

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 809**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2012 E 15174330 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2959916**

54 Título: **Nueva cepa del PRRSV europea**

30 Prioridad:

**17.02.2011 US 201161444074 P**

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

**05.12.2018**

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH  
(100.0%)  
Binger Strasse 173  
55216 Ingelheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**PESCH, STEFAN;  
BURGARD, KIM;  
OHLINGER, VOLKER;  
ORVEILLON, FRANCOIS-XAVIER;  
KROLL, JEREMY;  
LAYTON, SARAH;  
PIONTKOWSKI, MICHAEL DENNIS;  
ROOF, MICHAEL B.;  
UTLEY, PHILIP y  
VAUGHN, ERIC MARTIN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 692 809 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

Nueva cepa del PRRSV europea

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a una cepa atenuada viva de un virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) europeo, a métodos para la producción de tales cepas, a vacunas basadas en ellas y a métodos para la producción de tales vacunas y el uso de las mismas en el tratamiento de cerdos.

**Antecedentes de la invención**

10 El síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS) es considerado por muchos como la enfermedad más importante que actualmente afecta la industria del cerdo mundialmente. El síndrome se describió por primera vez en 1987 en los Estados Unidos como la "enfermedad misteriosa del cerdo" y rápidamente se propagó a lo largo del globo. Produce graves pérdidas de reproducción, está asociado al aumento de la mortalidad debido a infecciones secundarias y está ligada a una conversión de alimentos reducida y a un aumento de peso diario promedio. Desafortunadamente, ha demostrado ser difícil el control del virus que produce el PRRS.

15 El virus PRRS (PRRSV) es un virus de ARN monocatenario envuelto clasificado en la familia Arteriviridae (Cavanaugh, 1997). Produce una extendida enfermedad en el cerdo que se describió por primera vez como 'enfermedad misteriosa del cerdo' en EE.UU. en 1987 (Hill, 1990). La enfermedad se manifiesta como enfermedad respiratoria en todos los grupos de edad de cerdos que conduce a muerte en algunos cerdos jóvenes y a problemas reproductivos graves en hembras en edad de reproducción.

20 La transmisión del PRRSV puede producirse, y frecuentemente se produce, por contacto directo entre cerdos infectados y susceptibles. La transmisión también puede producirse a distancias muy cortas por aire o por semen. Una vez infectado, el virus puede permanecer en la sangre de adultos durante aproximadamente dos semanas, y en cerdos infectados durante uno a dos meses o más. Los verracos infectados puede emitir el virus en el semen durante más de 100 días. Este largo periodo de viremia aumenta significativamente la posibilidad de transmisión. Además, el virus PRRS puede atravesar la placenta durante el último tercio del periodo de gestación para infectar lechones en el útero y causar lechones nacidos muertos o nacidos débiles.

25 Todos los tipos y tamaños de piaras, que incluyen aquellas con alto estado de salud o estado de salud ordinario o de unidades tanto interiores como exteriores, pueden infectarse por el virus PRRS. Las piaras infectadas pueden experimentar grandes pérdidas de reproductividad, además de niveles elevados de neumonía después del destetamiento con escaso crecimiento. La fase reproductiva normalmente dura dos a tres meses; sin embargo, los problemas después del destetamiento frecuentemente se vuelven endémicos. La enfermedad reproductiva se caracteriza por un brote de abortos que afecta tanto a cerdas como a cerdas jóvenes en el último término de gestación. Los partos prematuros se producen aproximadamente a los 109 y 112 días de gestación. El número de lechones nacidos muertos y nacidos débiles aumenta y se produce un aumento considerable en la mortalidad antes del destetamiento.

35 La fase respiratoria tradicionalmente se ha observado en el criadero, especialmente en criaderos de flujo continuo. Sin embargo, los problemas respiratorios producidos por el virus PRRS también pueden verse en el cebador como parte del complejo respiratorio de enfermedad porcina (PRDC). Puede producirse una reducción en la velocidad de crecimiento, un aumento en el porcentaje de cerdos invendibles y un aumento de la mortalidad después del destetamiento. Los hallazgos de diagnóstico indican altos niveles de neumonía que se asocian al virus PRRS junto con una amplia variedad de otros agentes microbianos comúnmente considerados agentes infecciosos secundarios. Las cepas aisladas bacterianas pueden incluir *Streptococcus suis*, *Haemophilus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida*, entre otros. Los agentes víricos comúnmente implicados incluyen virus de la gripe porcina y coronavirus respiratorio porcino. Los cerdos afectados raramente responden a altos niveles de medicación, y los sistemas todo dentro/todo fuera han fracasado en controlar la enfermedad.

40 El virus PRRSV existe como dos genotipos denominados en lo sucesivo tipo "US" y "EU" que comparten aproximadamente 50% de homología de secuencias (Dea S y col. (2000). Arch Virol 145:659-88). Estos dos genotipos también pueden distinguirse por sus propiedades inmunológicas. La mayoría de la información de la secuenciación de diversas cepas aisladas se basa en las proteínas estructurales, concretamente la proteína de la envuelta GP5 que explica sólo aproximadamente 4% del genoma vírico, aunque se sabe poco de las proteínas no estructurales (nsp). Se han descrito el aislamiento del PRRSV y la preparación de vacunas en varias publicaciones (documentos WO 92/21375, WO 93/06211, WO93/03760, WO 93/07898, WO 96/36356, EP 0 676 467, EP 0 732 340, EP 0 835 930).

55 La vacunación es el método clave para aliviar la carga de PRRS ya que los cerdos que se recuperan de una infección del PRRS desarrollarán una respuesta inmunitaria que bajo circunstancias normales los protegerá de ser infectados de nuevo por la misma cepa del virus. Sin embargo, el virus PRRS tiene la capacidad de cambiar (por mutación o recombinación); y, por tanto, pueden producirse nuevas cepas víricas. En tales casos, la protección

cruzada entre cepas puede no existir, y pueden observarse nuevos brotes en granjas que habían sido infectadas previamente. Por tanto, existe una necesidad continua de vacunas adicionales.

**Breve resumen de la invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones de vacunas contra el PRRS vivas modificadas mejoradas de genotipo europeo y a composiciones que comprenden nuevas cepas del PRRSV que puedan usarse para la preparación de tales vacunas. En particular, la invención proporciona cepas del virus PRRS mejoradas que se han depositado en la Colección europea de cultivos celulares (ECACC) con los números de acceso ECACC 11012501 y ECACC 11012502, cada una depositada el 25 de enero de 2011 según las disposiciones del Tratado de Budapest, o cualquier descendiente o progenie de una de las cepas anteriormente mencionadas.

10 En realizaciones particulares, la presente invención describe una composición que comprende un virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) de un tipo europeo, que es de la cepa depositada en la Colección europea de cultivos celulares (ECACC) con el número de acceso ECACC 11012501 o el número de acceso ECACC 11012502.

15 El PRRSV se caracteriza porque el virus se atenúa pasándolo al menos 36 veces por cultivo celular de forma que cuando el virus modificado se administre a un cerdo u otro mamífero propenso al PRRSV fracase en producir signos clínicos de enfermedad por PRRSV, pero pueda inducir una respuesta inmunitaria que inmunice al mamífero contra formas patógenas del PRRSV.

20 También se contempla, en un aspecto de referencia, un método para la preparación del PRRSV atenuado vivo depositado en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) con el número de acceso ECACC 11012502 o una forma atenuada de una cepa parental depositada con el número de acceso ECACC 11012501 que comprende adaptar un PRRSV cultivado con MA 104 de un tipo europeo a células de mamífero no MA 104.

25 Otro aspecto de la invención contempla una composición de vacuna para la protección de cerdos contra la infección por PRRSV que comprende el PRRSV atenuado vivo depositado en la Colección europea de cultivos celulares (ECACC) con el número de acceso ECACC 11012502 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una vacuna tal puede comprender ventajosamente además uno o más patógenos atenuados o inactivados no PRRSV o material antigénico del mismo. Por ejemplo, los patógenos no PRRSV pueden seleccionarse de virus de la seudorrabia, virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible, *Escherichia coli*, *Erysipelas rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.virus PRRS

30 Se contempla que la composición de vacuna pueda comprender un vehículo que es adecuado para administración intradérmica o intramuscular. En algunas realizaciones, la vacuna está en forma liofilizada. En realizaciones específicas, la vacuna comprende al menos aproximadamente 10<sup>7</sup> partículas víricas.

35 También se contempla un método de inmunización de cerdos contra el síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS), método que comprende la etapa de administrar a un cerdo una composición de vacuna que incluye un virus vivo del síndrome reproductor y respiratorio porcino mezclado con un agente de vehículo farmacológicamente compatible, comprendiendo el virus el virus PRRSV 94881 pasado al menos 36 veces por cultivo celular para modificar el virus de forma que cuando el virus modificado se administre a un cerdo u otro mamífero propenso al PRRS fracase en producir signos clínicos de enfermedad de PRRS, pero pueda inducir una respuesta inmunitaria que inmunice al mamífero contra formas patógenas del PRRS.

40 En algunas realizaciones, el método se realiza, no presentando el cerdo lesiones pulmonares después de la vacunación. En otras realizaciones, el cerdo presenta menos lesiones pulmonares después de la vacunación con respecto a la vacunación con la vacuna Porcilis.virus PRRS

45 También se contempla virus PRRSuna composición que comprende una proteína que tiene la secuencia de SEQ ID NO:7 o las proteínas que tienen las secuenciasvirus PRRS SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9.

También se contempla un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de SEQ ID NO:24 o las secuencias de SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:25; y SEQ ID NO:26.

50 La invención se refiere además a un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el ORF de PRRSV de SEQ ID NO:7 operativamente unida a un promotor o los ORF de PRRSV de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, y SEQ ID NO:9operativamente unida a un promotor. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica dicho ORF es SEQ ID NO:24 o dicha secuencia de ácido nucleico que codifica dichos ORF comprende SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:25; y SEQ ID NO:26.

**Breve descripción de varias vistas de los dibujos**

- Figura 1A: Observación clínica de la puntuación de tos en el modelo de exposición respiratoria usando la cepa de exposición europea.
- 5 Figura 1B: Observación clínica de la puntuación clínica total en el modelo de exposición respiratoria usando una cepa de exposición europea.
- Figura 2: Mediciones de temperatura rectal en el modelo de exposición respiratoria usando una cepa de exposición europea.
- Figura 3: Mediciones del aumento de peso diario promedio en el modelo de exposición respiratoria usando una cepa de exposición europea.
- 10 Figura 4: Viremia del PRRS como se indica por PCR cuantitativa en el modelo de exposición respiratoria usando una cepa de exposición europea.
- Figura 5: Serología del PRRS como se indica por ELISA en el modelo de exposición respiratoria usando una cepa de exposición europea.
- 15 Figura 6: Examen macroscópico de lesiones pulmonares en el modelo de exposición respiratoria usando una cepa de exposición europea.
- Figura 7A-C: Mediciones de histopatología. La Figura 7A muestra lesiones pulmonares macroscópicas medias; la Figura 7B muestra la histopatología de animal de control; la Figura 7C muestra la histopatología de animales infectados por PRRS.
- 20 Figura 8: Muestra los resultados de PCR-RT en tiempo real que representan el % de viremia en animales vacunados con PRRSV 94881 EU PRRS 94881.
- Figura 9: Proceso simultáneo para la producción a gran escala de PRRSV 94881 EU PRRS 94881.

**Descripción detallada de la invención**

- 25 La presente invención proporciona métodos para tratar o reducir la gravedad de la infección por el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV), además de métodos para prevenir la infección por PRRSV. Generalmente, el método es para tratar o reducir la gravedad de o la incidencia de la infección por el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV). “Tratar o reducir la gravedad de o la incidencia de” se refiere a una reducción en la gravedad de los signos clínicos, síntomas y/o signos patológicos normalmente asociados a la infección, hasta e incluyendo la prevención de cualquier signo o síntoma tal. “Signos patológicos” se refiere a la prueba de infección que se encuentra microscópicamente o durante autopsia (por ejemplo, lesiones pulmonares).
- 30 El método generalmente incluye la etapa de administrar una cantidad terapéutica de un antígeno del PRRSV a un cerdo de una edad definida o intervalo de edad. Por ejemplo, en un aspecto de la invención, una cantidad terapéutica de un antígeno del PRRSV puede administrarse a un lechón de aproximadamente tres semanas de edad o más joven, y diferentes cantidades terapéuticas del antígeno pueden administrarse a un cerdo entre aproximadamente 3 semanas de edad y 4 semanas de edad. Similarmente, una cantidad terapéutica incluso diferente podría administrarse a un cerdo entre aproximadamente cuatro semanas y dieciséis semanas de edad (o cualquier edad dentro de este intervalo, por ejemplo, cinco semanas a seis semanas de edad, nueve semanas a quince semanas de edad, siete semanas a diez semanas de edad, etc.), o a cerdos de más de dieciséis semanas, tales como una cerda adulta.
- 35 En realizaciones específicas, la presente invención se refiere a una composición que comprende una cepa del PRRSV atípica atenuada y a vacunas vivas modificadas mejoradas correspondientes que confieren inmunidad eficaz a esta cepa del PRRSV típica recientemente descubierta. “Inmunidad eficaz” se refiere a la capacidad de una vacuna para prevenir infecciones por PRRSV en cerdos, que incluye infecciones por PRRSV atípicas, que producen signos clínicos sustanciales de la enfermedad. Debe entenderse que los cerdos inmunizados pueden o pueden no ser serológicamente positivos para PRRSV, pero los cerdos no presentan ningún síntoma clínico sustancial.
- 40 En formas preferidas, la composición de vacuna de la invención incluye un virus vivo del PRRS de tipo europeo vivo que se ha atenuado en virulencia. Se ha mostrado que el virus atenuado resultante es avirulento en estudios en animales huésped controlados expuestos y confiere inmunidad eficaz. Esta cepa particular de PRRS EU no es tan virulenta como otras y de ahí que sea una opción atractiva como candidato a vacuna. La cepa parental PRRSV 94881 no produce enfermedad de PRRS atípica grave en la cerda preñada ni lesiones pulmonares graves en cerdos jóvenes. Esta cepa se aisló inicialmente en Renania del Norte-Westfalia, Alemania, de un lechón de 3 semanas de edad con trastorno respiratorio grave. La cepa se atenuó posteriormente mediante pase continuo por células MA 104. La cepa atenuada fue depositada por Bioscreen GmbH, Mendelstrasse 11, 48149, Muenster, Alemania en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Gran Bretaña, el 25 de enero de 2011 y se le concedió el nº de acceso 11012502. Este virus atenuado es un virus de siembra maestro
- 50

(MSV) preferido que posteriormente se ha sometido a pases y se ha desarrollado como una vacuna eficaz contra el PRRSV. La cepa parental virulenta denominada 94881 también fue depositada según el Tratado de Budapest por Bioscreen GmbH, Mendelstrasse 11, 48149, Muenster, Alemania en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Gran Bretaña, el 25 de enero de 2011 y se le concedió el nº de acceso 11012501.

En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, la composición de vacuna contra el virus vivo modificado se probó a una dosificación de 1 ml para cerdos y 2 ml para cerdas por inyección intramuscular y se mostró que era eficaz en la producción de inmunidad protectora.

El pase del virus hasta la atenuación se llevó a cabo usando métodos de virología clásica. Específicamente, la cepa aislada parental PRRSV 94881 se atenuó *in vitro* mediante pases continuos por células MA 104 para lograr un pase máximo de 108 pases después del aislamiento inicial. Brevemente, el material se pasó aproximadamente 1 a 2 pases por semana durante un total de 108 pases en matraces T de 25 cm<sup>2</sup> o T de 75 cm<sup>2</sup>. Los cultivos de células MA 104 confluentes con aproximadamente 12 - 30 ml de medio esencial mínimo (MEM) complementado con 6% de suero bovino fetal (SBF) se inocularon con 100 a 300 µl del virus. Los cultivos se incubaron durante 3 - 7 días en una estufa de incubación de cámara humidificada a 37°C con 4 - 6% de CO<sub>2</sub>. Una vez los cultivos alcanzaron > 25% del efecto citopático (CPE), el matraz se recogió extrayendo el sobrenadante. Una parte del sobrenadante se pasó a un nuevo matraz y 2 ml de la cosecha se tomaron en alícuotas para el almacenamiento a -60°C a -80°C.

El experto usando técnicas convencionales en la materia podrá determinar la secuencia de ácidos nucleicos subyacentes del virus atenuado que se depositó en ECACC con el nº de acceso 11012502. La secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 es la secuencia de longitud completa del MSV PRRSV 94881 atenuado y tiene una secuencia de longitud completa de 14843 pb. Los ORF 1 a 7 se han anotado para esta secuencia del siguiente modo:

Número de ORF	CDS en SEQ ID NO:1	Proteína codificada
ORF1a	178 a 7227	SEQ ID NO:2
ORF1b	7209 a 11600	SEQ ID NO:3
ORF2	11611 a 12360	SEQ ID NO:4
ORF3	12219 a 13016	SEQ ID NO:5
ORF4	12761 a 13312	SEQ ID NO:6
ORF5	13309 a 13914	SEQ ID NO:7
ORF6	13902 a 14423	SEQ ID NO:8
ORF7	14413 a 14799	SEQ ID NO:9

La secuencia mostrada en SEQ ID NO:10 es la secuencia de longitud completa de la cepa PRRSV 94881 parental, pase 5, y tiene una secuencia de longitud completa de 14843 pb. Los ORF 1 a 7 se han anotado para esta secuencia del siguiente modo:

Número de ORF	CDS en SEQ ID NO:10	Proteína codificada
ORF1a	178 a 7227	SEQ ID NO:11
ORF1b	7209 a 11600	SEQ ID NO:12
ORF2	11611 a 12360	SEQ ID NO:13
ORF3	12219 a 13016	SEQ ID NO:14
ORF4	12761 a 13312	SEQ ID NO:15
ORF5	13309 a 13914	SEQ ID NO:16
ORF6	13902 a 14423	SEQ ID NO:17
ORF7	14413 a 14799	SEQ ID NO:18

Con el aislamiento de esta nueva cepa del virus PRRS europeo atenuado es posible producir vacunas contra el PRRS mejoradas que contienen una cepa del PRRS más reciente que refleja cepas del PRRS virulentas actualmente encontradas en el campo. En particular, el nuevo virus PRRS europeo atenuado puede usarse para preparar vacunas vivas modificadas (MLV). Una vacuna viva modificada se caracteriza porque contiene virus vivos que pueden replicarse en cerdos, pero no ejercen la enfermedad del PRRS clínica. Además, tras la administración induce una respuesta inmunológica en cerdos que generalmente conduce a un grado significativo de protección contra la posterior infección por el virus PRRS patógeno. El virus que muestra tales características se llama normalmente virus atenuado. Además, la presente invención proporciona detalles de las secuencias de los ORF de tanto las cepas parentales como las atenuadas del PRRSV 94881. Por tanto, se contempla que el experto pueda emplear las secuencias de uno cualquiera o más de los ORF mostrados en la presente memoria en una vacuna de subunidad.

Como se ha observado anteriormente, en general, la atenuación del virus puede generarse a partir de cepas aisladas de virus patógenos por pases repetidos por células huésped adecuadas que son permisibles al virus hasta

que el virus muestra las propiedades deseadas (documentos WO 92/21375, WO 93/06211, WO93/03760, WO 93/07898, WO 96/36356, EP 0 676 467, EP 0 732 340, EP 0 835 930). Alternativamente, puede generarse por remanipulación genética mediante el uso de un clon infeccioso, normalmente un transcrito de ADN complementario de longitud completa del genoma vírico (documentos WO 98/18933, EP 1 018 557, WO 03/062407, Nielsen y col., J Virol 2003, 77:3702-371 1). En una realización preferida, la presente invención se refiere a una composición que comprende virus PRRS atenuado del genotipo europeo 94481 que se atenúa a partir de un virus parental que se depositó en ECACC con el n° de acceso 11012501. Una composición preferida comprende el virus atenuado de la presente invención que se depositó en ECACC con el n° de acceso 11012502. virus PRRS Las cepas de la invención también pueden modificarse adicionalmente para conferir adicionalmente propiedades deseables a las mismas. Esto puede lograrse por propagación clásica y técnicas de selección como la propagación continuada en células huésped adecuadas para extender el fenotipo atenuado. Alternativamente, las cepas pueden modificarse genéticamente por mutación dirigida de la secuencia de ácidos nucleicos del genoma de estas cepas por técnicas de ingeniería genética adecuadas. El genoma del PRRSV se secuenció completamente o parcialmente (Conzelmann y col., 1993; Meulenber y col., 1993a, Murtaugh y col., 1995) y codifica, además de la ARN polimerasa dependiente de ARN (ORF 1a y 1b), seis proteínas estructurales de las que cuatro glucoproteínas de la envuelta se llamaron GP2 (ORF2), GP3 (ORF3), GP4 (ORF4) y GP5 (ORF5), una proteína M de la membrana no glicosilada (ORF6) y la proteína N de la nucleocápside (ORF7) (Meulenber y col. 1995, 1996; van Nieuwstadt y col., 1996). La caracterización inmunológica y la secuenciación de nucleótidos de las cepas del PRRSV europeo y US han identificado diferencias antigénicas menores dentro de las cepas del PRRSV localizadas en las proteínas víricas estructurales (Nelson y col., 1993; Wensvoort y col., 1992; Murtaugh y col., 1995). El MSV PRRSV 94881 de la presente invención se ha comparado con la cepa del virus de referencia europeo el virus de Lelystad (LV), que reveló homologías de nucleótidos que oscilan de 85,40 a 95,09 por ciento en los 8 genes víricos diferentes e identidades de aminoácidos de 86,39 a 97,27 por ciento entre ambas cepas de virus. Pudieron identificarse dos deleciones en el ORF 1a del MSV 94881 en comparación con LV. Por ejemplo, ORF1a del MSV 94881 tiene 85,40% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce una identidad de aminoácidos de 86,39%; ORF1b del MSV 94881 tiene 92,12% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce un identidad de aminoácidos de 97,27%; ORF2 del MSV 94881 tiene 91,07% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce un identidad de aminoácidos de 90,76%; ORF3 del MSV 94881 tiene 90,98% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce un identidad de aminoácidos de 89,43%; ORF4 del MSV 94881 tiene 90,58% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce un identidad de aminoácidos de 87,43%; ORF5 del MSV 94881 tiene 90,43% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce un identidad de aminoácidos de 88,56%; ORF6 del MSV 94881 tiene 95,02% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce un identidad de aminoácidos de 97,11%; ORF7 del MSV 94881 tiene 95,09% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce un identidad de aminoácidos de 92,97%. virus PRRS virus PRRS virus PRRS

Las técnicas recombinantes para preparar secuencias modificadas son muy conocidas para aquellos expertos en la materia y normalmente emplean la construcción de copias de ADN complementario de longitud completa (clones infecciosos) del genoma vírico que luego pueden modificarse por recombinación de ADN y métodos de manipulación (como mutagénesis dirigida a sitio, etc.). De esta forma puede modificarse, por ejemplo, sitios antigénicos o propiedades enzimáticas de proteínas víricas. En la bibliografía se ha informado de clones infecciosos de cepas del virus PRRS de genotipo europeo y norteamericano.

Las cepas del virus PRRS de la presente invención son adecuadas para vacunas de la invención, pueden cultivarse y recogerse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, propagándose en células huésped adecuadas como la línea celular simia MA-104, células Vero o macrófagos alveolares porcinos. El PRRSV crece preferencialmente en macrófagos alveolares de los pulmones (Wensvoort y col., 1991). También son susceptibles al virus algunas líneas celulares tales como CL2621 y otras líneas celulares clonadas de la línea celular de riñón de mono MA-104 (Benfield y col., 1992; Collins y col., 1992; Kim y col., 1993).

Preferentemente, las composiciones de vacunas según la presente invención comprenden una o más de estas cepas vivas en un vehículo adecuado, pero los virus inactivados también pueden usarse para preparar vacuna elaborada con microbios muertos (KV). Las composiciones MLV se formulan normalmente para permitir la administración de  $10^1$  a  $10^7$  partículas víricas por dosis, preferentemente  $10^3$  a  $10^5$  partículas por dosis, más preferentemente  $10^4$  a  $10^5$  partículas por dosis ( $4,0$ - $5,0 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>). Las composiciones KV puede formularse basándose en un título de pre-inactivación de  $10^3$  a  $10^{10}$  partículas víricas por dosis. Las composiciones puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una disolución salina fisiológica.

Los cerdos pueden infectarse por el PRRSV por una vía buconasal. El virus en los pulmones se recoge por macrófagos alveolares de los pulmones y en estas células la replicación del PRRSV se completa en el plazo de 9 horas. El PRRSV se desplaza de los pulmones a los ganglios linfáticos de los pulmones en el plazo de 12 horas y a los ganglios linfáticos periféricos, la médula ósea y el bazo en el plazo de 3 días. En estos sitios, solo algunas células se tiñen positivamente para el antígeno vírico. El virus está presente en la sangre durante al menos 21 días y frecuentemente mucho más. Después de 7 días, los anticuerpos para PRRSV se encuentran en la sangre. La presencia combinada de virus y anticuerpo en cerdos infectados con PRRS muestra que la infección por el virus puede persistir durante un largo tiempo, aunque a un bajo nivel, a pesar de la presencia del anticuerpo. Durante al menos 7 semanas, la población de células alveolares en los pulmones es diferente de pulmones de SPF normales.

