTTACTTAT
IMP1010-ST    AGCCAAAGGAACCTGATCAGCAGAAATAAAGAATATTGCAGTAAAGAAGGCCAACTTACTTAT
IMP1011-40    AGCGAAAGGAACAGATCAGCAGAAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAGGCCAACTTACTGAT
IMP1011-40    *** ***** ** *****

PCVPR-15      CGAGTGTGAGCTCCCGGAACCGAGGGGAGCGGAGCCTGTCTACTGCTGTGAGTAC
IMP999-ECO    TGAATGTGGAGCTCCTCGATCTCAAGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTAC
IMP1010-ST    TGAATGTGAGCTCCTCGATCTCAAGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTAC
IMP1011-40    GGAGTGTGAGCTCCTAGATCTCAGGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTAC
IMP1011-40    GGAGTGTGAGCTCCTAGATCTCAGGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTAC
** ***** * ** **

PCVPR-15      CCTTTTGGAGACGGGGTCTTTGGTGACTGTAGCCGAGCAGTTCCCTGTAAAGTATGTGAG
IMP999-ECO    CTTGTTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGAACCGTTGCAGAGCAGCACCTGTAAAGTATGTGAG
IMP1010-ST    CTTGTTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGAACCGTTGCAGAGCAGCACCTGTAAAGTATGTGAG
IMP1011-40    CTTGTTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGAACCGTTGCAGAGCAGCACCTGTAAAGTATGTGAG
IMP1011-40    CTTGTTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGAACCGTTGCAGAGCAGCACCTGTAAAGTATGTGAG
* * ***** ** * ***** ** *****

PCVPR-15      AAATTTCCGCGGCTGGCTGAACCTTTTGAAGTGAACCGGAAATGCAGAGCGCTGATTC
IMP999-ECO    AAATTTCCGCGGCTGGCTGAACCTTTTGAAGTGAACCGGAAATGCAGAGCGCTGATTC
IMP1010-ST    AAATTTCCGCGGCTGGCTGAACCTTTTGAAGTGAACCGGAAATGCAGAGCGCTGATTC
IMP1011-40    AAATTTCCGCGGCTGGCTGAACCTTTTGAAGTGAACCGGAAATGCAGAGCGCTGATTC
IMP1011-40    AAATTTCCGCGGCTGGCTGAACCTTTTGAAGTGAACCGGAAATGCAGAGCGCTGATTC
*****
    