- Una composición de vacuna según la presente invención puede presentarse en forma de una preparación liofilizada del virus vivo, para reconstituirse con un disolvente, para producir una disolución para inyección. El disolvente puede ser, por ejemplo, agua, solución salina fisiológica o tampón, o un disolvente con adyuvante. El disolvente puede contener adyuvantes. La composición de vacuna reconstituida puede entonces inyectarse a un cerdo, por ejemplo, como una inyección intramuscular o intradérmica en el cuello. Para inyección intramuscular puede aplicarse un volumen de 2 ml, para una inyección intradérmica es normalmente 0,2 ml. Por tanto, en otro aspecto, la presente invención es un producto de vacuna que comprende en recipientes separados una composición liofilizada del virus y un disolvente para reconstitución y que opcionalmente contiene adicionalmente un prospecto o etiqueta que comprende instrucciones de uso.
- Una composición de vacuna según la presente invención puede no sólo comprender la cepa anteriormente mencionada, sino que puede incluir adicionalmente componentes activos contra el PRRS u otras enfermedades víricas o bacterianas porcinas como el circovirus porcino o el virus de la fiebre porcina clásica. Por tanto, la invención se refiere además a una composición de vacuna como se ha descrito, caracterizada porque contiene al menos otro antígeno activo contra una enfermedad porcina que no es PRRS. Por ejemplo, tales otros antígenos pueden incluir *Mycoplasma hyopneumoniae*, PCV2, SIV, *H. parasuis*, *E. rhusiopathiae*, *S. suis*, *A. suis*, *Leptospira sp.* Parvovirus y similares. Además, la vacuna puede comprender ciertos adyuvantes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables. La invención proporciona nuevas composiciones de vacuna, en particular vacunas contra el virus PRRS que comprenden el PRRSV 94881 que comprenden además adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna de forma que se observe una mejor respuesta clínica/resultado con la administración de la combinación del adyuvante y la vacuna con respecto a la administración de la vacuna sola. Por ejemplo, las composiciones de vacuna de la invención pueden comprender una vacuna contra el virus PRRSV 94881 y un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en MCP-1,  $\alpha$ -tocoferol (por ejemplo, acetato de  $\alpha$ -tocoferol, una versión a modo de ejemplo que se comercializa como Diluvac Forte®), fracciones de *Haemophilus somnus*, carbopol y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la vacuna contra el virus que comprende la vacuna contra el virus PRRSV 94881 puede ser una vacuna de subunidad recombinante o alternativamente puede ser una vacuna contra el virus vivo atenuado. Una vacuna viva a modo de ejemplo que existe es la MLV del PRRS Ingelvac® y el PRRSV 94881 puede formularse de un modo similar a la MLV del PRRS Ingelvac®.
- Además de lo anterior, las composiciones de la invención pueden contener otros componentes, en tanto que los otros componentes no interfieran con los adyuvantes o la vacuna contra el virus subyacente. Tales otros componentes incluyen, por ejemplo, aglutinantes, colorantes, desecantes, antisépticos, agentes humectantes, estabilizadores, excipientes, adhesivos, plastificantes, agentes de pegajosidad, espesantes, materiales de parche, bases para pomada, eliminadores de queratina, sustancias básicas, promotores de la absorción, ácidos grasos, éster de ácido graso, alcoholes superiores, tensioactivos, agua y agentes de tampón. Otros componentes preferidos incluyen agentes de tampón, bases para pomada, ácidos grasos, antisépticos, sustancias básicas o tensioactivos.
- El contenido o la cantidad de los adyuvantes usados en la invención puede variar y puede determinarse considerando, por ejemplo, las propiedades de la vacuna contra el virus PRRS que se usa, y la forma de dosificación. El adyuvante puede comprender, por ejemplo, 1 al 100% en peso. Las composiciones basadas en el PRRSV 94881 de la invención se producen mezclando juntos el componente de adyuvante y el componente de la vacuna contra el virus, tanto solos como con diversos otros componentes. Las composiciones pueden ser de forma que la vacuna contra el virus y el adyuvante se presenten como una formulación o, alternativamente, el adyuvante y la vacuna se presenten en formulaciones distintas que pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente.
- Por tanto, el componente de adyuvante de las composiciones de la invención puede administrarse por separado de la vacuna contra el virus en la administración a organismos. Alternativamente, el adyuvante según la presente invención, junto con la vacuna contra el virus, pueden administrarse como una única composición de vacuna. La vacuna contra el virus puede ser cualquier vacuna contra el virus. Más realizaciones específicas contemplan el uso de una vacuna contra el virus PRRS que comprende el PRRSV 94881. Además, una vacuna tal puede combinarse con otras vacunas tales como la MLV del PRRS Ingelvac® y/o Porcilis®. Esto es simplemente una vacuna de combinación del virus PRRS a modo de ejemplo y fácilmente pueden prepararse otras combinaciones de vacuna tales.
- Las composiciones descritas en la presente memoria son particularmente ventajosas en la inducción de la producción de una respuesta de anticuerpo al virus PRRS. La administración de las vacunas producirá preferentemente una reducción de la gravedad de uno o más síntomas clínicos, tales como lesiones pulmonares, anorexia, decoloraciones de la piel, letargo, signos respiratorios, lechones momificados, tos, diarrea y combinaciones de los mismos, que están asociados a infección por PRRSV.
- Por tanto, las composiciones potencian particularmente el resultado clínico en un animal enfermo con respecto al resultado de la administración de la vacuna contra el virus PRRS sola. En realizaciones específicas, el resultado clínico potenciado es una reducción del porcentaje de lesiones pulmonares de al menos 50% cuando se compara con animales que no reciben la composición inmunogénica en combinación con dicho adyuvante. En otras realizaciones, el resultado clínico potenciado es una reducción de la viremia en animales de al menos 45% cuando se compara con animales que no reciben la composición inmunogénica en combinación con dicho adyuvante.

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a una composición de vacuna mejorada, más particularmente a una composición de vacuna contra el virus PRRS mejorada, en el que la mejora comprende mezclar con la vacuna contra el virus un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en MCP-1, fracciones de *Haemophilus somnus*, carbopol y combinaciones de los mismos. La composición de vacuna de la invención puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de vacuna de la invención pueden formularse mediante cualquier método conocido en la técnica de la formulación, por ejemplo, en preparaciones líquidas, suspensiones, pomadas, polvos, lociones, emulsiones W/O, emulsiones O/W, emulsiones, cremas, cataplasmas, parches y geles y se usa preferentemente como medicamentos. Por tanto, según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la composición de vacuna anterior. La composición de vacuna según la presente invención, cuando se administra dérmicamente, puede inducir significativamente la producción de anticuerpos. Por consiguiente, en otra realización preferida de la presente invención, la composición de vacuna puede proporcionarse como una preparación transdérmica.

Además, como se ha descrito anteriormente, el virus y el adyuvante en la presente invención pueden administrarse a un organismo juntos como una única composición de vacuna, o como una preparación de adyuvante separada y distinta del componente del virus PRRS antigénico de la vacuna, por lo que el adyuvante actúa de tal forma que la cantidad de un anticuerpo producida en el organismo en respuesta a la vacuna contra el virus PRRS puede disminuirse significativamente con respecto a la administración de la vacuna contra el virus PRRS sola.

Cuando se administran el adyuvante y la composición de vacuna contra el virus PRRS a un organismo, el resultado clínico del animal se potencia. La cantidad eficaz del adyuvante y la cantidad inmunológicamente eficaz de la composición de vacuna contra el virus PRRS pueden determinarse fácilmente por un experto en la materia considerando, por ejemplo, el tipo y las propiedades de la sustancia antigénica, las especies de organismos, edad, peso corporal, gravedad de las enfermedades, el tipo de enfermedades, el tiempo de administración y el método de administración, y adicionalmente usando la cantidad de un anticuerpo producido contra la sustancia antigénica en el organismo como índice.

La composición de vacuna contra el virus PRRS, el adyuvante, o combinaciones de los mismos, pueden administrarse a organismos por cualquier método adecuado seleccionado dependiendo, por ejemplo, de la afección de los animales y las propiedades de las enfermedades. Ejemplos de tales métodos incluyen administración intraperitoneal, administración dérmica, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intradérmica y parches, administración nasal, administración por vía oral, administración mucosa (por ejemplo, administración rectal, administración vaginal y administración corneal). Entre ellas se prefiere la administración intramuscular.

Una dosis terapéutica a modo de ejemplo de la MLV contra el PRRSV es aproximadamente dos mililitros (2 ml). Los expertos reconocerán que la cantidad de dosificación puede variarse basándose en la variedad, tamaño y otros factores físicos del sujeto individual, además de la formulación específica de la MLV contra el PRRSV y la vía de administración. Preferentemente, la MLV contra el PRRSV se administra en una dosis única; sin embargo, pueden ser útiles dosis adicionales. De nuevo, el experto reconocerá mediante la presente invención que la dosificación y el número de dosis está influido por la edad y la condición física del cerdo objetivo, además de otras consideraciones comunes a la industria y las condiciones específicas bajo las que se administra la MLV contra el PRRSV.

Las composiciones de vacunas basadas en los virus PRRS pueden usarse para vacunar tanto lechones como cerdas. En un aspecto de la invención, una pauta de dosis particular se selecciona basándose en la edad del cerdo y el antígeno seleccionado para administración. Esto permitirá que los cerdos de cualquier edad reciban la dosis más eficaz. En un método preferido, una cantidad terapéutica de la MLV del PRRSV 94881 se administra a un cerdo o lechón que tiene aproximadamente dos semanas de edad  $\pm$  5 días de edad. La cantidad seleccionada variará dependiendo de la edad del cerdo. Alternativamente, una cantidad terapéutica diferente de una MLV tal se administra a un cerdo o lechón que tiene más de aproximadamente 3 semanas, y esta cantidad también se cambiará a medida que el cerdo que recibe una administración tal envejece o se hace mayor. Por consiguiente, cerdos de aproximadamente cuatro semanas de edad, seis semanas de edad, ocho semanas de edad, diez semanas de edad, doce semanas de edad, catorce semanas de edad, dieciséis semanas de edad, una cerda joven, o una cerda recibirán todos diferentes cantidades. La dosis terapéutica que va a usarse se optimizará en el campo y normalmente se determina en estudios clínicos en los que se define una dosis de inmunización mínima basándose en la protección contra una exposición al PRRSV heterólogo virulento en cerdos susceptibles. Preferentemente, la MLV contra el PRRSV producida según los métodos descritos en la presente memoria se administra por administración intramuscular; sin embargo, pueden usarse otros métodos de administración tales como intradérmica, intranasal, intrarretiniana, oral, subcutánea y similares que son muy conocidos y usados en la técnica.

El experto reconocerá que los métodos de vacunación pueden implicar determinar el momento y la dosificación apropiada para la vacunación de un cerdo contra el PRRSV. Tales métodos comprenden generalmente las etapas de determinar al menos una variable seleccionada del grupo que consiste en edad, estado de salud, nivel de inmunidad innata y nivel de inmunidad activa, del cerdo y ajustar un nivel de dosificación estándar para explicar estas variables. Generalmente, el nivel de inmunidad innata y el nivel de inmunidad activa se determinarán con



referencia a un patrón que comprende los niveles promedio de una población de cerdos de edad y estado de salud similar. En un método particularmente preferido, todas las variables se consideran antes de determinar el nivel de dosificación óptimo y el momento de la administración.

- 5 En realizaciones preferidas, la presente invención también se refiere a ácidos nucleicos aislados que codifican marcos de lectura abiertos específicos del virus 94881 atenuado depositado con el nº de acceso de ECACC 11012502 y el virus 94881 virulento parental depositado con el nº de acceso de ECACC 11012501. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos completa del virus 94881 atenuado depositado con el nº de acceso de ECACC 11012502 tiene una secuencia de SEQ ID NO:1 que codifica las secuencias de proteínas de ORF1a, ORF1b, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9, respectivamente. La secuencia de nucleótidos completa del virus 94881 virulento parental depositado con el nº de acceso de ECACC 11012501 tiene una secuencia de SEQ ID NO:10 que codifica las secuencias de proteínas de ORF1a, ORF1b, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 de SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:18, respectivamente.
- 10
- 15 La composición de vacuna contra el PRRSV 94881 puede administrarse de cualquier forma convencional y en algunos métodos preferidos la administración es intramuscularmente. Se prefiere que la composición de vacuna contra el PRRSV administrada proporcione sus beneficios de tratamiento o reducción de la gravedad de o incidencia de la infección por el PRRSV después de una dosis única, como con Ingelvac®; sin embargo, si se seleccionan otros antígenos o vacunas de combinación o multivalentes, debe entenderse que pueden administrarse en su modo convencional, que puede incluir una o más dosis de refuerzo después de la administración inicial. Aquellos expertos en la materia podrán determinar niveles de dosificación apropiados basándose en la vacuna contra el PRRSV seleccionada y el intervalo de edad del animal al que se administrará el antígeno.
- 20

En ejemplos específicos presentados en la presente memoria más adelante, los cerdos y cerdas se expusieron a una nueva cepa derivada de europea del PRRSV que pudo producir reproduciblemente enfermedad respiratoria en lechones. Históricamente, las cepas del PRRSV derivadas de europea no habían podido reproducir enfermedad respiratoria en el modelo de lechón y de ahí que los modelos de exposición respiratoria se basaran en la infección por cepas no europeas. Debido a la alta diversidad genética hay una demanda en Europa de una nueva vacuna basada en una cepa europea. En ejemplos adicionales, los animales se expusieron a una cepa que produjo fracaso reproductivo en modelos de exposición de cerdas jóvenes/cerdas. Se ha encontrado que la eficacia de las vacunas MLV basadas en el virus 94881 atenuado depositado con el nº de acceso de ECACC 11012502 o cualquier virus preparado a partir de esta cepa o de la cepa parental depositada con el nº de acceso de ECACC 11012501 puede mostrarse usando una variedad de modelos de exposición debido a que esta cepa también es eficaz en otros modelos de insuficiencia respiratoria o fracaso reproductivo inducido por el virus PRRS.

25

30

### Ejemplos

35 Ejemplo 1: Descripción del modelo de exposición respiratoria al PRRSV

Como se ha observado anteriormente, históricamente, las cepas del PRRSV derivadas de EU no podían reproducir enfermedad respiratoria en el modelo de lechón. Debido a la alta diversidad genética, en Europa existe una demanda de una nueva vacuna basada en una cepa europea y es necesario un buen modelo de exposición respiratoria reproducible utilizando una cepa del PRRSV derivada de europea virulenta para la conducción de los estudios. En el siguiente ejemplo, los inventores muestran que la exposición de cerdos a la cepa de exposición europea de pase bajo (pase 4) produjo fidedignamente síntomas respiratorios.

40

En este estudio se usaron 3 grupos con 12 animales, 3 semanas de edad en la asignación y aprox. 10 semanas de edad en la exposición:

Grupo 1: Grupo de control

45 Grupo 2: Grupo de exposición (SD 35)

Grupo 3: Vacunado con el PRRSV Porcilis® (SD 0) y luego expuesto (SD 35).

El estudio se realizó durante un periodo de 56 días. La autopsia de 6 animales de cada grupo se midió 10 días después de la exposición; la autopsia de los animales restantes 21 días después de la exposición. Los parámetros investigados diariamente incluyeron: temperatura rectal, signos respiratorios y otros signos clínicos. Otros parámetros investigados incluyeron: peso corporal, mortalidad, viremia, seroconversión, examen patológico e histológico de los pulmones.

50

En el día de estudio -7, los grupos de cerdos se asignaron a cada grupo. En el día de estudio 0, el Grupo 3 se vacunó con el PRRSV Porcilis®. En el día de estudio 35, el Grupo 2 y el Grupo 3 se expusieron a una cepa de exposición europea. En el día 45, 6 animales de cada grupo se sacrificaron. El resto de los animales se sacrificó el día 56.

55

La Figura 1A muestra las mediciones de tos como una puntuación media por animal y semana. Se observó que hubo un aumento en la tos después de la exposición en tanto el grupo de exposición sola (Grupo 2) como el grupo de Porcilis (Grupo 3). La Figura 1B muestra la puntuación clínica total que se tomó de disnea, tos, rinorrea o legaña y comportamiento. Estos datos mostraron que hubo un aumento global en la puntuación clínica total después de la exposición en el grupo de exposición y de Porcilis. La temperatura rectal de los animales se monitorizó antes y después de la exposición y muestra que hubo un aumento de la temperatura rectal en el grupo de exposición y de Porcilis después de la exposición (SD > 35, grupo 1-2  $p \leq 0,001$ ; grupo 1-3  $p \leq 0,001$ ) (Figura 2).

La medición del peso diario promedio (Figura 3) mostró que después de la exposición hasta la primera y hasta la segunda autopsia el ADW fue significativamente menos en el grupo de exposición (SD 35-44  $p \leq 0,001$  y SD 35-56  $p \leq 0,01$ ) y en el grupo vacunado con Porcilis (SD 35-44  $p \leq 0,05$  y SD 35-56  $p \leq 0,05$ ).

La viremia se monitorizó usando PCR (Figura 4) y ensayos de ELISA (Figura 5). La PCR mostró que en el Grupo 1: todos los animales del grupo de control siguieron siendo negativos. En el Grupo 2: todos los animales fueron positivos para PRRSV después de la exposición; en el Grupo 3: todos los animales fueron positivos para PRRSV después de la vacunación. Los ELISA revelaron: que en el Grupo 1: todos los animales siguieron siendo negativos; en el Grupo 2: todos los animales fueron positivos para PRRSV AB después de la exposición; en el grupo 3: todos los animales fueron positivos para PRRSV AB después de la vacunación.

También se realizó el examen macroscópico de los pulmones (Figura 6) en el que los pulmones se evaluaron para áreas manchadas de color tostado y áreas de consolidación: en comparación con el grupo de control pudieron observarse cambios macroscópicos significativos en el grupo de exposición y de Porcilis (Grupo 1-2  $p \leq 0,001$ ; Grupo 1-3  $p \leq 0,05$ ). En el examen histopatológico, los datos también mostraron la eficacia de la vacunación (Figura 7A a 7C). La puntuación de lesión pulmonar media fue significativamente mayor en el grupo de exposición y de Porcilis en comparación con el grupo de control (Grupo 1-2  $p \leq 0,001$ ; Grupo 1-3  $p \leq 0,001$ ). Las lesiones microscópicas fueron más fuertes 10 días después de la infección.

En resumen, la tos, las puntuaciones clínicas totales y las temperaturas rectales aumentaron después de la exposición en los controles de exposición y los grupos vacunados con Porcilis. El peso corporal fue significativamente ( $p < 0,05$ ) menos en los controles de exposición y el grupo de Porcilis en comparación con el grupo de control negativo. Todos los animales del grupo de Porcilis fueron positivos para el virus PRRS y los anticuerpos después de la vacunación. Todos los animales de los controles de exposición fueron positivos para el virus PRRS y los anticuerpos después de la exposición. Los análisis macroscópicos e histológicos de los pulmones mostraron graves lesiones pulmonares macroscópicas y microscópicas en los controles de exposición y el grupo de Porcilis en comparación con el grupo de control negativo.

Por tanto, este estudio confirmó que la cepa de exposición europea usada no induce enfermedad significativa ( $p < 0,05$ ) cuando se compara con el grupo de control negativo: fiebre, tos, disminución del peso y lesiones pulmonares macroscópicas y microscópicas graves.

Además, la cepa de exposición europea ha demostrado satisfactoriamente enfermedad respiratoria específica para el PRRSV consistente y reproducible en el modelo de exposición de cerdo y, por tanto, es adecuada para su uso como un virus de exposición en futuros estudios de eficacia. Porcilis PRRS muestra una falta de eficiencia contra la cepa de exposición europea dentro de los parámetros de este estudio.

Ejemplo 2: Evaluación de la dosis de inmunización mínima del virus PRRS atenuado 94881 en lechones de 2 semanas de edad susceptibles tras la exposición a la cepa aislada del PRRS europea heteróloga.

Se realizó un estudio de exposición a vacunación para evaluar la dosis de inmunización mínima (MID) de la cepa aislada 94881 derivada de europea de la vacuna del síndrome reproductor y respiratorio porcino, virus vivo modificado (MLV contra el 94881 del PRRS), a tres niveles de títulos diferentes, administrada a lechones susceptibles a síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS), que tenían aproximadamente 14 días de edad, para proporcionar una reducción relevante en lesiones pulmonares tras la exposición a una cepa aislada europea heteróloga del PRRS. Quince lechones se incluyeron en cada grupo vacunado (Grupos 1-3), además de en el grupo de control de exposición (Grupo 4). Diez lechones se incluyeron en el grupo de control negativo (Grupo 5).

Los grupos de vacunas y los grupos de control de exposición se monitorizaron para varios parámetros que incluían: viremia después de la exposición, evaluaciones clínicas después de la vacunación, serología del PRRS, viremia después de la vacunación, observaciones clínicas después de la exposición, aumento de peso diario promedio (ADWG), temperaturas rectales y detección del virus PRRS en los pulmones. Un grupo de control negativo (Grupo 5), que no se expuso, también se incluyó en el estudio para fines de validación del estudio demostrando que la bioseguridad no se infringió durante la duración del estudio.

Los grupos de control de exposición y de control negativo fueron negativos para PRRS hasta el día de exposición (D28) y el grupo de control negativo siguió siendo negativo para PRRS para el resto del estudio (D38), validándose así el estudio.

La exposición fue 4 semanas después de la vacunación. En este momento, sólo 2 animales en el grupo de vacunas

de título bajo, 1 animal en el grupo de vacunas de título medio y 3 animales en el grupo de vacunas de título alto fueron positivos por qPCR para PRRS en suero.

El grupo de control de exposición presentó lesiones pulmonares significativas típicas del PRRS después de la exposición. Después de la exposición, los grupos de vacunas de títulos bajo, medio y alto tuvieron medianas de las puntuaciones de lesión pulmonar totales de 0,13%, 0,55% y 0,40%, respectivamente; mientras que el grupo de control de exposición tuvo una mediana de la puntuación de lesión pulmonar total de 33,40%. Las medianas de las puntuaciones de lesión pulmonar totales para los tres grupos de títulos de vacunas fueron significativamente inferiores a las del grupo de control de exposición ( $p < 0,0001$ ). No hubo diferencias estadísticas entre los grupos de títulos de vacunas ( $p \geq 0,1484$ ) para las puntuaciones de lesión pulmonar total. El grupo de control negativo tuvo una mediana de la puntuación de lesión pulmonar total de 0,00%.

En los días de estudio 31, 35 y 38 del periodo después de la exposición, los tres grupos de títulos de vacunas tuvieron significativamente menos viremia que el grupo de control de exposición ( $p \leq 0,0093$ ). No hubo diferencias estadísticas entre los grupos de títulos de vacunas para viremia después de la exposición, excepto en D35, cuando el grupo de vacunas de título alto presentó significativamente menos viremia que el grupo de vacunas de título medio ( $p = 0,0442$ ). Los lechones de control negativo fueron negativos para viremia en D31, D35 y D38.

Clínicamente, la gravedad ( $p \leq 0,0082$ ) y la frecuencia ( $p \leq 0,0268$ ) de la tos fue menos grave en los tres grupos de títulos de vacunas que en el grupo de control de exposición durante el periodo después de la exposición; Día 29 - Día 38. La fiebre fue más importante en el grupo de control de exposición que en los tres grupos de títulos de vacunas después de la exposición. El ADWG fue significativamente mayor para los tres grupos de títulos de vacunas en comparación con el grupo de control de exposición ( $p \leq 0,0027$ ).

La MID de la MLV contra el PRRSV 94881 como se determina en este estudio está asociada al nivel de vacunas de título bajo de  $1 \times 10^{2,77}$  TCID<sub>50</sub>/ml basándose en una reducción relevante en lesiones pulmonares macroscópicas para los tres niveles de títulos en comparación con los controles de exposición después de recibir una exposición del PRRS derivado europeo heterólogo virulento. Cuando se examinaron parámetros secundarios, los tres niveles de títulos de vacuna se asociaron a eficacia y no fueron evidentes claras distinciones entre los grupos de títulos.

Diseño general del estudio:

Fue un estudio de diseño aleatorizado ciego realizado en 70 lechones destetados susceptibles al PRRS, 14-16 días de edad en Día 0 (D0). En la siguiente Tabla 2.1 se muestra una descripción de los grupos de tratamiento:

Tabla 2.1 Grupos de tratamiento

Grupo	Nº de animales en D0	Tratamiento en Día 0
1	15	IVP nº 1 (título medio de $1 \times 10^{2,77}$ de MLV contra el 94881 del PRRS)
2	15	IVP nº 2 (título medio de $1 \times 10^{4,42}$ de MLV contra el 94881 del PRRS)
3	15	IVP nº 3 (título medio de $1 \times 10^{5,84}$ de MLV contra el 94881 del PRRS)
4	15	CP (placebo del mismo producto sin MLV contra el 94881 del PRRS)
5	10	CP (placebo del mismo producto sin MLV contra el 94881 del PRRS)

Ochenta y tres lechones cumplieron los criterios de inclusión del estudio, de los que los 70 primeros números numéricos fueron asignados aleatoriamente a uno de cinco grupos en D-3 por un bioestadístico. Los lechones se asignaron 15 por grupo a los Grupos 1-4 y diez lechones al Grupo 5. Los 83 lechones fueron seronegativos para PRRS.

Los lechones se observaron de D-1 a D26 para evaluaciones clínicas después de la vacunación y las observaciones se registrarán en el cuaderno de recogida de datos de las evaluaciones clínicas.

Serología: Se recogió sangre venosa completa de lechones en D0, D7, D14, D21, D28. Se registraron las recogidas de muestras. Las muestras de sangre se centrifugaron y el suero se recogió de cada tubo, se fraccionó y se transfirió a tubos apropiadamente etiquetados. Un conjunto de muestras de suero se mantuvo a 2-8°C y el otro conjunto de muestras de suero se mantuvo a  $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ . El conjunto de muestras de suero recogido en los días 0, 7, 14, 21, 28 y 38 y mantenido a 2-8°C se probó para anticuerpos del PRRS. Los resultados se informaron como negativos (relación S/P de ELISA de  $< 0,4$ ) o positivos (relación S/P de ELISA de  $\geq 0,4$ ).

Viremia del PRRS: El conjunto de muestras de suero recogido en los días 0, 7, 14, 21, 28, 31, 35 y 38 y mantenido a  $-70 \pm 10^\circ\text{C}$  se probó para ARN del PRRSV por qPCR (Apéndice 1, Anexo 7). Los resultados se informaron como n.d. (no detectado), positivo (detectado el PRRSV EU, pero no cuantificable, GE/ml (equivalente de genoma) =  $< 3,3$  log) o un valor informado (log GE/ml). Para fines estadísticos, a "no detectado" se le asignó un valor de 0 log GE/ml y a un valor "positivo" se le asignó un valor de 3,0 log GE/ml.

Aumento de peso diario promedio (ADWG): Cada cerdo se pesó en una báscula calibrada y se registraron los pesos corporales individuales. El aumento diario promedio se determinó de D0 a D28 y de D28 a D38.

5 Observaciones clínicas después de la exposición: Los lechones fueron observados por el investigador del estudio o representantes para signos clínicos de enfermedad de D27 a D38 y se registraron en el cuaderno de recogida de datos de las observaciones clínicas. Las observaciones incluyeron respiración, comportamiento y tos basándose en el sistema de puntuación de observaciones clínicas que se muestra a continuación en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Sistema de puntuación de observaciones clínicas

Puntuación de respiración	Puntuación de comportamiento	Puntuación de tos
0 = respiración normal	0 = normal	0 = sin tos
1 = respiración jadeante/rápida	1 = letargo de leve a moderado	1 = tos suave o intermitente
2 = disnea	2 = gravemente letárgico o recostado	2 = tos áspera o grave, repetitiva
3 = muerto	3 = muerto	3 = muerto

10 Una puntuación de observación clínica total diaria para cada lechón se determinó por la suma de sus puntuaciones de respiración diaria, comportamiento y tos.

Las temperaturas rectales se recogieron de D27 a D38.

15 Puntuación de lesión pulmonar total: Se les hizo la autopsia a todos los lechones que murieron antes de D38 y los lechones restantes que se sacrificaron en D38. Cada conjunto de pulmones se examinó para cualquier patología pulmonar macroscópica y la determinación del % de patología para cada lóbulo del pulmón. Si se observara patología de otros órganos, éstas también se describirían y se anotarían.

20 qPCR de pulmón para PRRSV: Para cada conjunto de pulmones se retuvieron dos muestras de los lóbulos apicales izquierdo y derecho, los lóbulos cardíacos izquierdo y derecho, los lóbulos diafragmáticos izquierdo y derecho y el lóbulo intermedio. Para un conjunto de muestras de pulmón, las tres muestras del lado izquierdo se combinaron en un recipiente; mientras que las tres muestras del lado derecho y la muestra del lóbulo intermedio del pulmón se combinaron en otro recipiente. Cada recipiente se llenó con una cantidad suficiente de 10% de disolución de formalina. Para el otro conjunto de muestras de pulmón, las tres muestras de pulmón del lado izquierdo se combinaron en un Whirlpak®; mientras que las tres muestras del lado derecho y la muestra del lóbulo intermedio del pulmón se combinaron en otro Whirlpak®.

25 Las muestras de tejido de pulmón congeladas se mantuvieron a  $-70 \pm 10^{\circ}\text{C}$  hasta el posterior análisis. Para cada lechón, todas las muestras del pulmón izquierdo se homogeneizaron y se probaron como una única muestra combinada; y todos los tejidos del pulmón derecho y la muestra del lóbulo intermedio del pulmón se homogeneizaron y se probaron como una única muestra combinada. Los resultados se informaron como n.d. (no detectado), positivo (detectado PRRSV EU, pero no cuantificable, GE/ml (equivalente de genoma) =  $< 3,3 \log$ ) o un valor de prueba (log GE/ml) para muestras del pulmón izquierdo y derecho. Para fines de análisis para cada lechón se anotaron la media de los resultados de qPCR de las muestras del pulmón izquierdo y derecho. Para fines estadísticos, a "no detectado" se le asignó un valor de 0 log GE/ml y a un valor "positivo" se le asignó un valor de 3,0 log GE/ml.

#### Resultados

35 Puntuación de lesión pulmonar total después de la exposición: Un resumen de grupo mínimo, máximo, mediana, intervalo de confianza de 95%, rango de Q y media para las puntuaciones de lesión pulmonar totales mostró que los grupos de vacunas de títulos bajo, medio y alto tuvieron medianas de las puntuaciones de lesión pulmonar totales de 0,13%, 0,55% y 0,40%, respectivamente; mientras que el grupo de control de exposición tuvo una mediana de la puntuación de lesión pulmonar total de 33,40%. Las medianas de las puntuaciones de lesión pulmonar totales para los tres grupos de títulos de vacunas fueron significativamente inferiores a las del grupo de control de exposición ( $p < 0,0001$ ). No hubo diferencias estadísticas entre los grupos de títulos de vacunas ( $p \geq 0,1484$ ) para las puntuaciones de lesión pulmonar total. El grupo de control negativo tuvo una mediana de la puntuación de lesión pulmonar total de 0,00%.

45 Para uno de los animales (grupo de vacunas de título alto) se observó neumonía intersticial supurativa histológicamente leve con pleuritis fibrinopurulenta copiosa. Las vías respiratorias y los alveolos fueron relativamente comunes, excepto los neutrófilos dispersos. El tejido de pulmón fue negativo por IHC para antígenos de *M. hyo*, PCV2, PRRSV y VIS. Las lesiones pulmonares estuvieron de acuerdo con serositis generalmente asociada a agentes bacterianos (Apéndice 12; acceso 2009030254). Se aislaron varios cultivos bacterianos puros del tejido de pulmón y se identificaron como *Bordetella bronchiseptica* y un *Staphylococcus* negativo para coagulasa. Aunque se aislaron dos tipos de bacteria de tejidos de pulmón, este lechón no se eliminó de los análisis de puntuación de lesión pulmonar total del Grupo 3.

50 Dos de 10 lechones de control negativo presentaron lesiones pulmonares de muy poca importancia ( $n^{\circ}$  1767, 0,55%;

nº 1789, 0,61%). Estas lesiones se consideraron insignificativas y no indicativas de PRRS. Dos de 10 lechones de control negativo presentaron lesiones pulmonares de muy poca importancia (nº 1767, 0,55%; nº 1789, 0,61%). Estas lesiones se consideraron insignificativas y no indicativas de PRRS.

5 Viremia del PRRS después de la exposición: Los resultados individuales de viremia del PRRS después de la exposición (D31-D38) se tabularon y se encontró que todos los lechones fueron virémicos después de la exposición en los tres grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición. En los tres momentos de tiempo después de la exposición, los tres grupos de títulos de vacunas tuvieron significativamente menos viremia que el grupo de control de exposición ( $p \leq 0,0093$ ). No hubo diferencias entre los grupos de títulos de vacunas para viremia después de la exposición, excepto en D35, cuando el grupo de vacunas de título alto presentó una viremia media inferior a la del grupo de vacunas de título medio ( $p=0,0442$ ). Los lechones de control negativo fueron negativos para viremia en D31, D35 y D38. El área bajo la curva (ABC) representa tanto la cantidad como la duración de la carga vírica y es una buena herramienta de evaluación para examinar la viremia. También se detectaron diferencias significativas entre los tres grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición con respecto al ABC en tanto D28 como en D38 ( $p \leq 0,0162$ ) y D31 a D38 ( $p < 0,0001$ ). No se detectaron diferencias entre los grupos de títulos de vacunas con respecto al ABC ( $p \geq 0,3669$ ) en ambos intervalos de tiempo.

La frecuencia por grupo de lechones positivos virémicos también se resumió para D31 a D28 y se muestra en la Tabla 2.3. Como todos los lechones de control de vacuna y de exposición fueron positivos para viremia después de la exposición, la frecuencia de lechones positivos para viremia fue de 100% para cada grupo en cada momento de tiempo. De ahí que no se realizan análisis de la frecuencia después de la exposición para viremia.

20 Tabla 2.3 Resumen de la frecuencia por grupo de lechones positivos virémicos – D31 a D38

Día de estudio	Grupo*	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Nº total
31	1	14	100	76,8	100,0	14
	2	15	100	78,2	100,0	15
	3	15	100	78,2	100,0	15
	4	14	100	76,8	100,0	14
	5	0	0	0,0	30,8	10
35	1	14	100	76,8	100,0	14
	2	15	100	78,2	100,0	15
	3	15	100	78,2	100,0	15
	4	14	100	76,8	100,0	14
	5	0	0	0,0	30,8	10
38	1	14	100	76,8	100,0	14
	2	15	100	78,2	100,0	15
	3	15	100	78,2	100,0	15
	4	14	100	76,8	100,0	14
	5	0	0	0,0	30,8	10

\* Grupo 1 = MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 2 = MLV contra el PRRSV 94881 de título medio; Grupo 3 = MLV del PRRS de título alto; Grupo 4 = grupo de control de exposición; Grupo 5 = grupo de control negativo

25 Resultados de qPCR de pulmón: Los resultados individuales del aislamiento del virus de los pulmones después de la exposición se resumieron como la frecuencia de los resultados de la prueba de muestras de pulmón positivas para qPCR (valores de p) para diferencias entre grupos. Tejidos de pulmón de lechones en los tres grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición fueron positivos por qPCR para PRRSV después de la exposición. No hubo diferencias significativas detectadas entre los grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición ( $p=1,0000$ ). Como todos los lechones de títulos de vacunas fueron positivos por qPCR para PRRSV, no se realizaron pruebas entre los grupos de títulos de vacunas.

30 Aunque no se detectaron diferencias entre los grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición para la frecuencia de tejidos de pulmón positivos por qPCR, las diferencias fueron evidentes para la carga vírica en tejidos de pulmón. De hecho, los grupos de vacunas de títulos bajo, medio y alto tuvieron una mediana de los valores de qPCR de pulmón de 6,88, 6,80 y 6,81  $\log_{10}$  GE/ml, respectivamente; mientras que el grupo de control de exposición tuvo una mediana del valor de qPCR de pulmón de 8,13  $\log_{10}$  GE/ml. Las diferencias entre los grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición fueron significativas ( $p \leq 0,0001$ ). En cambio, no se detectaron diferencias entre los grupos de títulos de vacunas para las medianas de valores de qPCR de pulmón ( $p \geq 0,7379$ ).

Puntuaciones de observaciones clínicas después de la exposición: La respiración y el comportamiento anormal no fueron graves después de la exposición, como se demuestra por las medianas de puntuaciones clínicas máximas de

0 (una puntuación de 0 representó respiración normal o comportamiento normal) para los cinco grupos. Además, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición para tanto la respiración como el comportamiento anormal ( $p \geq 0,0996$ ).

5 Se observó tos en los tres grupos de títulos de vacunas y el control de exposición, pero fue más grave en el grupo de control de exposición. Para los tres grupos de títulos de vacunas, cada grupo tuvo una puntuación de tos máxima de 1, que representó tos suave o intermitente y la mediana de la puntuación de tos máxima de 0. En cambio, el grupo de control de exposición tuvo una puntuación de tos máxima de 2, que representó tos áspera o grave, repetitiva, y una mediana de la puntuación de tos máxima de 1. Los tres grupos de títulos de vacunas tuvieron significativamente menos tos grave que el grupo de control de exposición ( $p \leq 0,0082$ ). No se observó tos en el grupo de control negativo.

10 Los tres grupos de títulos de vacunas tuvieron puntuaciones totales máximas de 1 y medianas de puntuaciones máximas de cero. En cambio, el grupo de control de exposición tuvo una puntuación total máxima de 4 y una mediana de la puntuación máxima de 1. Los tres grupos de vacunas tuvieron significativamente menores puntuaciones clínicas totales máximas que el grupo de control de exposición ( $p \leq 0,0047$ ). De nuevo, el grupo de control negativo tuvo una puntuación clínica total máxima de cero y una mediana de la puntuación clínica total máxima de cero.

15 La frecuencia de la respiración o el comportamiento anormal durante al menos un día de D29 a D38 fue baja para todos los grupos. De hecho, no se observó respiración anormal en grupos de vacunas de títulos bajo y medio de D29 a D38. El grupo de vacunas de título alto tuvo uno de 15 (7%) lechones y el grupo de control de exposición tuvo 3 de 14 (21%) lechones con respiración anormal. No se observó comportamiento anormal en ningún grupo de títulos de vacunas; mientras que 2 de 14 (14%) lechones del control de exposición mostraron comportamiento anormal durante al menos un día después de la exposición. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición para la frecuencia de respiración o comportamiento anormal durante al menos un día después de la exposición ( $p \geq 0,0996$ ). No se observó respiración o comportamiento anormal en el grupo de control negativo.

20 La frecuencia de tos fue mucho mayor en el control de exposición que en los tres grupos de títulos de vacunas. De hecho, la frecuencia de tos durante al menos un día después de la exposición fue de 14%, 13% y 27% para los grupos de vacunas de títulos bajo, medio y alto, respectivamente. En cambio, la frecuencia de tos durante al menos un día después de la exposición para el grupo de control de exposición fue de 71%. Los tres grupos de títulos de vacunas tuvieron significativamente menos frecuencia de tos que el grupo de control de exposición ( $p \leq 0,0268$ ).

25 La frecuencia de cualquier signo clínico después de la exposición, como se representa por una puntuación clínica total  $> 0$ , fue superior en el grupo de control de exposición que en los tres grupos de títulos de vacunas. Similar a la frecuencia de tos, la frecuencia de cualquier signo clínico durante al menos un día después de la exposición fue de 14%, 13% y 33% para los grupos de vacunas de títulos bajo, medio y alto, respectivamente; mientras que 79% de los lechones en el grupo de control de exposición tuvo al menos un signo clínico después de la exposición. Los tres grupos de vacunas tuvieron significativamente menor frecuencia de cualquier signo clínico después de la exposición que el grupo de control de exposición ( $p \leq 0,0253$ ). No se observaron signos clínicos en el grupo de control negativo durante este mismo periodo de tiempo.

30 Las puntuaciones medias para la respiración o el comportamiento anormal de D29 a D38 fueron bajas para todos los grupos. De hecho, las puntuaciones de respiración medias para los grupos de vacunas de títulos bajo y medio fueron 0,00 (normal), la vacuna de título alto tuvo una puntuación de respiración media de 0,01 y el control de exposición tuvo una puntuación de respiración media de 0,03. La puntuación media para el comportamiento fue 0,00 para los tres grupos de títulos de vacunas; mientras que el control de exposición tuvo una puntuación de comportamiento media de 0,01. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición para las puntuaciones de respiración y comportamiento medias ( $p \geq 0,0996$ ). Las puntuaciones de respiración y comportamiento medias para el grupo de control negativo fueron 0,00.

35 El grupo de control de exposición tuvo una mayor puntuación de tos media que los tres grupos de títulos de vacunas. De hecho, las puntuaciones de tos medias fueron 0,01, 0,01 y 0,04 para los grupos de vacunas de títulos bajo, medio y alto, respectivamente. En cambio, la puntuación de tos media para el grupo de control de exposición fue 0,28. Los tres grupos de títulos de vacunas tuvieron significativamente menores puntuaciones de tos medias que el grupo de control de exposición ( $p \leq 0,0077$ ).

40 La puntuación total media fue superior en el grupo de control de exposición que en los tres grupos de títulos de vacunas. Similar a las puntuaciones de tos medias, las puntuaciones totales medias después de la exposición fueron 0,01, 0,01 y 0,04 para los grupos de vacunas de títulos bajo, medio y alto, respectivamente; mientras que la puntuación total media para el grupo de control de exposición fue 0,32. Los tres grupos de vacunas tuvieron significativamente menores puntuaciones totales medias que el grupo de control de exposición ( $p \leq 0,0025$ ).

45 Temperaturas rectales después de la exposición: Las temperaturas rectales medias por grupo máximas para grupos de vacunas de títulos bajo, medio y alto entre D29 y D38 fueron 40,20°C (D33), 40,33°C (D35) y 40,20°C (D37),

respectivamente. La temperatura rectal media por grupo máxima para el grupo de control de exposición y el grupo de control negativo entre D29 y D38 fueron 40,51°C (D33) y 39,95°C (D33), respectivamente.

5 El grupo de vacunas de título bajo tuvo significativamente menores temperaturas rectales que el grupo de control de exposición en D29 (39,47 frente a 39,90°C), D31 (39,85 frente a 40,20°C), D35 (39,80 frente a 40,22°C) y D38 (39,86 frente a 40,32°C) ( $p \leq 0,0317$ ); mientras que la vacuna de título bajo tuvo una temperatura rectal significativamente mayor que el grupo de control de exposición en D30 (40,08 frente a 39,58°C;  $p = 0,0003$ ). No se detectaron diferencias significativas entre el grupo de vacunas de título bajo y el grupo de control de exposición en D32-D34 y D36-D37 ( $p \geq 0,0545$ ).

10 El grupo de vacunas de título medio tuvo significativamente menores temperaturas rectales que el grupo de control de exposición en D31 (39,62 frente a 40,20°C), D33 (40,15 frente a 40,51°C) y D38 (39,58 frente a 40,32°C) ( $p \leq 0,0227$ ). No se detectaron diferencias significativas entre el grupo de vacunas de título medio y el grupo de control de exposición en D29-D30, D32 y D34-D37 ( $p \geq 0,0580$ ).

15 El grupo de vacunas de título alto tuvo una temperatura rectal significativamente menor que el grupo de control de exposición en D33 (40,12 frente a 40,51°C), D35 (39,79 frente a 40,22°C) y D38 (39,55 frente a 40,32°C) ( $p \leq 0,0147$ ); mientras que el grupo de vacunas de título alto tuvo una temperatura rectal significativamente mayor que el grupo de control de exposición en D32 (40,31 frente a 39,90°C;  $p = 0,0063$ ). No se detectaron diferencias significativas entre el grupo de vacunas de título alto y el grupo de control de exposición en D29-D31, D34 y D36-37 ( $p \geq 0,0708$ ).

20 Hubo menos frecuencia de fiebre en los tres grupos de títulos de vacunas después de la exposición en comparación con el grupo de control de exposición. La frecuencia de fiebre fue en general baja y similar entre los grupos de títulos de vacunas.

25 Aumento de peso diario promedio (ADWG): El ADWG medio por mínimos cuadrados de D0 a D28 para los grupos de vacunas de títulos bajo, medio y alto fueron 0,4, 0,3 y 0,4 kg/día, respectivamente. El ADWG medio por mínimos cuadrados durante este mismo periodo de tiempo para el grupo de control de exposición fue 0,3 kg/día. El grupo de vacunas de título bajo tuvo un ADWG medio por mínimos cuadrados significativamente mayor que el grupo de control de exposición de D0 a D28 ( $p = 0,0292$ ); mientras que no se detectaron otras diferencias significativas entre los grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición ( $p \geq 0,1262$ ), o entre los grupos de títulos de vacunas ( $p \geq 0,1293$ ), para el ADWG medio por mínimos cuadrados. Durante este mismo periodo de tiempo, el grupo de control negativo tuvo ADWG medio de 0,5 kg/día.

30 El ADWG medio por mínimos cuadrados de D28 a D38 para los grupos de vacunas de títulos bajo, medio y alto fueron 0,5, 0,5 y 0,4 kg/día, respectivamente. El ADWG medio por mínimos cuadrados durante este mismo periodo de tiempo para el grupo de control de exposición fue 0,3 kg/día. Los tres grupos de títulos de vacunas vencieron significativamente al grupo de control de exposición después de la exposición ( $p \leq 0,0027$ ). Durante este mismo periodo de tiempo, el grupo de control negativo tuvo un ADWG medio de 0,6 kg/día.

35 Evaluaciones clínicas después de la vacunación: En el grupo de vacunas de bajo título, un lechón (1735) se anotó como delgado de D0 a D10. Además, un lechón que empezó en D6 se anotó como delgado durante 16 días, presentó tos durante 2 días y depresión durante 9 días, y se sacrificó en D21 por motivos de protección animal debido a una mala salud. El lechón 1727 tuvo una puntuación de lesión pulmonar total de 10,8%. Como este valor se determinó antes de la exposición, no se incluyó en el análisis de lesión pulmonar total después de la exposición. Además, se observaron áreas de consolidación rojas/púrpuras en las áreas craneoventrales de los pulmones, el hígado estaba pálido y los riñones tenían múltiples áreas rojas/púrpuras en la pelvis renal. El patólogo observó infiltración grasa en los lóbulos centrales en el hígado, comúnmente observada en casos de equilibrio energético negativo y consiguiente lipólisis. No se observaron otras lesiones en las secciones de hígado, riñón y pulmón. El tejido de pulmón fue positivo para PRRS EU por PCR. No se detectó crecimiento para el cultivo bacteriano rutinario.

45 En el grupo de vacunas de título medio, un lechón se excluyó del estudio en D0 antes del tratamiento debido a una mala salud y se sustituyó por otro lechón. Dos lechones presentaron tos durante uno y tres días, respectivamente, empezando en D12. Cuatro lechones se anotaron como delgados en D2, D3 o ambos D2 y D3.

50 En el grupo de vacunas de título alto, un lechón (1728) presentó cojera o cojera e hinchazón en una pata de D7 a D26. Empezando 18 días después de la vacunación, un lechón se anotó como delgado durante 6 días y presentó tos durante un día y recubrimiento de pelo despeinado durante 4 días. Otro lechón se anotó como delgado en D2. Dos lechones presentaron tos durante dos días y un día, respectivamente, empezando en D9. Un lechón presentó diarrea durante un día (D14).

55 En el grupo de control de exposición, seis lechones presentaron tos periódica durante un acumulado de uno a seis días, empezando con un primer lechón en D7 y terminando con tres lechones en D21. Dos lechones se anotaron como delgados durante dos y 11 días, respectivamente, empezando en D1 para uno de estos lechones. El segundo de estos dos lechones también presentó depresión y recubrimiento de pelo despeinado durante 4 días, debilidad en las patas durante un día y se encontró muerto en D15. En la autopsia de este lechón no se anotaron lesiones pulmonares (puntuación de lesión pulmonar de 0%), sin alimento en el estómago y sin grasa abdominal, y se diagnosticó muerte por inanición como la causa de muerte. Como esta puntuación de lesión pulmonar se determinó

antes de la exposición, no se incluyó en el análisis de la lesión pulmonar después de la exposición.

Los resultados de las pruebas por grupo (valores de p) se resumieron para cualquier evaluación clínica anormal durante al menos un día de D1 a D26. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición ( $p \geq 0,0502$ ); ni entre los grupos de títulos de vacunas ( $p \geq 0,3898$ ). Ningún lechón en el grupo de control negativo presentó una evaluación clínica anormal de D-1 a D26.

Serología del PRRS: Se resumieron los resultados individuales de serología por ELISA del PRRS de lechones. Los lechones en el grupo de control negativo siguieron siendo seronegativos para PRRS durante el estudio. La seroconversión pudo observarse en los 3 grupos de títulos de vacunas 14 días después de la vacunación; mientras que el grupo de control de exposición siguió siendo seronegativo para PRRS hasta después de la exposición. Diez días después de la exposición (D38), todos los lechones en los grupos de vacunas de títulos bajo y alto y el grupo de control de exposición fueron seropositivos para PRRS; mientras que 14 de 15 lechones en los grupos de vacunas de título medio fueron seropositivos para PRRS.

Se determinaron resultados de las pruebas de serología positiva por ELISA para PRRS (valores de p) para diferencias entre grupos. Los tres grupos de títulos de vacunas tuvieron significativamente mayores frecuencias de lechones positivos por ELISA para PRRS que el grupo de control de exposición en D14, D21 y D28 ( $p < 0,0001$ ). No se detectaron diferencias significativas entre los tres grupos de títulos de vacunas y control de exposición en D38 ( $p = 1,0000$  o no se realizó la prueba) ni entre los tres grupos de títulos de vacunas en ningún momento de tiempo ( $p = 1,0000$  o no se realizó la prueba).