```

Figura N° 5 (continuación)

PCVFK-15            GAAGACAGCTGTACACGTCATAGTGGGCCCCCGGTTGTGGGAAGACCAGTGGGCCCB  
IMP999-ECO        GAAGACCAATGTACACGTCATTTGTGGGCCACCTGGGTGTGGTAAJAGCAAATGGGCTGC  
IMP1010-ST        GAAGACCAATGTACACGTCATTTGTGGGCCACCTGGGTGTGGTAAJAGCAAATGGGCTGC  
IMP1011-48        GAAGACTAAATGTACACGTCATTTGTGGGCCACCTGGGTGTGGTAAJAGCAAATGGGCTGC  
IMP1011-48        GAAGACTAAATGTACACGTCATTTGTGGGCCACCTGGGTGTGGTAAJAGCAAATGGGCTGC  
\*\*\*\*\*            \*\*\*\*\*        \*\*\*\*\*        \* \* \* \* \*        \*\*\*\*\*        \* \* \* \* \*

PCVFK-15            TAATTTTGCCTGAGCCTAGGGACACCTACTGGAAACCTAGTAAJAAJAGTGGGTGGATGG  
IMP999-ECO        TAATTTTGCAGACCCGGAAACCCACATACTGGAAACCACCTAGAAACAAJAGTGGGTGGATGG  
IMP1010-ST        TAATTTTGCAGACCCGGAAACCCACATACTGGAAACCACCTAGAAACAAJAGTGGGTGGATGG  
IMP1011-48        TAATTTTGCAGACCCGGAAACCCACATACTGGAAACCACCTAGAAACAAJAGTGGGTGGATGG  
IMP1011-48        TAATTTTGCAGACCCGGAAACCCACATACTGGAAACCACCTAGAAACAAJAGTGGGTGGATGG  
\*\*\*\*\*            \* \* \*            \* \* \*            \*\*\*\*\*        \* \* \* \* \*

PCVFK-15            ATATCAATGGAGAAGAAGTTGTTTGTGGATGATTTTATGGCTGGTTACCTTGGGATGA  
IMP999-ECO        TTACCAATGGTGAAGAAGTGGTTGTATATGATGACTTTTATGGCTGGCTGCCCTGGGATGA  
IMP1010-ST        TTACCAATGGTGAAGAAGTGGTTGTATATGATGACTTTTATGGCTGGCTGCCCTGGGATGA  
IMP1011-48        TTACCAATGGTGAAGAAGTGGTTGTATATGATGACTTTTATGGCTGGCTGCCCTGGGATGA  
IMP1011-48        TTACCAATGGTGAAGAAGTGGTTGTATATGATGACTTTTATGGCTGGCTGCCCTGGGATGA  
\* \*            \* \* \* \* \*        \* \* \* \* \*        \* \* \* \* \*        \* \* \* \* \*        \* \* \* \* \*

PCVFK-15            TCTACTGAGACTGTGTGACCGGTATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGGGTACTGTTC  
IMP999-ECO        TCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGTGGAACTGTACC  
IMP1010-ST        TCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGTGGAACTGTACC  
IMP1011-48        TCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGTGGAACTGTACC  
IMP1011-48        TCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGTGGAACTGTACC  
\*\*\*\*\*            \* \*            \* \* \* \* \*        \* \* \* \* \*        \* \* \* \* \*

PCVFK-15            TTTTTTGGCCCGCAGTATTCTGATTACCCAGCAATCAGGCCCCCGCAGGAATGGTACTCCTC  
IMP999-ECO        TTTTTTGGCCCGCAGTATTCTGATTACCCAGCAATCAGGCCCCCGTGGAAATGGTACTCCTC  