Viremia del PRRS después de la vacunación: Se determinaron resultados individuales de la viremia del PRRS después de la vacunación. Para fines estadísticos, a un resultado "no detectado" se le asignó un valor de 0 log GE/ml y a un valor "positivo" se le asignó un valor de 3,0 log GE/ml. Todos los grupos fueron negativos para viremia del PRRS en D0. Se evaluaron los datos de los títulos de viremia por grupo (qPCR) – D7 a D28 después de la vacunación (log GE/ml). Los lechones en los tres grupos de títulos de vacunas alcanzaron viremia media pico en D7, después de lo cual los niveles de los títulos para los tres grupos cayeron lentamente antes de exposición (SD 28). En cambio, el grupo de control de exposición y el grupo de control negativo siguieron siendo negativos para viremia durante la fase del estudio antes de la exposición. De los resultados de las pruebas por grupo (valores de p) para los resultados de qPCR en D7, D14, D21 y D28 se observó que los tres grupos de títulos de vacunas tuvieron significativamente mayores medianas de valores de qPCR que el grupo de control de exposición para D7-D28 ( $p \leq 0,0159$ ). El grupo de vacunas de título medio tuvo un valor medio de qPCR significativamente mayor que el grupo de vacunas de título bajo ( $p = 0,0193$ ); por lo demás no se detectaron diferencias para los valores medios de qPCR entre grupos de vacunas antes de la exposición ( $p \geq 0,0594$ ).

Cuatro semanas después de la vacunación, la frecuencia de viremia fue baja en los tres grupos de títulos de vacunas.

Pueden sacarse las siguientes conclusiones basándose en estos resultados del estudio:

- La ausencia de cualquier brote de bioseguridad durante el estudio y la confirmación de la susceptibilidad de los lechones al PRRS confirmó la validación del estudio y su idoneidad para la interpretación
- La enfermedad clínica del PRRS sustancial fue evidente en el grupo de control de exposición, validándose así este modelo de exposición como una herramienta de laboratorio adecuada para evaluar la eficacia de la vacuna contra el PRRS y más específicamente la MID de MLV contra el 94881 del PRRS
- Los tres niveles de dosis de MLV contra el PRRSV 94881 se asociaron a una reducción significativa en lesiones pulmonares, además de a una reducción significativa en viremia después de la exposición, la carga vírica en tejidos de pulmón, tos, puntuaciones de observaciones clínicas totales, fiebre y ADWG
- La MID de MLV contra el PRRSV 94881 como se determina en este estudio está asociada al nivel de vacuna de título bajo de  $1 \times 10^{2,77}$  TCID<sub>50</sub>/ml basándose en una reducción relevante en lesiones pulmonares macroscópicas para los tres niveles de títulos en comparación con los controles de exposición después de recibir una exposición del PRRS derivado de europeo heterólogo virulento.

Otra descripción de los resultados

Las observaciones clínicas fueron tomadas cada día. La RT-PCR cuantitativa se realizó usando cebadores específicos para PRRSV europeo para muestras de sangre, hisopo oral, fecal y nasal, además de lavados de pulmón.

De estos estudios, los datos mostraron que los lechones mostraron salud normal, excepto algunos cerdos que fueron cojos. Después de la muerte no hubo anomalías en la autopsia, excepto que 1-2 animales mostraron signos de ganglios linfáticos inguinales levemente alargados. Y, lo que es más importante, se observó que no hubo lesiones pulmonares observadas con el grupo vacunado.



La Figura 8 muestra el porcentaje de animales virémicos en el grupo centinela con respecto al grupo vacunado con una composición que contiene la cepa del virus PRRS atenuado depositada con el n° de acceso de ECACC 11012502. Esta figura muestra la propagación de la cepa de vacuna de animales vacunados a centinelas. En el pico de viremia del PRRS (SD 21) como se ha detectado por RT-PCR cuantitativa, la carga vírica fue un 78,47% inferior en cerdos infectados con centinela (carga vírica media de 3,347 GE/ml) que en animales vacunados (carga vírica media de 4,014 GE/ml). En la habitación en la que se mezclaron las cerdas sin tratamiento previo para PRRS con sus crías vacunadas, sólo 3 cerdas de 8 dieron positivo para PRRSv en sangre por RT-PCR, confirmándose así la exposición de la vacuna MLV del PRRS limitada e ineficaz a animales adultos sin tratamiento previo. La vacuna MLV del virus 94881 se eliminó principalmente en las heces en este estudio. De hecho, en las heces, el virus podría detectarse de un día a 21 días después de la vacunación. Cinco días después de la vacunación, casi 30% de los animales vacunados eliminaron el virus en las heces. El virus PRRS no se detectó en secreciones nasales y en sólo algunos animales por secreciones orales (2 de los 56 animales muestreados 5 días después de la vacunación).

Ejemplo 3: Materiales y métodos a modo de ejemplo para su uso en probar la eficacia de la vacuna usando Porcilis® PRRS como ejemplo.

En este estudio se usó un número seleccionado, por ejemplo, catorce cerdas preñadas sanas de una piara negativa para el PRRSV confirmada (probada virológicamente y serológicamente). Las cerdas afrontaron un primer o segundo parto y se confirmó que estaban preñadas en el momento de la vacunación/infección por exposición en el día 94 de gestación. Las cerdas se dividieron en tres grupos de tratamiento. El primer grupo se trató con una dosis comercial de Porcilis™ PRRS de 2 ml que contenía al menos  $10^{4.0}$  TCID<sub>50</sub> por administración intramuscular en el día 94 de gestación. El grupo de control de exposición (Grupo 2) recibió una dosis de  $10^{4.72}$  TCID<sub>50</sub> en 2 ml de medio de cultivo celular de la cepa aislada en campo europea patógena (pase 4) intranasalmente. El Grupo 3 se vacunó con una dosis de 2 ml que contenía  $10^{7.6}$  TCID<sub>50</sub> i.m. de la MLV del PRRS que contenía la cepa del PRRS atenuada depositada con el n° de acceso de ECACC 11012502 el 25 de enero de 2011 siete días antes de la inseminación y se expuso a la cepa aislada en campo europea (pase 4) ( $10^{4.72}$  TCID<sub>50</sub> en 2 ml de medio de cultivo celular i.n.) en el día 94 de gestación.

Los animales del Grupo 1 se monitorizaron hasta el día 5 después del parto. Los animales del Grupo 2 y 3 se monitorizaron hasta el día 28 después del parto.

Fase del animal: Todas las cerdas se acostumbraron a las instalaciones del animal 1 semana antes de la vacunación. El investigador observó diariamente las cerdas y los lechones para su estado de salud general. Cada animal que murió o se sacrificó se sometió a autopsia y a posteriores análisis de laboratorio.

El embarazo se confirmó con examen por ultrasonidos. Se obtuvo suero de las cerdas en los días de estudio 0, 7, 14 y en el parto para investigaciones por PCR y ELISA. Cualquier material que se asoció a aborto se sometió a investigaciones de laboratorio.

La patología macroscópica rutinaria se realizó en todos los lechones nacidos muertos. Se recogieron muestras de tejido de pulmón de todos los lóbulos de los pulmones de lechones nacidos muertos y de sus madres. Las muestras para probar por PCR se almacenaron a -70°C. Se recogieron 2 ml de sangre precolostral de cada lechón en el día del nacimiento. Se preparó el suero y las alícuotas se almacenaron a -70°C. El suero se usó para probar para viremia para evaluar la infección transplacentaria. Todos los lechones del Grupo 1 que sobrevivieron hasta el día 5 se sacrificaron a los 5 días de edad.

Parámetros de rendimiento clínico y reproductivo: Los siguientes criterios son criterios a modo de ejemplo que pueden investigarse (orden de prioridad): número de lechones nacidos vivos por camada, número de lechones nacidos muertos por camada, número de fetos momificados por camada y número de lechones que sobreviven del día 5 ó 28 de edad, respectivamente. El número de lechones nacidos virémicos se determinó usando suero precolostral. La frecuencia de muestras de sangre y tejido positivas por PCR de cerdas y/o lechones se investigó para evaluar la epidemiología y el curso de la infección.

Muestras de campo: Las muestras de campo investigadas en este estudio se tomaron de diagnósticos de PRRSV rutinarios y consistieron en sangre, suero y diversos materiales de órganos, principalmente pulmones y ganglios linfáticos, de diferentes países europeos. Las muestras se almacenaron a -20°C durante un máximo de 3 días antes de la preparación del ARN y el material residual se transfirió posteriormente a -70°C para el almacenamiento a largo plazo. El ARN y los productos de RT-PCR se almacenaron a -20°C.

Cultivo de células: Se cultivaron células MA104 (clon CL2621) en MEM (Dulbecco, Alemania) complementado con 10% de SBF y antibióticos.

Se recogieron macrófagos alveolares porcinos usando un método descrito por Wensvoort y col. (Wensvoort, G. y col. Vet. Quat. 1991, 13:121-130) y se modificó del siguiente modo: cada lóbulo del pulmón se infundió con 50-100 ml de PBS y posteriormente se masajeó durante 3 a 5 min. Entonces, el líquido se rescató del lóbulo y se pasó por un filtro de gasa. Este método se repitió hasta que el líquido de lavado fue claro. El líquido de lavado recogido se centrifugó a 500 g durante 15 min a temperatura ambiente. El sedimento se lavó en PBS y las alícuotas de  $1 \times 10^7$  células en 50% de RPMI 1640 (Biochrom), 40% de SBF y 10% de DMSO se congelaron a -196°C. Para el uso

posterior, los PAM se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con 10% de SBF y antibióticos.

Preparación de material de órganos para el aislamiento del virus en cultivo celular: Aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup> de material de tejido se transfirieron a un tubo que contenía una bala de homogeneizador de acero en 1,8 ml de PBS estéril. Los tubos se agitaron durante 10 min hasta que se homogeneizó el material de órganos. Los residuos de células se sedimentaron por centrifugación durante 2 min a 450 g y temperatura ambiente. El sobrenadante se pasó a través de un filtro estéril de 0,45 µm de poro y se guardó a -70°C. Se usaron alícuotas de 30 ml para inocular una monocapa de cultivo celular semiconfluyente usando placas de microtitulación de 24 pocillos.

Aislamiento del ARN: El ARN del material de órganos se extrajo con el kit RNeasy Mini y de suero, plasma, sobrenadante de cultivo celular y disolución de vacuna con el kit QTAamp Viral RNA Mini (ambos de Qiagen) según las recomendaciones del fabricante usando aproximadamente 100 mg de material de órganos y 140 ml de material de líquido, respectivamente, para cada preparación. El ARN se eluyó finalmente en 65 ml de tampón como recomienda el fabricante.

Purificación en placa del virus: Las monocapas confluentes de células MA 104 en placas de cultivo celular de 10 cm se sembraron 48 horas antes de infectarse con el virus respectivo a diluciones de diez veces de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup>. Las células se incubaron durante 1 hora con las diluciones de virus que luego se eliminaron, y las células se recubrieron con 30 ml de medio de MA 104 que contenía 5% de metilcelulosa (Sigma). Las placas se recogieron después de cinco a siete días y se transfirieron a monocapas de MA 104 en placas de 24 pocillos. Los virus de estas placas se recogieron a aproximadamente 50% de CPE y se sometieron a posteriores análisis.

Ensayo de inmunofluorescencia: Las células se fijaron a -20°C durante 15 min usando acetona:metanol (1:1) frío en hielo y después se secaron al aire. Después de la rehidratación en PBS, las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal específico del PRRSV SDOW17 (Rural Technologies Inc., EE.UU.) diluido 1:1000 en PBS durante 1 hora. Después de 3 lavados con PBS, las células se incubaron con anticuerpo secundario de cabra conjugado con anti-FITC de ratón (Dianova, Hamburgo, Alemania) (1:150 en PBS) durante otra hora. Después de 3 lavados finales con PBS, las células se recubrieron con disolución de glicerina:PBS (1:1) y se sometieron a microscopía de inmunofluorescencia.

nRT-PCR de diagnóstico: Puede llevarse a cabo un diagnóstico de RT-nPCR para comprobar las muestras para la presencia del virus PRRSV-EU.

Una RT-nPCR de diagnóstico a modo de ejemplo puede llevarse a cabo con el kit Titan One Tube (Roche Molecular Biochemicals) del siguiente modo: [5 ml de preparación de ARN total, 1\* tampón de RT-PCR, dNTPs 0,4 mM, 20 pmoles de cebadores PLS y PLR, ditiotreitól 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, 2,5-5 U de RNasin (Promega Ltd), 1-2,5 U de mezcla de enzimas, ajustada a un volumen final de 25 ml con agua destilada tratada con DEPC]. Las condiciones de ciclado rutinarias usadas pueden ser: 45°C durante 1 hora, 94°C durante 2 min y 30 ciclos de 94°C durante 30 s, 58°C durante 45 s y 68°C durante 45 s, etapa de extensión final a 68°C durante 5 min. La reacción de PCR anidada se llevó a cabo con Qiagen Taq (Qiagen AG) del siguiente modo: [1 ml de producto de RT-PCR, 1\* tampón de PCR, 10 ml de disolución Q, MgCl<sub>2</sub> 3,5 mM, dNTPs 0,3 mM, 20 pmoles de cada uno de los cebadores EU-7-n-s y EU-7-n-as, 2,5 U de Taq polimerasa, ajustada a un volumen final de 50 ml con agua destilada]. Las condiciones de ciclado fueron del siguiente modo: 7 ciclos a 94°C durante 1 min, 58°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 1 min y 70°C durante 1,5 min (sin etapa de hibridación), etapa de extensión final a 70°C durante 5 min.

Secuenciación de nucleótidos: La secuenciación de nucleótidos puede realizarse en los productos de PCR anidada que se habían generado con cebadores que contenían una marca M13, tanto directamente a partir de la reacción de PCR como a partir de productos de PCR que se habían escindido de geles de agarosa y purificado con el kit de extracción en gel JETsorb (Genomed). La secuenciación se hizo usando el secuenciador automático LI-COR DNA Analyzer GENE READIR 4200® (LI-COR Inc., Lincoln, Nebr., EE.UU.). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducidas pueden analizarse con AlignIR®, vs1.1 (LI-COR Inc., Lincoln, Nebr., EE.UU.) y el paquete de software DNASIS.RTM. 2.6 (Hitachi Software Genetic Systems Inc., San Francisco, EE.UU.).

Ejemplo 4: Determinación de la secuencia del genoma de longitud completa del PRRSV 94881

El presente ejemplo muestra la determinación de las secuencias de nucleótidos del genoma de longitud completa de la cepa 94881 atenuada y su cepa parental 94881, pase 5. Estas secuencias no mostraron ninguna posición de nucleótidos confusa que indicara la presencia de un contenido vírico homogéneo. La comparación del virus de siembra maestro 94881 con el virus de Lelystad (LV) de la cepa del virus de referencia europea reveló homologías de nucleótidos que oscilaban de 85,40 a 95,09 por ciento en los 8 genes víricos diferentes e identidades de aminoácidos de 86,39 a 97,27 por ciento entre ambas cepas de virus. Pudieron identificarse dos deleciones en el ORF 1a del MSV 94881 en comparación con LV. La comparación entre el virus de siembra maestro 94881 y su cepa parental, pase 5, mostró 26 intercambios de nucleótidos entre ambos, produciendo un número total de 14 intercambios de aminoácidos.

Para la determinación de secuencias del genoma de longitud completa del virus de siembra maestro 94881 se realizó un número total de 1 transcripción inversa, 17 PCR externas y 58 PCR internas, resultando 40 productos de

PCR que se usaron para la secuenciación. En el caso de 94881, pase 5, se realizaron 1 transcripción inversa, 17 PCR externas y 67 PCR internas, resultando 40 productos de PCR, por tanto, se usó para la secuenciación.

5 Los análisis del alineamiento de secuencias de solapamiento produjeron una secuencia de longitud completa de 14843 nucleótidos para ambas cepas aisladas de virus que comprendían los marcos de lectura abiertos completos (ORF) 1a a 7, cada una. Adicionalmente pudieron determinarse los 177 nucleótidos de la región sin traducir en 5' (5'-NTR) y 43 nucleótidos de la región sin traducir en 3' (3'-NTR), cada una. En comparación con la cepa aislada del virus de referencia del PRRSV europea Lelystad (LV) (nº de acceso de GenBank M96262), 44 nucleótidos de 5'-NTR y 83 nucleótidos de 3'-NTR no pudieron determinarse ya que aquellas regiones se usaron para cebar las regiones de hibridación.

10 Las reacciones de secuenciación produjeron para ambas cepas de virus una clara secuencia de nucleótidos sin ninguna oscilación o cualquier otra indicación de una secuencia mixta. Después de la traducción en aminoácidos, las secuencias de aminoácidos claras sin ningún aminoácido cuestionable estuvieron disponibles para la comparación de secuencias del MSV 94881 con el LV y con la cepa parental 94881, pase 5. Se realizaron los alineamientos y las comparaciones de las secuencias de nucleótidos entre el MSV 94881 y el virus de Lelystad y se mostró que había diferencias sustanciales al nivel de nucleótidos y aminoácidos. También se realizaron alineamientos entre MSV 15 94881 y su cepa parental, pase 5.

Las comparaciones de secuencias con LV produjeron homologías de nucleótidos de 85,40 a 95,09 por ciento en los 8 genes víricos diferentes e identidades de aminoácidos de 86,39 a 97,27 por ciento entre ambas cepas de virus. Pueden identificarse dos deleciones en el ORF 1a de MSV 94881 en comparación con LV. Una deleción de 138 20 nucleótidos se localiza en la posición 2154 a 2292 del LV y hace que falten 46 aminoácidos. En la posición 2686 a 2688 otro triplete está delecionado, haciendo que falte el aminoácido fenilalanina. Una disposición de todas las homologías de nucleótidos e identidades de aminoácido entre LV y ambas cepas de 94881 se muestra en la Tabla 4.1.

25 Tabla 4.1: Disposición de comparaciones de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del virus de siembra maestro 94881 con el virus de referencia europeo el virus de Lelystad

ORF	Longitud del gen vírico/proteína vírica nn/aa	Nº de desviaciones de nucleótidos con respecto al virus de Lelystad	Homología genética con respecto al virus de Lelystad en porcentaje	Nº de desviaciones de aminoácidos con respecto al virus de Lelystad	Identidad de aminoácidos con respecto al virus de Lelystad en
5'-NTR	177*/ ---	9	94,92	---	---
1a	7050** / 2349	1050	85,40	326	86,39
1b	4392 / 1463	346	92,12	40	97,27
2	750 / 249	67	91,07	23	90,76
3	798 / 265	72	90,98	28	89,43
4	552 / 183	52	90,58	23	87,43
5	606 / 201	58	90,43	23	88,56
6	522 / 173	26	95,02	5	97,11
7	387 / 128	19	95,09	9	92,97
3'-NTR	44***/ ---	2	95,45	---	---

NTR: región sin traducir

\* = Sólo se compararon 177 nucleótidos entre el virus de Lelystad y MSV 94881. Los 44 nucleótidos restantes, localizados en la dirección 5', no se habían determinado.

30 \*\* = La cepa aislada del MSV 94881 muestra dos deleciones en ORF 1a, una con 138 nucleótidos y una con 3 nucleótidos, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos completas del virus de referencia LV se usaron para la homología y los cálculos de identidad, las deleciones se evalúan como desviaciones. La longitud del gen vírico correspondiente de LV es 7191 nucleótidos y la poliproteína correspondiente de 2396 aminoácidos, los cálculos de homología genética y la identidad de aminoácidos se refieren a los números de 7191 nucleótidos y 2396 aminoácidos, respectivamente.

35 \*\*\* = Sólo se compararon 44 nucleótidos entre el virus de Lelystad y el MSV 94881. Los 83 nucleótidos restantes, localizados en la dirección 3', no se habían determinado.

40 La comparación de secuencias de las secuencias de nucleótidos de longitud completa del 94881 virus de siembra maestro y la cepa parental 94881, pase 5, revelaron un número total de 26 intercambios de nucleótidos entre ambos. Los intercambios de nucleótidos se distribuyeron del siguiente modo: 15 en ORF 1a, 4 en ORF 1b, 2 en ORF 2, ninguno en ORF 3, 1 en ORF 4, 3 en ORF 5, 1 en ORF 6 y ninguno en ORF 7. Estos intercambios de nucleótidos produjeron un número total de 14 intercambios de aminoácidos que se distribuyeron del siguiente modo: 8 en la

poliproteína 1a, 1 en la poliproteína 1b, 1 en la glicoproteína 2, ninguno en la glicoproteína 3, 1 en la glicoproteína 4, 2 en la glicoproteína 5 y 1 en la proteína de la matriz. Ambas cepas mostraron las mismas deleciones en comparación con el virus de Lelystad en ORF 1a. Una disposición de todos los intercambios de nucleótidos e intercambios de aminoácidos resultantes que incluyen las posiciones en los genes víricos y las proteínas correspondientes se muestra en detalle en la Tabla 4.2.

Ejemplo 5 – Cultivo del virus depositado y MSV

Como se ha observado anteriormente, 94881 parental (pase bajo) se depositó en la Colección europea de cultivos celulares (ECACC) con el número de acceso ECACC 11012501, el virus de siembra maestro 94881 (MSV) se depositó en la Colección europea de cultivos celulares (ECACC) con el número de acceso ECACC 11012502. Las condiciones de crecimiento y cultivo para el virus parental y el MSV se proporcionan en el presente ejemplo.

94881 parental: Es un virus de un genotipo que es PRRSV tipo 1, ya que tal es un PRRSV de genotipo europeo. El virus tiene un huésped porcino. El virus parental depositado en 11012501 se depositó a un título de 5,81 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml. Las células huésped para la propagación de virus son células MA 104. Estas células se cultivan en medio esencial mínimo (MEM) con 3,7 g/l de bicarbonato sódico que contiene 6% de suero bovino fetal irradiado a 37 ± 1°C. Las células se siembran en placa en matraces T (75 cm<sup>2</sup>) con una densidad de siembra de 2 x 10<sup>4</sup> a 2 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> y se cultivan durante 3 a 7 días hasta 100% de confluencia antes del pase. Para el crecimiento del virus, el virus se añade a las células a una MOI de 0,001-0,01 en matraces T. Las células infectadas están a una confluencia de aproximadamente 80-100% normalmente 1-3 días después de la siembra de las células. Las células infectadas se cultivan a 37 ± 1°C durante 3-10 días después de la infección y luego se recoge el virus. La cosecha se realiza cuando las células de la monocapa presentan aproximadamente 80-100% de efecto citopático (CPE) 3-10 días después de la infección. El sobrenadante de cultivos de tejido de MA104 infectado (medio gastado + PRRSV de un cultivo con 80-100% de CPE) se recoge y contiene el virus que se ha propagado. Este sobrenadante puede almacenarse a -70°C/-80°C durante varios meses hasta su uso. El virus se evalúa para TCID<sub>50</sub> con el cálculo de Spearman y Kaerber para determinar log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml de muestra.

Virus de siembra maestro (MSV) 94881 para vacuna (pase alto): Es un virus de un genotipo que es PRRSV tipo 1, ya que tal es un PRRSV de genotipo europeo. El virus tiene un huésped porcino. El MSV depositado en 11012502 se depositó a un título de 6,43 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml. Las células huésped usadas para la propagación del MSV son células MA 104. Estas células se cultivan en medio esencial mínimo (MEM) con 1,4 g/l de bicarbonato sódico y que contiene 10% de suero bovino fetal irradiado a 36 ± 2°C. Las células se siembran en placa en matraces T (75-150 cm<sup>2</sup>) o botellas rotatorias de 850 cm<sup>2</sup> con una densidad de siembra de 1 x 10<sup>4</sup> a 1 x 10<sup>5</sup> células / cm<sup>2</sup> y se cultivan durante 3 a 7 días hasta 100% de confluencia antes del pase. Para el crecimiento del virus, el virus se añade a las células a una MOI de 0,001-0,01 en matraces T o botellas rotatorias. Las células infectadas están a una confluencia de aproximadamente 80-100% normalmente 1-3 días después de la siembra de las células. Las células infectadas se cultivan a 36 ± 2°C durante 3-14 días después de la infección y luego se recoge el virus. La cosecha se realiza cuando las células de la monocapa presentan aproximadamente 80-100% de efecto citopático (CPE) 3-14 días después de la infección. El sobrenadante de cultivos de tejido de MA104 infectado (medio gastado + PRRS de un cultivo con 80-100% de CPE) se recoge y contiene el virus que se ha propagado. Este sobrenadante puede almacenarse a 2-8°C durante 5-10 días, -70°C durante varios meses hasta su uso. El MSV se evalúa para TCID<sub>50</sub> con el cálculo de Reed y Muench para determinar log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml de muestra.