IMP1010-ST        TTTTTTGGCCCGCAGTATTCTGATTACCCAGCAATCAGGCCCCCGTGGAAATGGTACTCCTC  
IMP1011-48        TTTTTTGGCCCGCAGTATTCTGATTACCCAGCAATCAGGCCCCCGTGGAAATGGTACTCCTC  
IMP1011-48        TTTTTTGGCCCGCAGTATTCTGATTACCCAGCAATCAGGCCCCCGTGGAAATGGTACTCCTC  
\*\*\*\*\*            \*\*\*\*\*        \*\*\*\*\*        \* \* \*            \*\*\*\*\*        \*\*\*\*\*        \*\*\*\*\*

PCVFK-15            AACTGCTGTGCCAGCTGTAGAAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTACTTTGCCAATTTTGGAA  
IMP999-ECO        AACTGCTGTGCCAGCTGTAGAAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTACTTTGCCAATTTTGGAA  
IMP1010-ST        AACTGCTGTGCCAGCTGTAGAAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTACTTTGCCAATTTTGGAA  
IMP1011-48        AACTGCTGTGCCAGCTGTAGAAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTACTTTGCCAATTTTGGAA  
IMP1011-48        AACTGCTGTGCCAGCTGTAGAAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTACTTTGCCAATTTTGGAA  
\*\*\*\*\*            \*\*\*\*\*        \*\*\*\*\*        \* \* \*            \*\*\*\*\*        \*\*\*\*\*        \*\*\*\*\*

PCVFK-15            GACTGCTGGAGAACAATCCACCGAGGTACCCGAAAGGCCGATTTGAAAGCAGTGGACCACC  
IMP999-ECO        GAATGCTACAGAACAATCCACCGAGGAA---GGGGCCAGTTCGTCAACCTTTCCCCCCC  
IMP1010-ST        GAATGCTACAGAACAATCCACCGAGGAA---GGGGCCAGTTCGTCAACCTTTCCCCCCC  
IMP1011-48        GAATGCTACAGAACAATCCACCGAGGAA---GGGGCCAGTTCGTCAACCTTTCCCCCCC  
IMP1011-48        GAATGCTACAGAACAATCCACCGAGGAA---GGGGCCAGTTCGTCAACCTTTCCCCCCC  
\* \*            \* \* \* \* \*        \* \* \* \* \*        \* \* \* \* \*        \* \* \* \* \*        \* \* \* \* \*

PCVFK-15            CTGTGCCCTTTTCCCATATAAATAAATAACTGAGTCTTTTTTGTATACATCGTAATG  
IMP999-ECO        ATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATAACTGAGTCTTTTT---TATCACTTCGTAATG  
IMP1010-ST        ATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATAACTGAGTCTTTTT---TATCACTTCGTAATG  
IMP1011-48        ATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATAACTGAGTCTTTTT---TATCACTTCGTAATG  
IMP1011-48        ATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATAACTGAGTCTTTTT---TATCACTTCGTAATG  
\* \*            \* \*            \* \* \* \* \*        \* \* \* \* \*        \* \* \* \* \*        \* \* \* \* \*



Figura N° 6

1 GAATTCAACC TTAACCTTTT TTATTCTGTA gTATTCAAAG GGTATAaAgA  
 51 TTTTGTGGT CCCCCCTCCC GGGGGAACAA AGTcgtCAAT ATDAAATCTC  
 101 ATCATGTCCA CCGCCAGGA GGGCGTCTG ACTGTGGTAg CCTTGACAgT  
 151 ATATCCGAAG GTGCGGAGA rGGGGTGTT GAAATGCCA TTTTTCCTTC  
 201 TCCAACGGTA GCGGTGGCG GGGTGGACmA sCCAcyGGCG GCGGCGAwG  
 251 ATCTGGCCAA GATGGCTGCG GGGGCGGTGT CTCTTCTGC GGTAAAGCCT  
 301 CCTTGGATAC GTCATAgCTG AAAACGAAAG AAGTGGCTG TAAGTATTAC  
 351 CAGCGCACTT CCGCAGCGC AGCACCTCG CAGCaCCTCA GCAGCAACAT  
 401 GCCCAGCAAG AAGATGGAA GAAGCGGACC CCAACCACAT AAAGGTGGG  
 451 TGTTCAAGCT GAATAATCCT TCCGAAGACG AGCGCAAGAA AATACGGGAG  
 501 CTCCCAtCT CCCTATTGA TTATTTIATT GTTGGCGAgG AGGGTwtGA  
 551 gGAAnGACgA ACACCTCACC TCCAGGGGT CGcLAATTTT GTGAAGAAGC  
 601 aaACTTtTAA TAAAGTGAAG TGGTATTGG GTGCCCCCTG CCACATCGAG  
 651 AAAGCCaAg GAAGTATCA GCAGATAAA CAATATTGCA GTAAAgaAGG  
 701 CAACTTACTT ATTGAATGTG GAGCTCCTCG ATCTCAAGGA CAACGGAGTG  
 751 ACCTGTCTAC TGCTGTGAGT ACCTTGTGG AGAGCGGGAG TCTGGTGACC  
 801 GTTCAGAGC AGCACCTGT AACGTTGTC AGAATTTC CCGGGCTGGC  
 851 TGAACTTTTG AAGTGAGCG GGAAATGCA GAAGCGTAT TGAAGACCA  
 901 ATGTACAGT CATTGTGGG CCACCTGGT GTGGTAAAG CAATGGGCT  
 951 GCTAATTTTG CAGACCCGA AACCACATAC TGGAAACCAC CTAGAAACAA  
 1001 GTGGTGGAT GGTACCAG GTGAAGAAGT GGTGTIATT GATGACTTTT  
 1051 ATGGCTGGCT GCGTGGGAT GATCTACTGA GACTGTGTGA TCGATATCCA  
 1101 TTGACTGTAG KACTAAAG TGGAACTGTA CIBNNNNGG CCGCAGTAT  
 1151 TCTGATTACC AGCAATCAGA CCCCCTGGG ATGGTACTCC TCAACTGCTG  
 1201 TCCCAGcGT AGAAGCTCTC TATCGGAGGA tLACTTCCTT GGTATTTtGG  
 1251 AAGAATGCTA CAGAACAATC CACGGAGGAA GGGGGCCAGT TnGTCACCCT

Figura N° 6 (continuación)

1301 TTCCCCCCA TCCCTGAAT TTCCATaTGA AATAAATAC TGAGTCITTT  
 1351 TTATCACTTC GTAATGGITT TTATTATCA TTAGGGITT AAGTGGGGG  
 1401 TCTTAAGAT TAAATCTCT GAATTGTACA TACATGGTA CACGGATAT  
 1451 GTAGTCTGG TCGTATAEAC TGTITTCGAA CCGAGTCCG AGGCCTACGT  
 1501 GGTCACATT TCTAGAGGT tGTAGCCTCA gCCAAAGCtG ATTCTITTTG  
 1551 TTATTGGTT GGAAGTAATC AATAGTGGAG TCAAGAACAG GTTTGGCTGT  
 1601 GAAGTAACC GAGTCTAGC AGAAGGTTG GGGATTGTA TGCCGGGAGG  
 1651 AGTAGTTAC ATATGGGICA TAGGTTAGGG CTGTGCCCTT TTTACAAAG  
 1701 TTATCATcTA GAATAACAGC AGTGGAGCCC ACTCCCTAT CACCCTGGGT  
 1751 GATGGGGGAG CAGGGCCA

Figura N° 7

8con.s = secuencia del clon pGEM-7/8  
 pcveco = secuencia de la cepa PCV PK/15

PUNTUACIONES Initl: 2517 Inittn: 3774 Opt: 4010  
 75,8% de identidad en 1785 pb de solapamiento

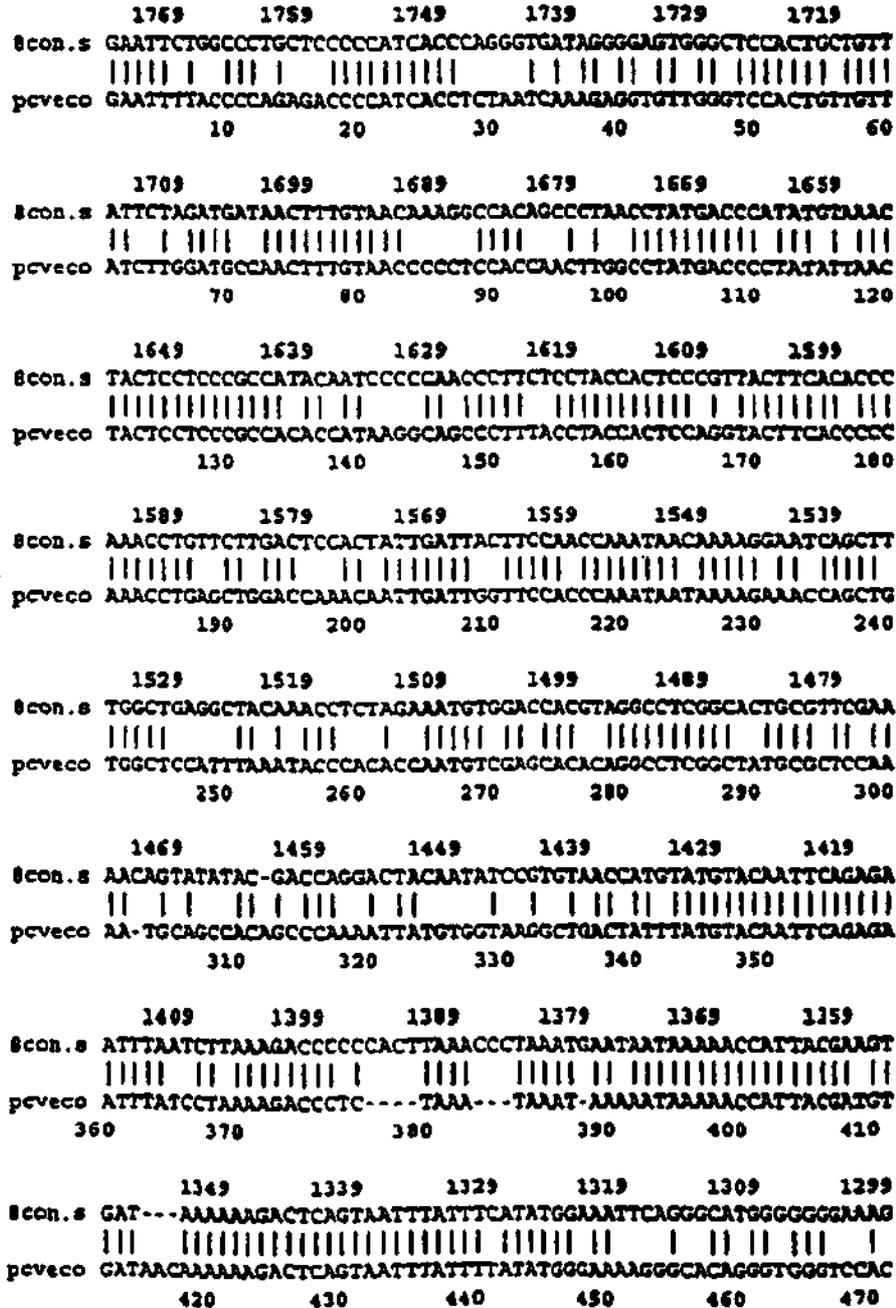


Figura N° 7 (continuación)