Tabla 4.2: Disposición de comparaciones de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del virus de siembra maestro 94881 con respecto a la cepa parental 94881

ORF	Nº de nucleótidos que se desvían	Posición en el gen vírico	Intercambio (nn) de la cepa parental a MSV	Sinónimo / no sinónimo	Nº de aminoácidos que se desvían	Posición en la proteína vírica	Intercambio (aa) de la cepa parental a MSV
1a	15	309	C a T	sinónimo	8	---	---
		753	G a T	no sinónimo		251	E a D
		1474	G a A	no sinónimo		492	V a I
		1789	G a A	no sinónimo		597	V a I
		2094	C a T	sinónimo		---	---
		2987	T a C	no sinónimo		996	L a S
		3034	A a G	no sinónimo		1012	T a A
		3065	A a G	no sinónimo		1022	E a G
		3736	A a G	no sinónimo		1246	T a A
		3966	C a T	sinónimo		---	---
		4101	T a C	sinónimo		---	---

		5803	C a T	no sinónimo		1935	L a F
		6354	T a G	sinónimo		---	---
		6519	C a T	sinónimo		---	---
		6588	T a C	sinónimo		---	---
1b	4	591	T a C	sinónimo	1	---	---
		1833	C a T	sinónimo		---	---
		1932	C a T	sinónimo		---	---
		3682	G a A	no sinónimo		1228	V a I
2	2	13	C a T	no sinónimo	1	5	H to Y
		195	C a T	sinónimo		---	---
3	0	---	---	---	0	---	---
4	1	529	T a C	no sinónimo	1	177	F a L
5	3	109	A a G	no sinónimo	2	37	N a D
		364	C a T	no sinónimo		122	L a F
		570	C a T	sinónimo		---	---
6	1	214	C a T	no sinónimo	1	72	L a F
7	0	---	---	---	0	---	---

Ejemplo 6: Estudio de MID en cerdas jóvenes de la MLV contra el 94881 del PRRS

#### Sumario

- 5 El objetivo de este estudio de exposición a vacunación fue evaluar la dosis de inmunización mínima (MID) de la cepa aislada 94881 derivada de europea de la vacuna del síndrome reproductor y respiratorio porcino, virus vivo modificado, código 19T1.U\_ (MLV contra el 94881 del PRRS) en cerdas jóvenes. Se administraron dos niveles de títulos diferentes a cerdas jóvenes seronegativas para PRRS aproximadamente 28 días antes del celo (Día 0; D0), las cerdas jóvenes se expusieron a una cepa aislada europea heteróloga del PRRSv a aproximadamente 90 días de gestación (D118) y las cerdas jóvenes se evaluaron para el número total de lechones nacidos vivos o porcentajes de lechones nacidos vivos y lechones destetados a los 20 días de edad para determinar la MID. En el tiempo de exposición en el Día 118 (D118), el grupo de control de exposición consistió en 8 cerdas jóvenes preñadas (Grupo 1, placebo), el grupo de título bajo consistió en 8 cerdas jóvenes preñadas (Grupo 2,  $1 \times 10^{2.43}$  TCID<sub>50</sub>/dosis), el grupo de título alto consistió en 8 cerdas jóvenes preñadas (Grupo 3,  $1 \times 10^{3.90}$  TCID<sub>50</sub>/dosis) y el grupo de control negativo consistió en 5 cerdas jóvenes preñadas (Grupo 4, placebo, no expuesto).
- 10
- 15 Tanto los grupos de título bajo como de título alto se asociaron a mayores porcentajes de lechones vivos por camada en el parto (**P≤0,0455**) y mayores porcentajes y números de lechones vivos por camada en el destetamiento (**P≤0,0203**) en comparación con el grupo de control de exposición.

- Con respecto a los parámetros de eficacia de apoyo, el grupo de dosis alta se asoció a un mayor porcentaje y número de lechones sanos por cerda joven en el parto (**P≤0,0211**), un menor porcentaje y número de fetos débiles y momificados (**P≤0,0090**), un menor porcentaje de cerdas jóvenes positivas por qPCR y menor carga vírica en cerdas jóvenes después de la exposición en D125, DOF 0 y DOF+13 (**P≤0,0155**), un menor porcentaje de lechones por cerda joven positiva por qPCR y menor carga vírica en lechones en DOF 0 (**P≤0,0030**), un menor porcentaje de lechones por cerda joven con enfermedad clínica (**P<0,0001**) y mayores pesos corporales de los lechones en DOF+20 y ADWG (**P<0,0013**) en comparación con el grupo de control de exposición.
- 20

- El grupo de dosis baja se asoció a un mayor porcentaje de lechones sanos por cerda joven en el parto (**P=0,0138**), un menor porcentaje y número de fetos momificados (**P≤0,0190**), un menor porcentaje de cerdas jóvenes positivas por qPCR y menor carga vírica en cerdas jóvenes después de la exposición en D125, D132, DOF 0 y DOF+13 (**P≤0,0290**), un menor porcentaje de lechones por cerda joven positiva por qPCR en DOF 0 (**P=0,0381**), un menor porcentaje de lechones por cerda joven con enfermedad clínica (**P<0,0001**) y mayor peso corporal de los lechones en DOF+20 y ADWG (**P<0,0028**) en comparación con el grupo de control de exposición.
- 25
- 30

En conclusión, el objetivo del estudio se cumplió y los datos de este estudio establecen la MID de MLV contra el PRRSV 94881 en cerdas jóvenes como  $1 \times 10^{2.43}$  TCID<sub>50</sub>/2 ml. Además, este estudio establece la duración de la inmunidad (DOI) en cerdas jóvenes en aproximadamente 4 meses.

#### Objetivo(s)/fin del estudio

- 35 El objetivo de este estudio de exposición a vacunación era evaluar la dosis de inmunización mínima (MID) de la cepa

- aislada 94881 derivada de europea de la vacuna del síndrome reproductor y respiratorio porcino, virus vivo modificado, código 19T1.U\_ (MLV contra el 94881 del PRRS), a dos niveles de títulos diferentes (Grupo 2, título bajo; Grupo 3, título alto), administrada a cerdas jóvenes seronegativas para PRRS antes del celo para proporcionar mayores porcentajes de lechones nacidos vivos y lechones destetados a los 21 días de edad, tras la exposición de cerdas jóvenes a una cepa aislada europea heteróloga del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSv) a aproximadamente 90 días de gestación. El criterio primario para satisfacer este objetivo fue que uno o ambos grupos de vacunas debían demostrar porcentaje o número relevantemente mayor de lechones nacidos vivos y lechones destetados a los 20 días de edad (DOF +20) en comparación con el grupo de control de exposición (Grupo 1).
- 5
- 10 Otros parámetros analizados entre los grupos de vacunas y el grupo de control de exposición incluyeron evaluaciones clínicas de cerdas jóvenes después de la vacunación, serología del PRRS de cerdas jóvenes, viremia de cerdas jóvenes, observaciones clínicas de cerdas jóvenes, viremia de lechones, lechones totales por camada, lechones sanos vivos por camada, lechones vivos débiles por camada, momias por camada, lechones nacidos muertos por camada, lechones aplastados/mortalidad por camada, observaciones clínicas de lechones y aumento de peso diario promedio (ADWG) de lechones. Estos parámetros se analizaron como parámetros de apoyo y no sirvieron de parámetros primarios para satisfacer el objetivo del estudio.
- 15

Programa de acontecimientos

Tabla 6.1 Programa de acontecimientos de cerdas jóvenes

Día(s) de estudio	Fechas	Acontecimiento clave del estudio
-2 ó -1	20-Jul-2010 a 21-Jul-2010	Examen de salud
-1 a 21	21-Jul-2010 a 12-Ago-2010	Grupos 1-4: Evaluaciones clínicas diarias
0	22-Jul-2010	Grupos 1-4: Recogida de sangre; vacunación de grupos 1 y 4 con producto de control (CP); vacunación del grupo 2 con producto veterinario en investigación (IVP) nº 1 (grupo de vacunas de título bajo); y vacunación del grupo 3 con IVP nº 2 (grupo de vacunas de título alto)
8 a 21	30-Jul-2010 a 12-Ago-2010	Grupos 1-4: Tratamiento de cerdas jóvenes una vez al día con Matrix™ para sincronizar los ciclos de celo
7, 14, 21, 56 y 84	29-Jul-2010, 05-Ago-2010, 12-Ago-2010, 16-Sep-2010, 14-Oct-2010	Grupos 1-4: Recogida de sangre
22 a 113	13-Ago-2010 a 12-Nov-2010	Grupos 1-4: Evaluaciones clínicas al menos tres veces a la semana
26 a 32	17-Ago-2010 a 23-Ago-2010	Grupos 1-4: Observación para la detección de calor y cerdas jóvenes en celo por inseminación artificial (AI)
84	14-Oct-2010	Grupos 1-4: Embarazo comprobado por ultrasonidos
116 a 20 días después del parto	15-Nov-2010 a 05-Ene-2011	Grupos 1-4: Observaciones clínicas, registro de abortos, lechones nacidos muertos, momias, lechones vivos, lechones nacidos débiles
118 (aprox. 90 días de gestación)	17-Nov-2010	Grupos 1-4: Recogida de sangre Grupos 1-3: Exposición a la cepa aislada del PRRSv 190136
125, 132, parto/aborto (DOF*), DOF +7, DOF +13	24-Nov-2010, 01-Dic-2010, 03-Dic-2010 a 16-Dic-2010, 10-Dic-2010 a 23-Dic-2010, 16-Dic-2010 a 29-Dic-2010	Grupos 1-4: Recogida de sangre
DOF+20	23-Dic-2010 a 05-Ene-2011	Grupos 1-4: Recogida de sangre de las cerdas jóvenes restantes; sacrificio de las cerdas jóvenes restantes; eliminación
DOF+20 después	25-Dic-2010 a 05-Ene-2011	Grupos 1-4: Sacrificio de las cerdas jóvenes restantes; eliminación

\*DOF = Día del parto

Tabla 6.2 Programa de acontecimientos de lechones

Día(s) de estudio	Fechas	Acontecimiento clave del estudio
DOF	03-Dic-2010 a 16-Dic-2010	Todos los lechones muertos: Se pesan; se les hace la autopsia; recogida de sangre/fluido corporal si es posible; recogida de muestras de pulmón Todos los lechones vivos: Se pesan; recogida de sangre (pre-colostral o peri-natal (en el plazo de 12 horas desde el nacimiento))
DOF +1 a DOF +20	04-Dic-2010 a 05-Ene-2011	Todos los lechones vivos: Observaciones clínicas Lechones muertos: Se pesan; se les hace la autopsia; recogida de sangre/fluido corporal si es posible; recogida de muestras de pulmón
DOF +7	10-Dic-2010 a 23-Dic-2010	Todos los lechones vivos: Recogida de sangre
DOF +13	16-Dic-2010 a 29-Dic-2010	Todos los lechones vivos: Recogida de sangre
DOF +20	23-Dic-2010 a 05-Ene-2011	Todos los lechones vivos: Se pesan; recogida de sangre;
DOF+20 después	25-Dic-2010 a 05-Ene-2011	Lechones del Grupo 1-3: Sacrificio de los lechones restantes, eliminación; Lechones del Grupo 4: Se asignan a otro proyecto de BIVI

Diseño del estudio

Tabla 6.3 Diseño del estudio

Grupo	Número de cerdas jóvenes en D0	Tratamiento en D0 (aproximadamente 28 días antes del celo)	Número de cerdas jóvenes en D118	Exposición en D118 a 6,0 ml (2 ml/orificio nasal; 2 ml IM) de $1 \times 10^{6,30}$ TCID <sub>50</sub> de PRRSv 190136
1 (grupo de control de exposición)	28	2,0 ml IM de producto de control (placebo del mismo producto sin MLV contra el 94881 del PRRS)	16	Sí
2 (grupo de título bajo)	28	2,0 ml IM de IVP nº 1 ( $1 \times 10^{2,43}$ TCID <sub>50</sub> de MLV contra el 94881 del PRRS)	16	Sí
3 (grupo de título alto)	28	2,0 ml IM de IVP nº 2 ( $1 \times 10^{3,90}$ TCID <sub>50</sub> de MLV contra el 94881 del PRRS)	16	Sí
4 (grupo de control negativo)	10	2,0 ml IM de producto de control	5	No

5

Criterios de cegado

El investigador del estudio y los representantes fueron cegados con respecto a las cerdas jóvenes asignadas a los Grupos 1-4. Para mantener el cegado del investigador del estudio y los representantes, una persona que no recogía los datos administró los IVP y el CP a las cerdas jóvenes asignadas en D0. El personal del laboratorio se cegó al tratamiento de recibía cada cerda joven mientras que realizaban sus tareas respectivas.

10

Materiales

Producto veterinario en investigación (ivp) y producto de control (cp)

## ES 2 692 809 T3

Tabla 6.4 Productos veterinarios en investigación (IVP)

<b>Nombre del producto genérico:</b>	<b>Síndrome reproductor y respiratorio porcino, virus vivo modificado</b>
Cepa aislada:	Cepa aislada 94881
Formulación:	El protocolo de lotes del fabricante (MBP) para la vacuna MLV contra el 94881 del PRRS, lote 390-005 (torta), se presenta en el Apéndice 1. El MBP para el diluyente con adyuvante de carbopol estéril, lote 808-002 (diluyente), se presenta en la Sección 15.1, Apéndice 1. D0 justo antes de la vacunación, BIVI-Ames reconstituyó/diluyó la vacuna MLV contra el 94881 del PRRS, lote 390-005, con diluyente con adyuvante de carbopol estéril, lote 808-002, para formular los dos IVP. IVP n° 1 se formuló a un nivel de título elegido como diana de aproximadamente $1 \times 10^{3.0}$ TCID <sub>50</sub> /2 ml y IVP n° 2 se formuló a un nivel de título elegido como diana de aproximadamente $1 \times 10^{4.5}$ TCID <sub>50</sub> /2 ml. Un volumen adecuado de cada IVP se formuló para la vacunación y pruebas.
Lote de IVP / n° de serie:	IVP n° 1: N270-142 IVP n° 2: N270-143
Fabricante:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506
Fecha de caducidad:	Se asignó una fecha de caducidad del 22 de julio de 2010 a cada IVP sólo para fines de estudio.
Requisitos de almacenamiento:	IVP rehidratado/diluido se almacenó a 2-8°C o sobre hielo
Pruebas:	La MLV contra el 94881 del PRRS, serie 390-005, y el diluyente con adyuvante de carbopol estéril, lote 808-002, fueron probados por BIVI-QC. Al principio y al final del método de vacunación se contactó con BIVI-Ames. BIVI-Ames probó antes y después de la vacunación alícuotas de cada IVP para el título de virus según el Método de títulos de PRRSv (Sección 15.1).
Resultados de las pruebas:	Los resultados de las pruebas para la MLV contra el 94881 del PRRS, serie 390-005, y para el diluyente con adyuvante de carbopol estéril, lote 808-002, fueron satisfactorios. IVP n° 1 tuvo un título promedio de $1 \times 10^{2.43}$ TCID <sub>50</sub> /2 ml y IVP n° 2 tuvo un título promedio de $1 \times 10^{3.90}$ TCID <sub>50</sub> /2 ml
Transferencia de IVP:	Dos viales que contenían 35 ml de cada IVP se transfirieron al sitio de estudio en D0 justo antes de la vacunación.
Retención de IVP:	Una muestra de retención de cada IVP se guarda actualmente a $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ en BIVI-Ames hasta que se haya firmado el informe final.

Tabla 6.6 Producto de control (CP)

<b>Nombre del producto genérico:</b>	<b>Placebo</b>
Formulación:	La producción de BIVI produjo producto de placebo liofilizado que contenía material inerte que consistía en la serie de vacuna sin MLV contra el PRRSV 94881 (lote N240-191-062409) En D0, BIVI-Ames reconstituyó el lote N240-191-062409 con diluyente con adyuvante de carbopol estéril, lote 808-002, para formular el CP, lote n° 270-141.
Fabricante:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506, EE.UU.
Número de lote:	N270-141
Fecha de caducidad:	Se asignó una fecha de caducidad del 22 de julio de 2010 al CP sólo para fines de estudio.
Condiciones de almacenamiento:	Vacuna liofilizada: 2-8°C CP rehidratado: 2-8°C o sobre hielo
Pruebas:	CP se probó por BIVI-QC para la esterilidad según EP según Resumen especial n° 96



Resultados de las pruebas:	Se determinó que CP era estéril
Transferencia de CP:	Dos viales que contenían 50 ml cada uno de CP se transfirieron al sitio de estudio en D0 justo antes de la vacunación.
Retención de CP:	CP sólo se formuló para el estudio y no se retuvo.

Material de exposición

Tabla 6.7 Material de exposición

Nombre/número de la cepa aislada	Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino
Localización y fecha del aislamiento, incluidos síntomas clínicos	Cepa aislada 190136, pase 2. La cepa aislada nº 190136 se obtuvo del tejido de pulmón de un lechón recién nacido de una granja que mostraba signos reproductivos típicos de PRRS (abortos en cerdas jóvenes y debilidad en lechones recién nacidos) durante un brote en baja Sajonia, Alemania, en abril de 2004. Los veterinarios enviaron las muestras a BioScreen (la muestra llegó el 21 de abril de 2004). La cepa aislada nº 90136 podría propagarse directamente en células AK-MA104.
Formulación:	El virus de exposición se descongeló y se diluyó con MEM (medio esencial mínimo) a un título elegido como diana de aproximadamente $1 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub> /3 ml en D118. Se preparó un volumen adecuado de material de exposición. Se tomaron dos alícuotas del material de exposición.
Número de lote:	N289-034
Fabricante:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. – EE.UU.
Condiciones de almacenamiento	Se almacenó material de exposición a granel a $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ . Una vez preparado, el material de exposición diluido se mantuvo sobre hielo hasta que se administró.
Pruebas:	Al principio y al final del método de exposición se contactó con BIVI-Ames. El personal del laboratorio de BIVI-Ames probó antes y después de la exposición alícuotas para el título de virus según el Método de títulos de PRRSv
Resultados de las pruebas:	El material de exposición tuvo un título medio de $1 \times 10^{6,30}$ TCID <sub>50</sub> /6 ml de dosis
Transferencia del material de exposición:	Tres viales que contenían 101 ml cada uno de material de exposición se transfirieron al sitio de estudio en D118 justo antes de la administración.
Vía de administración	2,0 ml/orificio nasal y 2,0 ml IM en el cuello izquierdo (administrado a todas las cerdas jóvenes en los Grupos 1, 2 y 3 en D118).
Retención del material de exposición:	El material de exposición sólo se formuló para este estudio y no se retuvo.

## 5 Tratamientos adicionales

Matrix™ (6,8 ml; Alternogest; Intervet/Schering Plough Animal Health) se administró a cada pienso para cerdas jóvenes de D8 a D21 para sincronizar los ciclos de celo.

- 10 Se administró oxitocina (VetTek) en el parto para ayudar a las cerdas jóvenes con el parto, pero no para iniciar el parto. En el parto, todos los lechones vivos recibieron 1,0 ml de inyección de hierro (Phoenix o Durvet), IM, en el jamón derecho para prevenir anemia por deficiencia de hierro poco después del nacimiento. Adicionalmente, todos los lechones vivos recibieron gentamicina (SparHawk Laboratories Inc) como un frotamiento preventivo poco después del nacimiento. Todos los tratamientos se registraron en el cuaderno de recogida de datos del tratamiento biológico y farmacéutico.

Tratamientos

## 15 Justificación de la dosificación

Cada IVP se administró como una dosis de 2,0 ml a cerdas jóvenes asignadas para evaluar la MID de MLV contra el 94881 del PRRS. Una dosis de 2,0 ml del CP se administró a cerdas jóvenes asignadas a los Grupos 1 y 4.

Pauta de dosificación

En D0, una persona que no recogía los datos del estudio administró cada IVP o CP a cada cerda joven respectiva IM

en la región derecha del cuello usando una jeringuilla Luer-lock de 3,0 ml estéril y una aguja de 18g x 1 pulgada (2,54 cm) estéril. La pauta de dosificación se muestra a continuación en la Tabla 6.8.

Tabla 6.8 Pauta de dosificación

Grupo	Número	Tratamiento	Dosis/vía	Día de estudio
1	28	CP	2,0 ml IM	D0
2	28	IVP n° 1 (dosis de título bajo)	2,0 ml IM	D0
3	28	IVP n° 2 (dosis de título alto)	2,0 ml IM	D0
4	10	CP	2,0 ml IM	D0

5 Métodos y precauciones para el personal del estudio

El personal que administra los IVP, el CP y el material de exposición se adhirió a precauciones de seguridad y vistió equipo de protección personal como se explica resumidamente para el sitio del estudio específico.

Información sobre los animales

Detalles de los animales del estudio

10 Tabla 6.9 Información sobre los animales

<b>Fuente:</b>	<b>Wilson Prairie View Farms N5627 Highway DD Burlington, WI 53105</b>	
Número de cerdas jóvenes:	94	
Fecha de llegada:	Las cerdas jóvenes llegaron a las instalaciones de Veterinary Resources, Inc. en dos envíos el 15 de julio de 2010 (D-7) y el 20 de junio de 2011 (D-2).	
Identificación:	Oreja etiquetada individualmente con un único número	
Especie:	Porcina	
Raza:	Cruzada comercial	
Sexo:	Hembras	
Intervalo de edad:	Aproximadamente 8 meses de edad en D0	
Propietario de los animales de prueba:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.	
Estado fisiológico:	Todas las cerdas jóvenes fueron seronegativas por ELISA para PRRS en D0. Las cerdas jóvenes seleccionadas para la asignación al estudio fueron observadas por el investigador del estudio en D-2 o D-1 y determinó que estaban en buen estado de salud y nutricional.	
Resultados del embarazo:	Las cerdas jóvenes se comprobaron para el embarazo en D84.	
Asignaciones de cerdas jóvenes a grupos en D0	Grupo 1 (n=28): 1, 3, 5, 6, 8, 11, 15, 18, 19, 34, 35, 39, 40, 52, 54, 68, 79, 82, 88, 90, 95, 96, 98, 101, 102, 107, 109 y 110	Grupo 2 (n=28): 12, 26, 31, 32, 41, 47, 49, 56, 58, 59, 60, 64, 67, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 85, 89, 93, 94, 100, 103 y 104
	Grupo 3 (n=28): 2, 7, 14, 22, 23, 25, 27, 28, 30, 33, 36, 42, 46, 48, 51, 53, 57, 61, 62, 65, 66, 80, 84, 86, 91, 92, 105 y 106	Grupo 4 (n=10): 4, 10, 13, 16, 17, 20, 21, 24, 29 y 108
N° de cerdas jóvenes a grupos restantes en el estudio en D118	Grupo 1 (n=16): 1, 6, 11, 18, 19, 40, 54, 68, 79, 82, 88, 95, 96, 98, 102 y 107	Grupo 2 (n=16): 12, 26, 31, 32, 41, 47, 49, 58, 64, 67, 72, 85, 89, 93, 100 y 104
	Grupo 3 (n=16): 7, 14, 23, 27, 33, 36, 46, 48, 57, 61, 62, 65, 66, 84, 92 y 106	Grupo 4 (n=5): 4, 13, 16, 17 y 108

Criterios de inclusión/exclusión

Todas las cerdas jóvenes enroladas en este estudio fueron negativas por ELISA para PRRS, sin reproducir y estuvieron sanas en el momento de la vacunación como se ha determinado por observación.

Descarte después de la inclusión de cerdas jóvenes

Cinco (5) cerdas jóvenes del Grupo 1 (nº 5, 15, 34, 35 y 52), dos (2) cerdas jóvenes del Grupo 2 (nº 77 y 94), tres (3) cerdas jóvenes del Grupo 3 (nº 2, 25 y 30) y una (1) cerda joven del Grupo 4 (nº 20) no mostraron celo y posteriormente no se reprodujeron. Estas cerdas jóvenes se sacaron del estudio en D47.

- 5 Dos (2) cerdas jóvenes del Grupo 1 (nº 109 y 110), nueve (9) cerdas jóvenes del Grupo 2 (nº 56, 59, 60, 69, 73, 75, 76, 78 y 103), cuatro (4) cerdas jóvenes del Grupo 3 (nº 22, 28, 51 y 53) y una (1) cerda joven del Grupo 4 (nº 21) se sacaron del estudio en D89 debido a cojera, no estaban preñadas o reproducción tardía.

- 10 El protocolo del estudio estableció que si > 16 cerdas jóvenes preñadas por grupo para los Grupos 1-3 estaban todavía en el estudio antes de la exposición, se seleccionarían aleatoriamente cerdas jóvenes para ser sacadas del estudio; quedando así 16 cerdas jóvenes preñadas por grupo para los Grupos 1-3. Cinco (5) cerdas jóvenes del Grupo 1 (nº 3, 8, 39, 90 y 101), una (1) cerda joven del Grupo 2 (nº 70) y cinco (5) cerdas jóvenes del Grupo 3 (nº 42, 80, 86, 91 y 105) se sacaron del estudio en D104 basándose en las aleatorizaciones por el estadístico o selección por personal que no es del estudio, reduciéndose el tamaño del grupo a 16 cerdas jóvenes para los Grupos 1-3.

- 15 Debido a limitaciones de espacio, el investigador del estudio solicitó que el tamaño del Grupo 4 se redujera de ocho (8) a cinco (5). El estadístico seleccionó aleatoriamente tres (3) cerdas jóvenes (nº 10, 24 y 29) para ser sacadas del estudio, que se sacaron en D109.

Manipulación y alojamiento de los animales

Alojamiento de los animales

- 20 Cerdas jóvenes con título bajo de IVP se alojaron en las Habitaciones 1 y 2, y cerdas jóvenes con título alto de IVP se alojaron en las Habitaciones 3 y 4, en el Edificio CB en VRI-Cambridge a partir de D-1 para completar el estudio. Las cerdas jóvenes asignadas a los grupos de control de exposición y de control negativo se alojaron en una única habitación en VRI-Risdal de D-1 a D85. En D85, el resto de las cerdas jóvenes en los grupos de control de exposición y de control negativo se movieron a VRI-Cambridge. Dieciséis (16) cerdas jóvenes de control de exposición se alojaron en el Edificio CB, Habitaciones 5-8, y ocho (8) cerdas jóvenes de control negativo se alojaron en el Edificio CA, Habitación 12, para el resto del estudio. De D85 en adelante, cada habitación fue idéntica en distribución con dos filas de 4 cajones de parto por fila. Cada cajón contuvo una cerda joven y su progenie. Cada cajón tenía aproximadamente 5 pies x 7 pies (1,5 m x 2,1 m) de tamaño, estaba elevada por encima del suelo, paneles de barras metálicas para los lados y malla de plástico para el revestimiento del suelo. No hubo contacto hocico con hocico entre cajones adyacentes. El suelo de cada cajón se lavó al menos una vez al día para eliminar excrementos y residuos. Cada habitación tenía calefacción y ventilación separadas, previniéndose la contaminación cruzada de aire entre habitaciones. Cada habitación se limpió y se desinfectó antes de uso para este estudio. El personal de los servicios de animales se duchó y se puso ropas limpias antes de entrar en cada habitación.

- 35 El aislamiento del grupo de tratamiento fue necesario en este estudio ya que es muy conocido dentro de la comunidad científica que el PRRSv se propaga fácilmente de cerdo a cerdo por diversos mecanismos que incluyen la aerosolización. Esto incluye vacunas contra el PRRS vivas avirulentas ya que estos productos biológicos incluyen partículas víricas atenuadas que imitan las características del PRRS natural virulento sin la capacidad para producir enfermedad. Los métodos apropiados fueron *in situ* para garantizar que se mantenía la bioseguridad y que los animales vacunados no se contaminaban accidentalmente de forma cruzada con animales de control negativo sin tratamiento previo contra el PRRSv no vacunados.

- 40 Cada habitación en la instalación tiene ventiladores y calefactores para ayudar en la suficiente circulación y el calentamiento del aire. El sistema de ventilación es separado aunque idéntico para cada habitación, por lo que el aire no es compartido entre habitaciones. El pienso sólido se almacenó en bolsas, libres de bichos. El agua estaba a voluntad de un pozo localizado en la instalación para animales. Las cerdas jóvenes se alimentaron con una ración de gestación o lactación sin medicar comercialmente preparada (Heart of Iowa Cooperative, Roland, IA) apropiada para su tamaño, edad y condición.

- 50 Las cerdas jóvenes tenían buen estado de salud y nutricional antes de iniciarse el estudio como se ha determinado por el investigador del estudio. Durante el estudio se observaron dos cerdas jóvenes con una leve cojera y se observó una cerda joven con una hinchazón en la región izquierda del cuello. El investigador del estudio consideró que todo esto eran condiciones no específicas que comúnmente se producían en grupos de cerdas jóvenes alojadas en confinamiento. El investigador del estudio determinó que no se requerían tratamientos concomitantes para ningún animal durante este estudio.

- 55 Todas las cerdas jóvenes y sus cerdos asignados a los Grupos 1-3 fueron desechadas por incineración comercial después de la eutanasia. Las cerdas jóvenes asignadas al Grupo 4 fueron desechadas procesándolas después de la eutanasia. Los lechones del Grupo 4 no se sacrificaron y se desecharon, sino que se asignaron a otro proyecto de BIVI. Ningún producto alimenticio de los animales enrolados en este estudio entró en la cadena alimentaria humana.

Evaluación de la eficacia

5 Para evaluar la MID de MLV contra el 94881 del PRRS, el grupo de título bajo (Grupo 2) y el grupo de título alto (Grupo 3) se expusieron en D118 y se evaluaron el rendimiento reproductivo y los lechones destetados después de la exposición. Los criterios primarios para satisfacer este objetivo fueron que uno o ambos grupos de vacunas debían demostrar porcentaje o número estadísticamente mayor de lechones nacidos vivos y lechones destetados a los 20 días de edad (DOF +20) en comparación con el grupo de control de exposición (Grupo 1).

10 Otros parámetros analizados para soportar la eficacia entre grupos de vacunas y el grupo de control de exposición incluyeron evaluaciones clínicas de cerdas jóvenes después de la vacunación, serología del PRRS de cerdas jóvenes, viremia de cerdas jóvenes, observaciones clínicas de cerdas jóvenes después de la exposición, viremia de lechones en el parto, número total de lechones por camada, lechones sanos vivos por camada, lechones vivos débiles por camada, momias por camada, lechones nacidos muertos por camada, lechones aplastados/mortalidades por camada, observaciones clínicas de lechones y ADWG de lechones.

Criterios para una prueba válida

15 El grupo de control negativo (Grupo 4) no se incluyó en ningún análisis. El grupo de control negativo se incluyó en el estudio para demostrar que las cerdas jóvenes fuente fueron negativas para PRRS en el momento en el que los otros tres grupos se expusieron. Además, el grupo de control negativo tuvo que seguir siendo negativo para PRRS hasta que se completara el estudio para excluir una posible introducción de un PRRSv del campo o contaminación cruzada accidental de grupos expuestos.

20 Se requirió que todas las muestras de suero antes de la compra y en D0 fueran negativas para anticuerpos del PRRS. Las muestras de suero recogidas de los Grupos 1 y 4 hasta el día de la exposición y del Grupo 4 hasta que se completara el estudio tuvieron que estar libres de anticuerpos del PRRS para que el estudio fuera válido.

Parámetros de resultados primarios

25 Las variables de eficacia primaria para la evaluación estadística fueron lechones vivos por cerda joven en el nacimiento (número medio o porcentaje) y lechones vivos por camada en DOF +20 (número medio y porcentaje).

9.2.1 Porcentaje de lechones vivos en el nacimiento por cerda joven

30 Los datos del parto se registraron para cada cerda joven durante el estudio. El día del parto (DOF) para cada cerda joven se definió como el día en el que nació el primer lechón. En el momento del parto, cada lechón se clasificó en una de cinco categorías enumeradas a continuación en la Tabla 6.10. Un lechón vivo en el nacimiento se definió como cualquier lechón que recibió una escala de observación en el nacimiento como lechón vivo sano, lechón vivo débil o lecho aplastado/mortalidad (la muerte debida a aplastamiento se confirmó en la autopsia como se ha descrito más adelante). Las observaciones se realizaron por el investigador del estudio o un representante y se registraron en el cuaderno de recogida de datos del parto/procesamiento de la camada.

Tabla 6.10 Categorías del resultado del parto

Término	Definición
Momia	Un feto momificado que no se ha desarrollado completamente y que presenta una grave autólisis o un feto completamente desarrollado que presenta un aspecto verde plomizo brillante y sin pelo o con muy poco pelo
Lechón nacido muerto	Un lechón muerto completamente desarrollado con pelo
Lechón vivo débil	Un lechón delicado que no puede mamar ni caminar
Lechón vivo sano	Un lechón lactante sano que puede caminar
Aplastado/mortalidad	Un lechón completamente desarrollado que parece haber muerto poco después del parto debido a que ha sido aplastado por la cerda joven

35 Lechones vivos por camada en DOF +20

Los lechones se observaron para signos clínicos de enfermedad como se explica más adelante en la Tabla 6.11 de DOF+1 a DOF+20. Las observaciones se realizaron por el investigador del estudio o representantes y se registraron en el cuaderno de recogida de datos de observaciones clínicas.

Tabla 6.11 Sistema de puntuación de observaciones clínicas

Respiración	Comportamiento	Tos
0 = respiración normal	0 = normal	0 = ninguna
1 = respiración jadeante/rápida	1 = letargo de leve a moderado	1 = tos suave o intermitente
2 = disnea	2 = gravemente letárgico o recostado	2 = tos áspera o grave, repetitiva
3 = muerto	3 = muerto	3 = muerto

5 Una puntuación de observación clínica total diaria se determinó como una suma de las puntuaciones de respiración, comportamiento y tos por el estadístico usando el programa SAS. Cualquier lechón que recibió una puntuación clínica de cero a ocho en DOF+20 se evaluó como vivo en DOF+20.

Parámetros de apoyo

10 Otros parámetros analizados entre grupos de vacunas y el grupo de control de exposición incluyeron evaluaciones clínicas de cerdas jóvenes después de la vacunación, serología del PRRS de cerdas jóvenes, viremia de cerdas jóvenes, observaciones clínicas de cerdas jóvenes, viremia de lechones, lechones totales por camada, lechones sanos vivos por camada, lechones vivos débiles por camada, momias por camada, lechones nacidos muertos por camada, lechones aplastados/mortalidades por camada, observaciones clínicas de lechones y aumento de peso diario promedio (ADWG) de lechones.

Evaluaciones diarias de las cerdas jóvenes

15 Todas las cerdas jóvenes se observaron una vez al día de D-1 a D21 y de D22 a 115 al menos tres veces a la semana para evaluaciones diarias después de la vacunación por el investigador del estudio o representantes. Las observaciones se registraron en el cuaderno de recogida de datos de la evaluación diaria.

Serología del PRRS en cerdas jóvenes

20 Se recogió sangre venosa completa de cerdas jóvenes antes de la compra y en D0, D7, D14, D21, D56, D84, D118, D125, D132, DOF 0, DOF+7, DOF+13 y DOF+20. Las recogidas de sangre de cerdas jóvenes en el momento del parto/abortos (DOF 0) se realizaron inmediatamente después de completarse el parto/abortos o hasta 8 horas después del parto/aborto.

25 Brevemente, se recogieron aproximadamente 10 ml de sangre de cada cerda joven en un tubo(s) separador(es) de suero (SST) de tamaño apropiado. Se registraron las recogidas de muestras en el cuaderno de recogida de datos de la recogida de muestras. Se dejó que la sangre coagulara a temperatura ambiente en los SST. Las muestras de sangre recogidas los días de diario se llevaron a BIVI-Ames el día de la recogida. Las muestras de sangre recogidas los fines de semanas fueron procesadas por el personal de VRI el día de la recogida. Las muestras de suero en VRI se mantuvieron a 2-8°C. En tanto BIVI-Ames como VRI, las muestras de sangre se centrifugaron y el suero se recogió, se fraccionó y se transfirió a tubos apropiados. Cada tubo se etiquetó con el número de ID de la cerda joven, el número de estudio, la fecha de recogida, el día de estudio y el tipo de muestra. Las muestras de suero en VRI fueron llevadas a BIVI-Ames lo antes posible. Un cuaderno de recogida de datos de la entrega de especímenes completo se incluyó con cada envío. En BIVI-Ames, un conjunto de muestras de suero se mantuvo a 2-8°C y el otro conjunto de muestras de suero se mantuvo a -70 ± 10°C.

35 El conjunto de muestras de suero de cerdas jóvenes mantenido a 2-8°C se probó por BIVI-Ames para anticuerpos del PRRS. Los resultados se informaron como negativos (relación S/P de ELISA de < 0,4) o positivos (relación S/P de ELISA de ≥ 0,4).

Observaciones clínicas de cerdas jóvenes después de la exposición

40 Se observaron cerdas jóvenes para signos clínicos de enfermedad de D116 a DOF+20. Las observaciones se realizaron por el investigador del estudio o representantes. Se observaron cerdas jóvenes cada día para respiración, comportamiento y tos basándose en el sistema de puntuación de observaciones clínicas explicado anteriormente en la Tabla 6.11.

Viremia del PRRS en lechones

45 Se recogió sangre venosa completa de lechones en DOF 0, DOF+7, DOF+13 y DOF+20, o cuando un lechón se encontró muerto. Se prefirió la recogida de sangre pre-colostral de lechones recién nacidos, pero no fue obligatorio. Si no pudo cogerse la sangre pre-colostral, fue permisible la sangre peri-natal en el plazo de 12 horas desde el parto. Las muestras no recogidas antes de la primera lactancia se marcaron como “peri-natales” y se guardaron

separadas de las muestras pre-colostrales.

5 Brevemente, se recogieron aproximadamente 2,0 a 2,5 ml de sangre de cada lechón vivo en un tubo(s) separador(es) de suero (SST) de tamaño apropiado. Se recogieron un mínimo de 5,0 ml de sangre de cada lechón en DOF +20 justo antes de la eutanasia. Se recogió sangre de cada momia o lechón nacido muerto, o si la sangre no pudo recogerse de un feto muerto se recogió líquido torácico o abdominal. Se registraron las recogidas de muestras en el cuaderno de recogida de datos de la recogida de muestras.

Aumento de peso diario promedio del lechón

10 Los lechones individuales se pesaron en DOF 0 y DOF+20, o en el día en el que un lechón se encontró muerto, por el investigador del estudio o representantes. Los pesos corporales individuales en DOF 0 se registraron en el cuaderno de recogida de datos del parto/procesamiento de la camada y los pesos corporales después de DOF 0 se registraron en el cuaderno de recogida de datos del peso corporal.

Cuantificación del virus PRRS en tejido de pulmón

15 El investigador del estudio hizo la autopsia de todos los lechones muertos en el parto o que murieron antes de DOF+20. Los resultados de la autopsia y un diagnóstico se registraron en el cuaderno de recogida de datos de la autopsia. Se recogieron dos muestras de pulmón de cada lechón al que se le hizo la autopsia. Una muestra se colocó en un recipiente Whirlpak® separado y la otra muestra se colocó en un recipiente apropiado lleno de un volumen suficiente de 10% de formalina. Se registraron las recogidas de muestras en el cuaderno de recogida de datos de la autopsia.

20 Los recipientes Whirlpak® y con formalina se etiquetaron apropiadamente con el número de animal, número de estudio, fecha de muestreo, día de estudio, tipo de muestra y si las muestras fueron del lado izquierdo, lado derecho o ambos. Las muestras en Whirlpak® se almacenaron a  $-70 \pm 10^{\circ}\text{C}$  y las muestras en 10% de formalina se almacenaron a temperatura ambiente hasta que se llevaron a BIVI-Ames. Un cuaderno de recogida de datos de la entrega de especímenes completo se incluyó con cada envío de muestras. En BIVI-Ames, las muestras en Whirlpak® se almacenaron a  $-70 \pm 10^{\circ}\text{C}$  hasta que se enviaron de BIVI-Ames a Alemania, y las muestras fijadas en formalina se almacenaron en BIVI-Ames a temperatura ambiente.

Después de completarse el estudio, las muestras de tejido congeladas en Whirlpak® se enviaron y se probaron como se ha descrito anteriormente.

30 Las muestras de tejido fijadas en formalina se enviaron a ISU VDL en el plazo de una semana desde la recogida para incorporarlas en bloques de parafina. Los tejidos en bloques de parafina se devolvieron a BIVI y actualmente son guardados por BIVI-Ames a temperatura ambiente para posibles pruebas futuras. El patrocinador y el monitor del estudio tomarán la decisión de si retener estas muestras o desecharlas después de que se haya completado el informe del estudio.

Acontecimientos adversos

35 No se informó de acontecimientos adversos atribuidos a los IVP durante este estudio. Para más información sobre los acontecimientos adversos véase la Sección 12.6 Evaluaciones de cerdas jóvenes después de la vacunación.

Métodos estadísticos

Unidad experimental

40 Los grupos de tratamiento tuvieron que alojarse en habitaciones separadas en este estudio para evitar la transmisión de la vacuna contra el PRRSv viva a grupos no vacunados. Por tanto, la habitación fue la unidad experimental. Sin embargo, para los fines de este análisis se ignoró un posible sesgo debido a confundir los efectos de "habitación" y "tratamiento", y la cerda joven y su camada correspondiente se analizaron como unidad experimental.

Aleatorización

45 Noventa y cuatro (94) cerdas jóvenes seronegativas para PRRS de un conjunto de 107 cerdas jóvenes elegibles para la prueba se asignaron aleatoriamente a uno de los 4 grupos antes de D0. Los Grupos 1-3 estuvieron cada uno constituido por 28 cerdas jóvenes. El Grupo 4 estuvo constituido por 10 cerdas jóvenes. Para el Grupo 1, el nº 45 y 55 fueron excluidos por el gerente de la granja antes del envío debido a motivos de salud y se sustituyeron por dos cerdas jóvenes adicionales, el nº 15 y 18, respectivamente. Para el Grupo 3, la cerda joven nº 44 fue excluida por el gerente de la granja antes del envío debido a motivos de salud y se sustituyó por la cerda joven adicional nº 25.

50 Debido a limitaciones de espacio en el momento de la exposición, los Grupos 1-3 se limitaron a 16 cerdas jóvenes por grupo y el Grupo 5 se limitó a 5-8 cerdas jóvenes. En D85, 16 cerdas jóvenes por grupo se seleccionaron aleatoriamente para seguir en el estudio para los Grupos 1-3. Como el Grupo 4 estaba constituido por 8 cerdas jóvenes en D85, este grupo no se redujo más por la aleatorización. Después, el investigador del estudio pidió que se redujera el Grupo 4 de 8 cerdas jóvenes a 5 cerdas jóvenes. En D109, 5 cerdas jóvenes fueron seleccionadas

aleatoriamente para seguir en el estudio para el Grupo 4.

Todos los métodos de aleatorización fueron realizados por un bioestadístico.

#### Análisis

5 Los análisis estadísticos y los resúmenes de datos se realizaron por Dr. rer. hort. Martin Vanselow, Biometrie & Statistik, Zum Siemenshop 21, 30539 Hannover, Alemania, +49(0) 511 606 777 650, [m.vanselow@t-online.de](mailto:m.vanselow@t-online.de).

10 El objetivo principal del análisis estadístico fue la comparación de dos grupos de vacunas MLV contra el PRRSV 94881 (Grupos 2 y 3) con un grupo de control expuesto sin vacunar (Grupo 1). Todos los datos fueron importados a SAS para la gestión y la evaluación. Los datos fueron recibidos del patrocinador del estudio en forma de conjuntos de datos de SAS verificados. Los casos que se habían extraído del estudio se consideraron para el parámetro de análisis respectivo hasta la fecha de exclusión. Todos los datos se resumieron descriptivamente (n, mínimo, máximo, media, mediana, desviación estándar, rango de intercuartiles, o distribuciones de frecuencia, intervalo de confianza) basándose en el tipo de variable. Los análisis estadísticos se realizaron usando la versión del software SAS 8.2 (SAS, 2001, Cary, Carolina del Norte, EE.UU.: SAS Institute Inc.).

Variables para la evaluación estadística del estudio:

15 Variables primarias

Proporciones de lechones vivos en el parto/aborto (DOF+0)

Proporciones de lechones vivos a los 20 días de edad (DOF+20)

Variables de apoyo

Evaluaciones clínicas de cerdas jóvenes después de la vacunación

20 Serología del PRRS en cerdas jóvenes

Viremia de cerdas jóvenes

Observaciones clínicas de cerdas jóvenes

Viremia de lechones

Rendimiento reproductivo

25 Observaciones clínicas de lechones

Aumento de peso diario promedio (ADWG) de lechones

Hipótesis que van a probarse y suposiciones hechas:

30 El grupo de control negativo sin exponer (Grupo 4) se excluyó de las pruebas estadísticas. Los grupos de título bajo y título alto (Grupos 2 y 3, respectivamente) se compararon con el grupo de control de exposición (Grupo 1). Todas las pruebas entre los grupos se diseñaron como pruebas bilaterales en las diferencias. En el caso de todas las pruebas, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas sólo si  $P \leq 0,05$ . La eficacia se demostró si el porcentaje o número de lechones nacidos vivos y el porcentaje o número de lechones destetados en DOF+20 era significativamente mayor para uno o ambos grupos de vacunas en comparación con el grupo de control expuesto.

Detalles sobre las manipulaciones y evaluación de datos:

35 Evaluaciones clínicas de cerdas jóvenes después de la vacunación

Se generaron tablas de frecuencias de animales con al menos un hallazgo positivo entre los días de estudio 1 y 21 y entre los días de estudio 1 y 113. Las diferencias entre los grupos de control de exposición y los grupos de vacunas se probaron por la prueba exacta de Fisher.

Observaciones clínicas de cerdas jóvenes después de la exposición

40 Se generaron tablas de frecuencias de animales con al menos un hallazgo positivo entre día de estudio 116 y DOF+20. Las diferencias entre el grupo de control de exposición y los grupos de vacunas se probaron por la prueba exacta de Fisher.

Serología de cerdas jóvenes

45 Se generaron tablas de frecuencias de resultados "positivos" por ELISA en los días de estudio 7, 14, 21, 56, 84, 118, 125, 132 (antes del parto) y DOF+0, DOF+7, DOF+13 y DOF+20. Las diferencias entre los grupos de control de

exposición y los grupos de vacunas se probaron por la prueba exacta de Fisher.

#### Viremia en cerdas jóvenes

5 Los datos de viremia se evaluaron para cada día de investigación por separado (días del estudio antes del parto 7, 14, 21, 56, 84, 118, 125, 132 y DOF+0, DOF+7, DOF+13 y DOF+20). Para la evaluación cualitativa de los datos por qPCR, los resultados analíticos 'no detectado' ('n.d.') y 'negativo' se clasificaron como 'negativos' y los resultados analíticos 'positivo' y un valor medido se clasificaron como 'positivos'. Para la evaluación cuantitativa, 'no detectado' ('n.d.') y 'negativo' se sustituyeron por un valor de  $\log_{10}$  GE/ml de 0,0 y 'positivo' se sustituyó por 3,0. Los datos de PCR cuantitativa (carga vírica del PRRS [ $\log_{10}$  GE/ml]) se usaron para comparaciones entre los grupos de control de exposición (Grupo 1) y de tratamiento 2 y 3 usando la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney. Se generaron tablas de frecuencias de resultados 'positivos' por qPCR. Las diferencias entre el grupo de control de exposición y los grupos de vacunas se probaron por la prueba exacta de Fisher.

#### Rendimiento reproductivo

15 Se determinaron las frecuencias absolutas por cerda joven de número total, lechones vivos, sanos, débiles, nacidos muertos, muertos y vivos en DOF+20 y se usaron como valores individuales para las comparaciones entre grupos. Las frecuencias relativas por cerda joven de lechones vivos, sanos, débiles, nacidos muertos y muertos se calcularon en relación con el número total de lechones en el parto y se usaron como valores individuales para las comparaciones entre grupos. El porcentaje de lechones vivos por camada en DOF+20 se calculó en relación con el número de lechones vivos en el parto menos el número de mortalidades y lechones aplastados. Las diferencias entre el grupo de control de exposición y los grupos de vacunas se probaron por la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney.

#### Viremia en lechones

25 Los datos de viremia se evaluaron para cada día de investigación por separado (DOF+0, DOF+7, DOF+13 y DOF+20). Para la evaluación cualitativa de los datos por qPCR, los resultados analíticos 'no detectado' ('n.d.') y 'negativo' se clasificaron como 'negativos' y los resultados analíticos 'positivo' y un valor medido se clasificaron como 'positivos'. Se calcularon los porcentajes de lechones 'positivos' por camada y se usaron como valores individuales para las comparaciones entre grupos por la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney. Para la evaluación cuantitativa, 'no detectado' ('n.d.') y 'negativo' se sustituyeron por un valor de  $\log_{10}$  GE/ml de 0,0 y 'positivo' se sustituyó por 3,0. Se calcularon las medianas de valores de qPCR por camada y se usaron como valores individuales para las comparaciones entre grupos por la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney. Para las estadísticas resumidas se usaron los datos de qPCR individuales. Las cargas víricas en muestras de pulmón sólo se evaluaron descriptivamente.

#### Peso corporal y aumento de peso diario promedio de lechones

35 Los aumentos de peso diarios promedio (ADWG) individuales se calcularon para los periodos de tiempo entre DOF+0 y DOF+20. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se probaron por análisis de la varianza (ANOVA) y posteriores pruebas de la t. Las medias por mínimos cuadrados de los grupos y las diferencias entre las medias por mínimos cuadrados con intervalos de confianza de 95% se derivaron de ANOVA. El análisis para DOF+20 y ADWG se repitió con peso en DOF+0 como una covariable. Los datos de peso de lechones por cerda joven se resumieron descriptivamente.

#### Observaciones clínicas de lechones

40 Se calculó el porcentaje de lechones por camada con al menos un hallazgo positivo entre los días de estudio DOF+1 y DOF+20 y se usó como valores individuales para las comparaciones entre grupos por la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney. Los datos se analizaron suponiendo una estructura de diseño completamente aleatoria.