```

1289      1279      1269      1259      1249
8con.s  GGTGACAACTGGCCCC--TTCCTCCGTGGATGTTCTGTAGCATTCCTCCAAAATAC
      |  |::|  |||  |  | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
pcveco  TGCTTCAAATGGCCCTTCGGGTACTCCGTGGATGTTCTCCAGCAGTCTTCCAAAATG
      480      490      500      510      520      530

1239      1229      1219      1209      1199      1189
8con.s  CAAGGAAGTAATCCTCCGATAGAGAGCTTCTACAGCTGGGACAGCAGTTGAGGAGTACCA
      |||  |  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
pcveco  CAAAGTAGTAATCCTCCGATAGAGAGCTTCTACAGCTGGGACAGCAGTTGAGGAGTACCA
      540      550      560      570      580      590

1179      1169      1159      1149      1139      1129
8con.s  TTCCACCGGGGTCTGATTGCTGGTAATCAGAATACTGCGGGCCCGNNNNNGTACAGTTCC
      ||||  |||  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||
pcveco  TTCTGGGGGGCCTGATTGCTGGTAATCAAATACTGCGGGCCAAAANNGAACAGTACC
      600      610      620      630      640      650

1119      1109      1099      1089      1079      1069
8con.s  ACCTTTAGTCTCTACAGTCAAATGGATATCGATCACACAGTCTCAGTAGATCATCCCACGG
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||
pcveco  CCCTTTAGTCTCTACAGTCAAATGGATACCGGTCAACACAGTCTCAGTAGATCATCCCACGG
      660      670      680      690      700      710

1059      1049      1039      1029      1019      1009
8con.s  CAGCCAGCCATAAAAAGTCATCAATAACAACCACTTCTTCAGCATGGTAACCATCCCACCA
      |  ||||| ||||| |  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||
pcveco  TAACCAGCCATAAAAATCATCCAAAACAACTTCTTCTCCATGATATCCATCCCACCA
      720      730      740      750      760      770

999       989       979       969       959       949
8con.s  CTTGTTTCTAGGTGCTTCCAGTATGTGGTTTCCGGGTCTGCAAAATTAGCAGCCCATTT
      ||  ||||| ||  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
pcveco  CTTATTTCTACTAGGCTTCCAGTAGGTGTCCTTAGGCTCAGCAAAATTACGGGCCACTG
      780      790      800      810      820      830

939       929       919       909       899       889
8con.s  GCTTTTACCACACCCAGGTGGCCCCACAATGACGTGTACATTTGGTCTTCCAATCACGCTT
      |||  ||  ||||| ||  ||  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
pcveco  GCTCTTCCACAACCGGGCGGGCCCACTATGACGTGTACAGCTGTCTTCCAATCACGCTG
      840      850      860      870      880      890

879       869       859       849       839       829
8con.s  CTGCATTTCCCGCTCACTTTCAAAAGTTCAGCCAGCCCGGGAAATTTCTGACAAACGT
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||
pcveco  CTGCATCTTCCCGCTCACTTTCAAAAGTTCAGCCAGCCCGGGAAATTTCTCATAAGT
      900      910      920      930      940      950

819       809       799       789       779       769
8con.s  TACAGGGTGTGCTGCTCTGCAACGGTCAACAGACTCCCGCTCTCCAAACAGGTAICTACAGC
      ||||| ||  ||||| ||  ||||| ||  ||||| ||  ||||| ||  ||||| ||
pcveco  TACAGGCAACTGCTCGGCTACAGTCAACAAAGACCCCGCTCTCCAAAGGTAICTACAGC
      960      970      980      990      1000     1010

```