#### Resultados

##### Rendimiento reproductivo de cerdas jóvenes

45 Los porcentajes medios de lechones vivos por camada en el parto (sanos + débiles + aplastados/mortalidad) fueron 54,4%, 75,1%, 72,3% y 93,0% para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. Los grupos de título bajo y de título alto tuvieron significativamente mayor porcentaje de lechones vivos por camada en el parto en comparación con el grupo de control de exposición ( **$P \leq 0,0455$** ). El número medio de lechones vivos por camada en el parto fueron 6,5, 8,3, 8,6 y 10,8 para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos para el número de lechones vivos por camada en el parto ( $P \geq 0,1039$ ).

50 Los porcentajes medios de lechones sanos vivos por camada fueron 41,4%, 65,8%, 67,9% y 93,0% para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. Los grupos de título bajo y de título alto tuvieron significativamente mayores porcentajes de lechones sanos vivos por camada en el parto en comparación con el grupo de control de exposición ( **$P \leq 0,0138$** ). El número medio de lechones sanos vivos por



camada en el parto fueron 4,9, 7,2, 8,1 y 10,8 para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. El grupo de título alto tuvo un número significativamente mayor de lechones sanos vivos por camada en el parto (**P=0,0211**), mientras que no se detectó diferencia para el grupo de título bajo en comparación con el grupo de control de exposición (P=0,0640).

5 Los porcentajes medios de lechones vivos débiles por camada en el parto fueron 7,4%, 7,1%, 0,4% y 0,0% para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. El número medio de lechones vivos débiles por camada en el parto fue 0,9, 0,8, 0,1 y 0,0 para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. El grupo de título alto tuvo significativamente menor porcentaje y número de lechones vivos débiles por camada en el parto en comparación con el grupo de control de exposición (**P≤0,0090**). En cambio, no se detectaron diferencias entre el grupo de título bajo y el grupo de control de exposición para el porcentaje o número de lechones vivos débiles en el parto (P≥0,8569).

10 Los porcentajes medios de momias por camada en el parto fueron 28,1%, 14,1%, 8,7%, y 0,0% para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. El número medio de momias por camada en el parto fue 3,1, 1,6, 0,9 y 0,0 para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. Tanto los grupos de título bajo como de título alto tuvieron porcentajes y números de momias significativamente menores por camada en el parto en comparación con el grupo de control de exposición (**P≤0,0190**).

15 No se detectaron diferencias significativas entre los dos grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición para el porcentaje o número de lechones nacidos muertos o mortalidades/aplastados por camada en el parto (P≥0,1681).

20 Un resumen de los resultados del rendimiento reproductivo por grupo (% de lechones por camada y número de lechones por camada) en el DOF se muestra a continuación en las Tablas 6.12 y 6.13.

Tabla 6.12 Resumen de los resultados del rendimiento reproductivo por grupo (% de lechones por camada) en el DOF

Lechones	Grupo*	N	Mín.	Máx.	Mediana	Media	IC de 95%		DE	P
<b>Vivos</b>	1	16	0	92	57,3	54,4	41,1	67,7	24,91	
	2	16	33	100	81,9	75,1	64,5	85,7	19,88	<b>0,0184</b>
	3	16	17	100	75,6	72,3	59,5	85,1	24,01	<b>0,0455</b>
	4	5	83	100	91,7	93,0	84,2	101,8	7,11	
<b>Sanos</b>	1	16	0	92	48,1	41,4	27,5	55,3	26,13	
	2	16	8	92	71,4	65,8	52,2	79,5	25,57	<b>0,0138</b>
	3	16	17	100	71,8	67,9	54,4	81,3	25,25	<b>0,0082</b>
	4	5	83	100	91,7	93,0	84,2	101,8	7,11	
<b>Débiles</b>	1	16	0	25	3,6	7,4	2,6	12,2	9,04	
	2	16	0	25	0,0	7,1	2,1	12,2	9,43	0,9441
	3	16	0	7	0,0	0,4	-0,5	1,3	1,67	<b>0,0024</b>
	4	5	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	
<b>Nacidos muertos</b>	1	16	0	50	9,5	17,5	8,5	26,4	16,83	
	2	16	0	42	3,8	10,7	3,3	18,2	13,94	0,1965
	3	16	0	83	10,6	19,0	7,0	31,0	22,54	0,9033
	4	5	0	17	8,3	7,0	-1,8	15,8	7,11	
<b>Momias</b>	1	16	0	63	25,8	28,1	18,8	37,4	17,50	
	2	16	0	55	9,1	14,1	6,0	22,3	15,25	<b>0,0190</b>
	3	16	0	50	3,3	8,7	1,2	16,3	14,14	<b>0,0006</b>
	4	5	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	
<b>Mortalidades / Aplastados</b>	1	16	0	27	0,0	5,6	1,1	10,2	8,55	
	2	16	0	18	0,0	2,1	-0,6	4,8	5,07	0,2276
	3	16	0	25	0,0	4,0	0,1	7,8	7,25	0,6108
	4	5	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	
<b>Vivos en DOF+20</b>	1	15	0	100	33,3	43,6	23,0	64,3	37,28	
	2	16	13	100	84,5	73,8	58,5	89,2	28,80	<b>0,0203</b>
	3	16	44	100	86,6	83,8	75,1	92,5	16,37	<b>0,0022</b>
	4	5	100	100	100,0	100,0	100,0	100,0	0,00	

25 \*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo

Tabla 6.13: Resumen de los resultados del rendimiento reproductivo por grupo (nº de lechones por camada) en el DOF

Lechones	Grupo*	N	Min.	Máx.	Mediana	Media	IC de 95%		DE	P
<b>Total</b>	1	16	6	15	12,0	11,6	10,4	12,9	2,31	
	2	16	9	13	11,0	11,1	10,4	11,7	1,24	0,1857
	3	16	7	15	12,0	11,6	10,3	12,9	2,42	0,9623
	4	5	10	14	12,0	11,6	9,5	13,7	1,67	
<b>Vivos</b>	1	16	0	11	6,0	6,5	4,7	8,3	3,35	
	2	16	4	12	8,0	8,3	7,0	9,5	2,27	0,1543
	3	16	2	13	9,0	8,6	6,6	10,6	3,77	0,1039
	4	5	9	14	10,0	10,8	8,4	13,2	1,92	
<b>Sanos</b>	1	16	0	11	5,5	4,9	3,1	6,7	3,36	
	2	16	1	12	7,0	7,2	5,7	8,7	2,83	0,0640
	3	16	2	13	8,5	8,1	6,1	10,1	3,76	<b>0,0211</b>
	4	5	9	14	10,0	10,8	8,4	13,2	1,92	
<b>Débiles</b>	1	16	0	3	0,5	0,9	0,3	1,5	1,09	
	2	16	0	3	0,0	0,8	0,2	1,4	1,11	0,8569
	3	16	0	1	0,0	0,1	-0,1	0,2	0,25	<b>0,0090</b>
	4	5	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	
<b>Nacidos muertos</b>	1	16	0	6	1,0	2,0	0,9	3,1	2,03	
	2	16	0	5	0,5	1,3	0,4	2,1	1,65	0,1681
	3	16	0	10	1,0	2,1	0,8	3,5	2,58	0,9478
	4	5	0	2	1,0	0,8	-0,2	1,8	0,84	
<b>Momias</b>	1	16	0	7	3,0	3,1	2,1	4,1	1,89	
	2	16	0	6	1,0	1,6	0,7	2,5	1,67	<b>0,0125</b>
	3	16	0	4	0,5	0,9	0,2	1,5	1,20	<b>0,0003</b>
	4	5	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	
<b>Mortalidades / Aplastados</b>	1	16	0	3	0,0	0,7	0,1	1,2	1,01	
	2	16	0	2	0,0	0,3	-0,1	0,6	0,58	0,2200
	3	16	0	2	0,0	0,4	0,0	0,8	0,73	0,6115
	4	5	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	
<b>Vivos en DOF+20</b>	1	16	0	10	2,0	2,9	1,2	4,7	3,21	
	2	16	1	10	6,5	6,2	4,5	7,9	3,19	<b>0,0063</b>
	3	16	2	12	7,5	6,9	5,0	8,9	3,71	<b>0,0026</b>
	4	5	9	14	10,0	10,8	8,4	13,2	1,92	

\*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo

##### 5 Lechones vivos en dof+20

Estas puntuaciones ponen de relieve el número de lechones vivos en el destetamiento (20 días de edad). Un resumen del porcentaje por grupo y número de lechones vivos por camada en DOF+20 se muestra anteriormente en la Tablas 6.12 y 6.13.

- 10 Los porcentajes medios de lechones vivos por camada en el destetamiento (DOF+20) fueron 43,6%, 73,8%, 83,8% y 100,0% para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. El número medio de lechones vivos por camada en el destetamiento fue 2,9, 6,2, 6,9 y 10,8 para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. Tanto los grupos de título bajo como de título alto tuvieron porcentajes y números significativamente mayores de lechones vivos por camada en el destetamiento (DOF+20) en comparación con el grupo de control de exposición (**P≤0,0203**).

##### 15 Viremia por qPCR en cerdas jóvenes

Todas las cerdas jóvenes fueron negativas por qPCR para ARN del PRRSV en D0. Todas las cerdas jóvenes del

control de exposición y del control negativo siguieron siendo negativas por qPCR para ARN del PRRSv hasta e incluyendo el día de exposición (D118). El grupo de control negativo siguió siendo negativo por qPCR para el resto del estudio, con excepción de la cerda joven n° 108, que fue “positiva” en DOF+7. La cerda joven n° 108 fue negativa en otros momentos de tiempo para ARN del PRRSv por pruebas de qPCR.

5 Después de la vacunación, 50% y 36% de las cerdas jóvenes de título bajo y de título alto, respectivamente, fueron positivas por qPCR para ARN del PRRSv ( **$P \leq 0,0007$** ) en D7. De D14 a D56, sólo 4% de las cerdas jóvenes de título bajo siguió siendo positivas por qPCR, mientras que hasta 4% de las cerdas jóvenes de título alto fueron positivas por qPCR intermitentemente durante este periodo de observación. No se detectaron diferencias entre grupos de vacunas y el grupo de control de exposición de D14 a D56 para el porcentaje de cerdas jóvenes positivas por qPCR para ARN del PRRSv ( $P=1,0000$  o no se realizó la prueba). Todas las cerdas jóvenes vacunadas fueron negativas por qPCR para ARN del PRRSv en D84 y D118 (día de exposición).

15 Después de la exposición, los grupos de título bajo y alto tuvieron porcentajes estadísticamente menores de cerdas jóvenes positivas por qPCR para ARN del PRRSv en comparación con el grupo de control de exposición en los días 125, DOF 0 y DOF+13 ( **$P \leq 0,0155$** ). En D132, el grupo de título bajo tuvo un porcentaje significativamente menor de cerdas jóvenes positivas por qPCR para ARN del PRRSv ( **$P=0,0290$** ); mientras que no se detectó diferencia estadística entre el grupo de título alto y el grupo de control de exposición ( $P=0,1556$ ). No se detectaron diferencias significativas entre grupos de vacunas y el grupo de control de exposición en DOF+7 y DOF+20 para el porcentaje de cerdas jóvenes positivas por qPCR para ARN del PRRSv ( $P \geq 0,1719$ ).

20 Un resumen del porcentaje por grupo de cerdas jóvenes positivas por qPCR para ARN del PRRSv de D7 a DOF +20 se muestra a continuación en las Tablas 6.14 y 6.15.

Tabla 6.14 Resumen del porcentaje por grupo de cerdas jóvenes positivas por qPCR para ARN del PRRSv de D7 a D132

Día de estudio	Grupo*	N	%	IC de 95%		Total	P
<b>7</b>	1	0	0	0,0	12,3	28	
	2	14	50	30,6	69,4	28	<b>&lt;0,0001</b>
	3	10	36	18,6	55,9	28	<b>0,0007</b>
	4	0	0	0,0	30,8	10	
<b>14</b>	1	0	0	0,0	12,3	28	
	2	1	4	0,1	18,3	28	1,0000
	3	0	0	0,0	12,3	28	n.a.
	4	0	0	0,0	30,8	10	
<b>21</b>	1	0	0	0,0	12,3	28	
	2	1	4	0,1	18,3	28	1,0000
	3	1	4	0,1	18,3	28	1,0000
	4	0	0	0,0	30,8	10	
<b>56</b>	1	0	0	0,0	14,8	23	
	2	1	4	0,1	19,6	26	1,0000
	3	1	4	0,1	20,4	25	1,0000
	4	0	0	0,0	33,6	9	
<b>84</b>	1	0	0	0,0	14,8	23	
	2	0	0	0,0	13,2	26	n.a.
	3	0	0	0,0	13,7	25	n.a.
	4	0	0	0,0	33,6	9	
<b>118 (día de exposición)</b>	1	0	0	0,0	20,6	16	
	2	0	0	0,0	20,6	16	n.a.
	3	0	0	0,0	20,6	16	n.a.
	4	0	0	0,0	52,2	5	
<b>125</b>	1	16	100	79,4	100,0	16	
	2	5	31	11,0	58,7	16	<b>0,0001</b>
	3	4	25	7,3	52,4	16	<b>&lt;0,0001</b>
	4	0	0	0,0	52,2	5	

Día de estudio	Grupo*	N	%	IC de 95%		Total	P
132	1	10	63	35,4	84,8	16	
	2	3	19	4,0	45,6	16	<b>0,0290</b>
	3	5	31	11,0	58,7	16	0,1556
	4	0	0	0,0	52,2	5	

\*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV del PRRS 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo; n.a. = no aplicable, no se realizó la prueba

5 Tabla 6.15: Resumen del porcentaje por grupo de cerdas jóvenes positivas por qPCR para ARN del PRRSV de DOF 0 a DOF+20

Día de estudio	Grupo*	N	%	IC de 95%		Total	P
DOF+0	1	15	94	69,8	99,8	16	
	2	4	25	7,3	52,4	16	<b>0,0002</b>
	3	1	6	0,2	30,2	16	<b>&lt;0,0001</b>
	4	0	0	0,0	52,2	5	
DOF+7	1	5	31	11,0	58,7	16	
	2	2	13	1,6	38,3	16	0,3944
	3	1	6	0,2	30,2	16	0,1719
	4	1	20	0,5	71,6	5	
DOF+13	1	7	47	21,3	73,4	15	
	2	0	0	0,0	20,6	16	<b>0,0024</b>
	3	1	6	0,2	30,2	16	<b>0,0155</b>
	4	0	0	0,0	52,2	5	
DOF+20	1	3	19	4,0	45,6	16	
	2	3	19	4,0	45,6	16	1,0000
	3	0	0	0,0	20,6	16	0,2258
	4	0	0	0,0	52,2	5	

\*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo

10 Ambos grupos de vacunas tuvieron significativamente mayor mediana de las cargas víricas en comparación con el grupo de control de exposición en D7 (**P≤0,0007**). No se detectaron diferencias entre grupos de vacunas y el grupo de control de exposición de D14 a D56 para la carga vírica (P=1,0000). Todas las cerdas jóvenes vacunadas tuvieron carga vírica cero en D84 y D118 (día de exposición).

15 Después de la exposición, los grupos de título bajo y alto tuvieron medianas estadísticamente menores de las cargas víricas en comparación con el grupo de control de exposición en D125, DOF 0 y DOF+13 (**P≤0,0155**). En D132, el grupo de título bajo tuvo una mediana significativamente menor de la carga vírica (**P=0,0230**); mientras que no se detectó diferencia estadística entre el grupo de título alto y el grupo de control de exposición (0,94 y 1,97 log<sub>10</sub> GE/ml respectivamente; P=0,1144). No se detectaron diferencias significativas para la carga vírica entre grupos de vacunas y el grupo de control de exposición en DOF+7 y DOF+20 (P≥0,1719).

Un resumen de los resultados de qPCR en GE/ml de cerdas jóvenes medios por grupo de D7 a DOF +20 se muestra a continuación en las Tablas 6.16 y 6.17.

20 Tabla 6.16: Resumen de los resultados de qPCR de cerdas jóvenes por grupo (log<sub>10</sub> GE/ml) de D7 a D132

Día de estudio	Grupo*	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	P
7	1	28	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	2	28	0,00	3,00	1,500	0,000	3,000	3,000	1,500	<b>&lt;0,0001</b>
	3	28	0,00	3,00	0,000	0,000	3,000	3,000	1,071	<b>0,0007</b>
	4	10	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
14	1	28	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	2	28	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,107	1,0000

Día de estudio	Grupo*	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%	Rango de Q	Media	P
	3	28	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	1,0000
	4	10	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	
<b>21</b>	1	28	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	
	2	28	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,107	1,0000
	3	28	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,107	1,0000
	4	10	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	
<b>56</b>	1	23	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	
	2	26	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,115	1,0000
	3	25	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,120	1,0000
	4	9	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	
<b>84</b>	1	23	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	
	2	26	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	1,0000
	3	25	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	1,0000
	4	9	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	
<b>118 (Día de exposición)</b>	1	16	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	
	2	16	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	1,0000
	3	16	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	1,0000
	4	5	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	
<b>125</b>	1	16	3,00	5,38	4,495	4,130	4,880	0,765	4,419
	2	16	0,00	6,46	0,000	0,000	3,000	3,000	1,293
	3	16	0,00	3,00	0,000	0,000	3,000	1,500	0,750
	4	5	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>132</b>	1	16	0,00	4,47	3,000	0,000	3,000	3,000	1,967
	2	16	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,563
	3	16	0,00	3,00	0,000	0,000	3,000	3,000	0,938
	4	5	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

\*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo

Tabla 6.17: Resumen de los resultados de qPCR de cerdas jóvenes por grupo (log<sub>10</sub> GE/ml) de DOF 0 a DOF+20

Día de estudio	Grupo*	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%	Rango de Q	Media	P
<b>DOF+0</b>	1	16	0,00	3,00	3,000	3,000	3,000	0,000	2,813
	2	16	0,00	3,00	0,000	0,000	3,000	1,500	0,750
	3	16	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188
	4	5	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>DOF+7</b>	1	16	0,00	3,00	0,000	0,000	3,000	3,000	0,938
	2	16	0,00	5,55	0,000	0,000	0,000	0,000	0,534
	3	16	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188
	4	5	0,00	3,00	0,000	0,000	3,000	0,000	0,600
<b>DOF+13</b>	1	15	0,00	3,00	0,000	0,000	3,000	3,000	1,400
	2	16	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	3	16	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188
	4	5	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>DOF+20</b>	1	16	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,563
	2	16	0,00	6,45	0,000	0,000	0,000	0,000	0,903
	3	16	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	4	5	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

\*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo

PUNTUACIONES DE OBSERVACIONES CLÍNICAS DE CERDAS JÓVENES DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN

De D116 a DOF+20, 25%, 25%, 38% y 60% de cerdas jóvenes de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente, presentaron enfermedad clínica durante al menos un día de D116 a DOF+20. No se detectaron diferencias significativas entre grupos de vacunas y el grupo de control de exposición para la frecuencia de cerdas jóvenes positivas para enfermedad clínica de D116 a DOF+20 ( $P \geq 0,7043$ ).

Un resumen del porcentaje por grupo de cerdas jóvenes positivas para enfermedad clínica (una puntuación de observación clínica de  $> 0$ ) durante al menos un día de D116 a DOF +20 se muestra a continuación en la Tabla 6.18.

Tabla 6.18: Resumen del porcentaje por grupo de cerdas jóvenes positivas para enfermedad clínica (una puntuación de observación clínica de  $> 0$ ) durante al menos un día de D116 a DOF +20

Días del estudio	Grupo*	N	%	IC de 95%		Total	P
<b>116 – DOF+20</b>	1	4	25	7,3	52,4	16	
	2	4	25	7,3	52,4	16	1,0000
	3	6	38	15,2	64,6	16	0,7043
	4	3	60	14,7	94,7	5	

\*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo

Serología por elisa del prrs en cerdas jóvenes

Todas las cerdas jóvenes fueron seronegativas para PRRS en D0 y D7. Todas las cerdas jóvenes del control de exposición y del control negativo siguieron siendo seronegativas para PRRS hasta e incluyendo el día de exposición (D118); mientras que el grupo de control negativo siguió siendo seronegativo para PRRS para el resto del estudio (DOF+20).

En D14, 18% y 21% de las cerdas jóvenes de título bajo y título alto, respectivamente, fueron seropositivas para PRRS. El grupo de título alto tuvo un porcentaje significativamente mayor de cerdas jóvenes seropositivas para PRRS en D14 ( $P=0,0232$ ), mientras que no se detectó diferencia para el grupo de título bajo en comparación con el grupo de control de exposición ( $p=0,0515$ ). Estos porcentajes alcanzaron altos niveles por grupo de 65% y de 60% para los grupos de título bajo y de título alto, respectivamente en D56 ( $P<0,0001$ ). En el día de la exposición (D118), 56% y 50% de las cerdas jóvenes de título bajo y de título alto fueron seropositivas para PRRS ( $P \leq 0,0024$ ). En D125, 6%, 88% y 100% de las cerdas jóvenes de control de exposición, de título bajo y de título alto, respectivamente, fueron seropositivas para PRRS; y la diferencia entre los grupos de vacunas y el grupo de control de exposición fueron significativas ( $P<0,0001$ ). Después de D125, todas las cerdas jóvenes de control de exposición, de título bajo y de título alto restantes fueron seropositivas PRRS para el resto del estudio (no se realizó la prueba).

Un resumen de los resultados de serología por ELISA del PRRS por grupo de D14 a DOF+20 se muestra a continuación en las Tablas 6.19 y 6.20.

Tabla 6.19: Resumen de los resultados de serología por ELISA del PRRS de cerdas jóvenes por grupo de D14 a Día 132

Día de estudio	Grupo*	N	%	IC de 95%		Total	P
<b>7</b>	1	0	0	0,0	12,3	28	
	2	0	0	0,0	12,3	28	n.a.
	3	0	0	0,0	12,3	28	n.a.
	4	0	0	0,0	30,8	10	
<b>14</b>	1	0	0	0,0	12,3	28	
	2	5	18	6,1	36,9	28	0,0515
	3	6	21	8,3	41,0	28	<b>0,0232</b>
	4	0	0	0,0	30,8	10	
<b>21</b>	1	0	0	0,0	12,3	28	
	2	13	46	27,5	66,1	28	<b>&lt;0,0001</b>
	3	11	39	21,5	59,4	28	<b>0,0003</b>
	4	0	0	0,0	30,8	10	
<b>56</b>	1	0	0	0,0	14,8	23	
	2	17	65	44,3	82,8	26	<b>&lt;0,0001</b>

Día de estudio	Grupo*	N	%	IC de 95%		Total	P
	3	15	60	38,7	78,9	25	<0,0001
	4	0	0	0,0	33,6	9	
<b>84</b>	1	0	0	0,0	14,8	23	<0,0001
	2	15	58	36,9	76,6	26	
	3	14	56	34,9	75,6	25	
	4	0	0	0,0	33,6	9	
<b>118</b>	1	0	0	0,0	20,6	16	0,0008 0,0024
	2	9	56	29,9	80,2	16	
	3	8	50	24,7	75,3	16	
	4	0	0	0,0	52,2	5	
<b>125</b>	1	1	6	0,2	30,2	16	<0,0001 <0,0001
	2	14	88	61,7	98,4	16	
	3	16	100	79,4	100,0	16	
	4	0	0	0,0	52,2	5	
<b>132</b>	1	16	100	79,4	100,0	16	n.a. n.a.
	2	16	100	79,4	100,0	16	
	3	16	100	79,4	100,0	16	
	4	0	0	0,0	52,2	5	

\*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo. n.a. = no aplicable, no se realizó la prueba

5 Tabla 6.20 Resumen de los resultados de serología por ELISA del PRRS de cerdas jóvenes por grupo de DOF 0 a DOF+20

Día de estudio	Grupo*	N	%	IC de 95%		Total	P
<b>DOF+0</b>	1	16	100	79,4	100,0	16	n.a. n.a.
	2	16	100	79,4	100,0	16	
	3	16	100	79,4	100,0	16	
	4	0	0	0,0	52,2	5	
<b>DOF+7</b>	1	15	100	78,2	100,0	15	n.a. n.a.
	2	16	100	79,4	100,0	16	
	3	16	100	79,4	100,0	16	
	4	0	0	0,0	52,2	5	
<b>DOF+13</b>	1	16	100	79,4	100,0	16	n.a. n.a.
	2	16	100	79,4	100,0	16	
	3	16	100	79,4	100,0	16	
	4	0	0	0,0	52,2	5	
<b>DOF+20</b>	1	16	100	79,4	100,0	16	n.a. n.a.
	2	16	100	79,4	100,0	16	
	3	15	100	78,2	100,0	15	
	4	0	0	0,0	52,2	5	

\*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo. \*\*No se realizó la prueba en la muestra de la cerda joven nº 106. n.a. = no aplicable, no se realizó la prueba

Evaluaciones de cerdas jóvenes después de la vacunación

10 No se detectaron evaluaciones anormales de D1 a 21 en ningún grupo y no se realizó la prueba. De D1 a D113, 4%, 4%, 0% y 10% de las cerdas jóvenes de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente, presentaron una evaluación anormal durante al menos un día de D1 a D113. No se detectaron diferencias significativas entre grupos de vacunas y el grupo de control de exposición para evaluaciones anormales de D1 a D113 (P=1,0000).

Individualmente, el nº 109 (grupo de control de exposición) presentó cojera de la pata trasera derecha en D85, el nº 12 (grupo de título bajo) presentó una hinchazón en la región izquierda del cuello de D78 a D89 y el nº 21 (grupo de control negativo) presentó cojera de D81 a D83. Un resumen del porcentaje por grupo de cerdas jóvenes que presentó una evaluación anormal durante al menos un día de D1 a D21 y de D1 a D113 se muestra a continuación en la Tabla 6.21.

5

Tabla 6.21 Resumen de las evaluaciones anormales por grupo durante al menos un día de D1 a D113

Días del estudio	Grupo*	N	%	IC de 95%		Total	P
1 – 21	1 – 4	Sin hallazgos 'positivos'					
1 – 113	1	1	4	0,1	18,3	28	
	2	1	4	0,1	18,3	28	1,0000
	3	0	0	0,0	12,3	28	1,0000
	4	1	10	0,3	44,5	10	

\*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo

Puntuaciones de observaciones clínicas de lechones

10 Los porcentajes medios de lechones por camada positivos para enfermedad clínica (una puntuación de observación clínica de > 0) durante al menos un día de DOF+1 a DOF+20 fueron 91,6%, 32,5%, 33,4% y 3,2% para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. Los grupos de título bajo y alto tuvieron porcentajes significativamente menores de lechones por camada positivos para enfermedad clínica durante al menos un día de DOF+1 a DOF+20 en comparación con el grupo de control de exposición (p≤0,0001).

15

Un resumen del porcentaje por grupo de lechones por camada que fueron positivos para enfermedad clínica (una puntuación de observación clínica de > 0) durante al menos un día de DOF+1 a DOF+20 se muestra a continuación en la Tabla 6.22.

20

Tabla 6.22: Resumen del porcentaje por grupo de lechones por camada positivos para enfermedad clínica (una puntuación de observación clínica de > 0) durante al menos un día de DOF+1 a DOF+20

Días del estudio	Grupo*	N	Mín.	Máx.	Mediana	Media	IC de 95%		DE	P
DOF+1	1	15	56	100	100,0	91,6	82,9	100,4	15,78	
a	2	16	0	100	25,0	32,5	15,6	49,4	31,64	<0,0001
DOF+20	3	16	0	100	25,0	33,4	19,0	47,9	27,16	<0,0001
	4	5	0	9	0,0	3,2	-2,3	8,8	4,50	

\*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo

Resultados de qPCR de suero/fluidos corporales de lechón

25 Una media de 86,3%, 58,1%, 55,0% y 0% de lechones por camada para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente, fueron positivos por qPCR para ARN del PRRSV en DOF 0. Los grupos de título bajo y alto tuvieron porcentajes estadísticamente menores de lechones por camada positivos por qPCR para ARN del PRRSV en comparación con el grupo de control de exposición en DOF 0 (P≤0,0381). En DOF+7, de nuevo los grupos de título bajo y de título alto tuvieron porcentajes significativamente menores de lechones por camada positivos por qPCR para ARN del PRRSV en comparación con el grupo de control de exposición (P≤0,0293). En DOF+13, sólo el grupo de título bajo tuvo un porcentaje significativamente menor de lechones por camada positivos por qPCR (P=0,0216); mientras que no se detectaron diferencias significativas para el grupo de título alto y el control de exposición para el porcentaje de lechones por camada positivos por qPCR (P=0,0860). No se detectaron diferencias significativas entre los grupos en DOF+20 (P≥0,0614).

30

Un resumen del porcentaje por grupo de lechones positivos para PRRSV por qPCR de suero/fluido corporal por cerda joven se muestra a continuación en la Tabla 6.23.

35



Tabla 6.23: Un resumen del porcentaje por grupo de lechones positivos para PRRSv por qPCR de suero/fluido corporal por cerda joven

Día de estudio	Grupo*	N	Mín.	Máx.	Mediana	Media	IC de 95%		DE	P
<b>DOF+0</b>	1	16	50	100	96,4	86,3	76,8	95,8	17,87	
	2	16	0	100	68,3	58,1	37,3	78,9	39,07	<b>0,0381</b>
	3	16	0	100	60,0	55,0	37,0	73,0	33,77	<b>0,0018</b>
	4	5	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	
<b>DOF+7</b>	1	12	100	100	100,0	100,0	100,0	100,0	0,00	
	2	16	10	100	100,0	76,6	57,1	96,0	36,51	<b>0,0293</b>
	3	16	0	100	100,0	78,6	60,6	96,6	33,83	<b>0,0175</b>
	4	5	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	
<b>DOF+13</b>	1	11	100	100	100,0	100,0	100,0	100,0	0,00	
	2	16	0	100	100,0	75,4	55,0	95,8	38,31	<b>0,0216</b>
	3	16	0	100	100,0	84,0	68,2	99,9	29,75	0,0860
	4	5	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	
<b>DOF+20</b>	1	11	0	100	100,0	90,9	70,7	111,2	30,15	
	2	16	0	100	93,8	75,3	55,6	95,0	36,97	0,0614
	3	16	0	100	100,0	81,6	65,0	98,1	31,06	0,1832
	4	5	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	

\*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo

- 5 El grupo de título alto tuvo una mediana significativamente menor de resultado de qPCR en comparación con el grupo de control de exposición en DOF 0 (**P=0,0030**); mientras que no se detectó diferencia entre el grupo de título bajo y el grupo de control de exposición (P=0,0620). En DOF+7, DOF+13 y DOF+20, ambos grupos de vacunas tuvieron medianas significativamente menores de valores de qPCR en comparación con el grupo de control de exposición (**p≤0,0122**).
- 10 Un resumen de los resultados de qPCR en GE/ml de suero/fluido corporal de lechones por grupo por cerda joven se muestra a continuación en la Tabla 6.24.

Tabla 6.24: Resumen de resultados de qPCR de suero/fluido corporal de lechones por grupo (log<sub>10</sub> GE/ml) por cerda joven (valores de P para diferencias entre grupos basados en las medianas de valores de qPCR)

Día de estudio	Grupo*	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	P
<b>DOF+0</b>	1	180	0,00	8,69	6,400	6,080	6,790	3,195	5,556	
	2	176	0,00	8,47	3,000	3,000	4,420	6,945	3,560	0,0620
	3	183	0,00	8,76	3,000	0,000	3,000	6,580	3,049	<b>0,0030</b>
	4	58	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
<b>DOF+7</b>	1	58	4,47	8,76	6,950	6,610	7,370	1,300	6,914	
	2	103	0,00	8,12	3,000	3,000	4,930	5,640	3,337	<b>&lt;0,0001</b>
	3	115	0,00	6,91	4,280	3,000	4,630	2,120	3,642	<b>&lt;0,0001</b>
	4	54	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
<b>DOF+13</b>	1	52	4,19	8,62	6,835	6,430	6,970	0,995	6,549	
	2	100	0,00	8,22	3,000	3,000	3,000	4,530	2,678	<b>&lt;0,0001</b>
	3	113	0,00	6,54	3,000	3,000	3,000	1,580	3,413	<b>&lt;0,0001</b>
	4	54	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
<b>DOF+20</b>	1	46	0,00	6,94	5,595	5,270	6,520	1,770	5,554	
	2	98	0,00	6,59	3,000	3,000	3,000	4,000	2,502	<b>0,0122</b>
	3	111	0,00	6,28	3,000	3,000	3,000	1,160	3,218	<b>0,0005</b>
	4	54	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

\*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo

15

ADWG de lechones

No se detectaron diferencias entre grupos para pesos corporales medios por LS en DOF 0 ( $P \geq 0,2972$ ). Ambos grupos de vacunas tuvieron mayores pesos corporales medios por mínimos cuadrados en comparación con el grupo de control de exposición en DOF+20 ( $P < 0,0028$ ), teniendo o sin tener en cuenta pesos corporales en DOF 0 como covariable en los análisis.

5

El ADWG medio de DOF 0 a DOF+20 fue 0,1 kg/día, 0,2 kg/día, 0,2 kg/día y 0,2 kg/día para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. Ambos grupos de vacunas tuvieron significativamente mayor ADWG en comparación con el grupo de control de exposición ( $P < 0,0028$ ), teniendo o sin tener en cuenta pesos corporales en DOF 0 como covariable en los análisis.

10 Un resumen de los pesos corporales de lechones en DOF 0 y DOF+20 por grupo y ADWG de DOF 0 a DOF+20 (kg/día) se muestra a continuación en las Tablas 6.25 y 6.26.

Tabla 6.25: Resumen de pesos corporales de lechones en DOF 0 y DOF+20 por grupo y ADWG de DOF 0 a DOF+20 (kg/día)

Día(s) de estudio	Grupo*	N	Mín.	Máx.	Mediana	Media	IC de 95%		DE
<b>Pesos corporales en DOF+0</b>	1	47	0,9	2,0	1,40	1,34	1,274	1,411	0,234
	2	99	0,9	2,1	1,40	1,43	1,388	1,479	0,227
	3	111	0,9	2,0	1,40	1,40	1,360	1,448	0,234
	4	54	0,9	1,9	1,40	1,39	1,335	1,454	0,218
<b>Pesos corporales en DOF+20</b>	1	47	1,5	6,1	3,70	3,80	3,462	4,146	1,164
	2	99	2,4	8,3	5,50	5,42	5,168	5,673	1,266
	3	111	2,1	8,2	5,30	5,19	5,000	5,388	1,032
	4	54	2,4	6,9	5,20	5,26	5,008	5,511	0,922
<b>ADWG (DOF+0 a DOF+20)</b>	1	47	0,015	0,235	0,1150	0,1231	0,10649	0,13968	0,05653
	2	99	0,065	0,340	0,2000	0,1993	0,18770	0,21099	0,05837
	3	111	0,055	0,330	0,1950	0,1895	0,18078	0,19823	0,04638
	4	54	0,060	0,260	0,1925	0,1932	0,18305	0,20343	0,03733

\*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo

15

Tabla 6.26: Resumen de pesos corporales medios por LS por grupo y ADWG en DOF 0 a DOF+20 (kg/día) – Resultados de las pruebas (valor de P) en diferencias entre grupos

Día(s) de estudio	Grupo*	Media por LS	Intervalo de confianza de 95%		P
<b>Pesos corporales en DOF+0</b>	1	1,32	1,169	1,477	
	2	1,42	1,318	1,522	
	3	1,41	1,317	1,497	
	Dif. 1-2	-0,10	-0,281	0,088	0,2972
	Dif. 1-3	-0,08	-0,262	0,094	0,3467
<b>Pesos corporales en DOF+20</b>	1	3,82	3,072	4,567	
	2	5,32	4,827	5,819	
	3	5,35	4,910	5,785	
	Dif. 1-2	-1,50	-2,401	-0,606	<b>0,0016</b>
	Dif. 1-3	-1,53	-2,394	-0,662	<b>0,0010</b>
<b>Pesos corporales en DOF+20**</b>	1	4,01	3,341	4,685	
	2	5,28	4,843	5,727	
	3	5,34	4,950	5,728	
	Dif. 1-2	-1,27	-2,078	-0,466	<b>0,0028</b>
	Dif. 1-3	-1,33	-2,103	-0,550	<b>0,0013</b>
<b>ADWG (DOF+0 a DOF+20)</b>	1	0,125	0,0903	0,1594	
	2	0,195	0,1722	0,2181	
	3	0,197	0,1768	0,2172	

	<b>Dif. 1-2</b>	-0,070	-0,1118	-0,0289	<b>0,0014</b>
	<b>Dif. 1-3</b>	-0,072	-0,1122	-0,0322	<b>0,0008</b>
<b>ADWG (DOF+0 a DOF+20**)</b>	<b>1</b>	0,130	0,0969	0,1640	
	<b>2</b>	0,194	0,1720	0,2161	
	<b>3</b>	0,197	0,1773	0,2162	
	<b>Dif. 1-2</b>	-0,064	-0,1039	-0,0233	<b>0,0028</b>
	<b>Dif. 1-3</b>	-0,066	-0,1052	-0,0275	<b>0,0013</b>

\*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo. \*\* el peso en DOF+0 se usó como covariable

Observaciones y diagnósticos de autopsias de lechones

- 5 Los fetos anotados como nacidos muertos, momias o aplastados en el parto se confirmaron en la autopsia como clasificados correctamente, con excepción de 8 fetos. Dos fetos de control de exposición se anotaron como nacidos muertos (40-S1, 66-S1), pero los resultados de la autopsia revelaron pulmones hinchados que indica que estuvieron vivos en el momento del nacimiento. Dos fetos de control de exposición se anotaron como aplastados (1-C1, 79-C2), pero los resultados de la autopsia revelaron pulmones no hinchados para ambos fetos, que indica que no respiraron.
- 10 Un feto de título bajo se anotó como nacido muerto (85-S2), pero los resultados de la autopsia revelaron pulmones hinchados que indica que el lechón estaba vivo en el momento del nacimiento. Tres lechones de título alto se anotaron como aplastados (36-C1, 36-C2, 65-C1), pero los resultados de la autopsia revelaron pulmones no hinchados para ambos fetos, que indica que no respiraron. Debido al bajo número de fetos incorrectamente anotados en el momento del parto, no se hicieron cambios en los análisis de rendimiento de las cerdas jóvenes.
- 15 Un lechón del control de exposición 102-428 murió posteriormente a la recogida de sangre, que se confirmó por autopsia.

Resultados de qPCR de pulmones de lechones

- De los fetos y lechones muertos a los que se les practicó la autopsia, los resultados de qPCR de pulmones medios fueron 4,68, 4,09, 3,55 y 0,0 log<sub>10</sub> GE/ml para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. No se realizaron análisis estadísticos en estos datos.
- 20

Un resumen de los resultados de qPCR del PRRSv en los pulmones por grupo (log<sub>10</sub> GE/ml) se muestra a continuación en la Tabla 6.27.

Tabla 6.27: Resumen de los resultados de qPCR del PRRSv en los pulmones de lechones por grupo (log<sub>10</sub> GE/ml)

Grupo	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media
1	141	0,00	7,95	5,140	4,810	5,390	2,990	4,676
2	79	0,00	7,45	4,780	3,000	5,260	2,620	4,092
3	75	0,00	6,84	4,220	3,000	5,100	5,620	3,547
4	4	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

- \*Grupo 1 = grupo de control de exposición; Grupo 2 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título bajo; Grupo 3 = grupo de MLV contra el PRRSV 94881 de título alto; Grupo 4 = grupo de control negativo
- 25

Discusión/conclusión

- Para lograr el objetivo del estudio, cuatro grupos de cerdas jóvenes susceptibles a PRRS se incluyeron en el diseño del estudio en D0: un grupo de control de exposición que recibió producto de control (Grupo 1); un grupo de vacunas de título bajo que recibió  $1 \times 10^{2,43}$  TCID<sub>50</sub> de MLV contra el PRRSV 94881 (IVP nº 1, Grupo 2); un grupo de vacunas de título alto que recibió  $1 \times 10^{3,90}$  TCID<sub>50</sub> de MLV contra el PRRSV 94881 (IVP nº 2, Grupo 3); y un grupo de control negativo (Grupo 4) que también recibió producto de control. Cada tratamiento se administró como una dosis de 2,0 ml IM aproximadamente 28 días antes del celo (D0).
- 30

- Para determinar la dosis de inmunización mínima de MLV contra el 94881 del PRRS, los dos grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición se expusieron en D118 (aproximadamente 90 días de gestación) a una cepa aislada europea heteróloga del PRRSv (cepa aislada 190136) y se evaluaron después de la exposición para el porcentaje y número de lechones vivos por camada en el nacimiento (día de parto, DOF) y el porcentaje y número de lechones vivos por camada a los 21 días de edad (DOF +21).
- 35

Validación del estudio (Grupo de control negativo 4)

Para garantizar que las cerdas jóvenes fuente estuvieron libres del PRRSv y que no se produjo exposición externa al

PRRSv o contaminación cruzada entre los grupos de tratamiento y de control durante el estudio, un grupo de control negativo (Grupo 4) se incluyó en el diseño del estudio. Las cerdas jóvenes de control negativo fueron negativas para anticuerpos del PRRS durante todo el estudio. Además, este grupo de cerdas jóvenes y su progenie también fueron negativos para viremia del PRRSv (qPCR) en todos los momentos de tiempo probados, con excepción del n° 108 en DOF+7. La cerda joven n° 108 fue “positiva” en DOF+7, mientras que negativa por qPCR en todos los otros momentos de tiempo y sus lechones también fueron negativos para ARN del PRRSv. Este resultado se consideró un error debido a una contaminación de muestras y no debido a infección por PRRSv. Estos resultados soportan que el grupo de control negativo siguió estando libre de infección por PRRS durante el estudio y validó los resultados de este ensayo.

#### 10 Validación del modelo de exposición reproductiva del PRRSv (Grupo de control de exposición 1)

Es necesario un modelo de exposición que implique una cepa derivada de EU virulenta del PRRSv que induzca enfermedad clínica del PRRS suficiente y reproducible para evaluar adecuadamente la eficacia de la vacuna contra el PRRS en un entorno de laboratorio. Tras la inoculación con la cepa aislada del PRRS europea 190136 ( $1 \times 10^{6.30}$  TCID<sub>50</sub>/6 ml), el grupo de control de exposición sólo presentó 54,4% de lechones vivos por camada en el nacimiento (93,0% para el grupo de control negativo), 17,5% y 28,1% por camada de nacidos muertos y momias, respectivamente (7,0% y 0,0%, respectivamente, para el grupo de control negativo), 91,6% de los lechones por camada presentó enfermedad clínica durante al menos un día de DOF+1 a DOF+20 (3,2% lechones por camada para el grupo de control negativo), una media de 2,9 lechones vivos por camada a los 20 días de edad (una media de 10,8 para el grupo de control negativo) y 86,3% de los lechones por camada virémicos en el nacimiento (0% para el grupo de control negativo). Estos resultados ponen de relieve que se indujo enfermedad clínica específica del PRRS grave en el grupo de control de exposición sin vacunar de cerdas jóvenes y su progenie, validándose así este modelo de exposición como una herramienta de laboratorio clínico adecuada para evaluar la eficacia de la vacuna contra el PRRS y más específicamente la MID de MLV contra el PRRSV 94881 en cerdas jóvenes.

#### 25 Determinación de la dosis de inmunización mínima de MLV contra el PRRSV 94881 en cerdas jóvenes (dosis de vacunas de títulos bajo y alto; Grupos 2-3)

La determinación de la MID de MLV contra el PRRSV 94881 en cerdas jóvenes se basó en el grupo de vacunas que recibió el menor título de vacuna que produjo mayores porcentajes o número de lechones vivos por camada en el nacimiento y mayores porcentajes o número de lechones vivos por camada a los 20 días de edad después de la exposición en comparación con el grupo de control de exposición.

30 Los lechones vivos por camada (tanto porcentaje como número) en el parto se seleccionaron como uno de los dos criterios clave para determinar la MID de MLV contra el 94881 del PRRS. El primer criterio clave se basó en el hecho de que la infección por PRRSv en cerdas jóvenes preñadas y cerdas produce normalmente lechones nacidos muertos y momias, con bajos números de lechones vivos en el parto. Los lechones vivos por camada en el nacimiento se definieron como la suma de lechones vivos sanos, vivos débiles y aplastados-mortalidad en el parto. 35 Los lechones anotados como aplastados o mortalidad se incluyeron en la categoría de “vivos” porque los hallazgos de la autopsia confirmaron que estos lechones estuvieron vivos en el nacimiento y murieron poco después debido a traumatismo. Tanto los grupos de título bajo como de título alto presentaron porcentajes significativamente mayores de lechones vivos por camada en el parto en comparación con el control de exposición (**P≤0,0455**), por tanto, se cumplió este criterio para la eficacia de la vacuna. Aunque no se detectaron diferencias significativas entre los 40 grupos de vacunas de título bajo y alto y el grupo de control de exposición con respecto al número medio de lechones vivos por camada en el parto ( $P \geq 0,1857$ ), los grupos de título bajo y de título alto presentaron números medios considerablemente mayores de lechones vivos por camada en el parto (media 8,3 y 8,6 lechones por camada, respectivamente) en relación con el grupo de control de exposición (media 6,5 lechones por camada), proporcionándose así más pruebas y apoyo de que se observó un efecto de tratamiento con la vacuna beneficioso 45 en estos animales después de la exposición.

Los lechones vivos por camada (tanto porcentaje como número) a los 20 días de edad fue el segundo criterio para determinar la MID de MLV contra el PRRSV 94881 debido a que la inmunidad del PRRS en cerdas jóvenes influirá intrauterinamente infección de lechones y la propagación del virus de cerdas jóvenes a lechones vivos. Los lechones infectados con PRRS intrauterinamente y los nacidos vivos o infectados con PRRS virulento después del parto por 50 propagación de la cerda joven normalmente mueren antes del destetamiento secundario al PRRS. En este estudio, el grupo de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo presentó 43,6%, 73,8%, 83,8% y 100% de lechones vivos por camada, respectivamente, a los 20 días de edad (**P≤0,0203**). Asimismo, los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo tuvieron un número medio de 2,9, 6,2, 6,9 y 10,8 lechones por camada, respectivamente, a los 20 días de edad (**P≤0,0063**). Ambos grupos de vacunas tuvieron 55 significativamente mayor porcentaje y número de lechones vivos en el destetamiento (**P≤0,0203**), por tanto, se cumplió este criterio del objetivo del estudio.

Otros análisis de los datos del parto revelaron más información que soporta la eficacia de la vacuna tras la exposición al PRRSv, especialmente con respecto al grupo de título alto. El grupo de título alto presentó estadísticamente un mayor porcentaje y un mayor número medio de lechones sanos en el nacimiento (**P≤0,0211**); 60 mientras que presentó porcentajes significativamente menores y números medios de fetos débiles y momificados

( $P \leq 0,0090$ ) en comparación con el grupo de control de exposición. Estos datos soportan que la dosis de vacuna alta induce inmunidad protectora contra una cepa de exposición del PRRSv virulenta y heteróloga. El grupo de título bajo también presentó eficacia de la vacuna en el parto, como es evidente por un mayor porcentaje de lechones sanos vivos por camada ( $P = 0,0138$ ) y porcentajes y número medios significativamente menores de fetos momificados ( $P \leq 0,0190$ ). En cambio, no se detectaron diferencias entre grupos para el porcentaje o número de fetos nacidos muertos o aplastados/mortalidades en el parto ( $P \geq 0,1681$ ).

Siete días después de la exposición (D125), los grupos de título bajo y de título alto tuvieron porcentajes significativamente menores de cerdas jóvenes positivas para ARN del PRRSv por pruebas de qPCR, además de carga vírica significativamente menor para ambos grupos en comparación con el grupo de control de exposición ( $P \leq 0,0001$ ). Estos datos soportan adicionalmente que ambos niveles de dosis de vacuna indujeron inmunidad adecuada en cerdas jóvenes para reducir significativamente la replicación vírica tras la exposición. Asimismo, los grupos de título bajo y alto tuvieron porcentajes significativamente menores de cerdas jóvenes positivas por qPCR en DOF 0 y DOF+13, además de menor carga vírica para ambos grupos en estos días del estudio ( $P \leq 0,0155$ ). El grupo de título bajo tuvo significativamente menor porcentaje de cerdas jóvenes positivas por qPCR y menor carga vírica en D132 ( $P \leq 0,0290$ ); mientras que no se detectaron diferencias estadísticas entre el grupo de título alto y de control de exposición para el mismo conjunto de parámetros ( $P \geq 0,1144$ ). No se detectaron diferencias estadísticas entre grupos de vacunas y el grupo de control de exposición para el porcentaje de cerdas jóvenes positivas por qPCR o la carga vírica en DOF+7 y DOF+20 ( $P \geq 0,1719$ ).

Normalmente, el PRRSv no induce enfermedad clínica en cerdas jóvenes y cerdas, distinta de aborto. En este estudio, el 25%, 25%, 38% y 60% de las cerdas jóvenes de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente, presentaron enfermedad clínica (recibieron una puntuación de observación clínica  $> 0$ ) durante al menos un día después de la exposición. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos de vacunas y el grupo de control de exposición con respecto al porcentaje de cerdas jóvenes con enfermedad clínica durante al menos un día de D116 a DOF +20 ( $P \geq 0,7043$ ). Las cerdas jóvenes que presentaron alguna forma de enfermedad clínica lo hicieron en el peri-parto y no inmediatamente después de la exposición. El alto porcentaje de cerdas jóvenes de control negativo (60%) que presentó enfermedad clínica y el hecho de que la enfermedad clínica no fuera principalmente aproximadamente en el momento del parto para todos los grupos en este estudio soporta que la enfermedad clínica no se atribuyó a enfermedad del PRRS, sino a cambios fisiológicos asociados al parto.

Todas las cerdas jóvenes en el estudio fueron seronegativas por ELISA para PRRS en D0, proporcionándose así la confirmación de los criterios de inclusión para los animales de prueba que entraron en el estudio. Asimismo, todas las cerdas jóvenes fueron seronegativas por ELISA para PRRS en D7. Las cerdas jóvenes vacunadas empezaron a presentar resultados seropositivos por ELISA para PRRS en D14 y los grupos de dosis baja y alta presentaron su mayor tasa de seroconversión de 65% y 60%, respectivamente, en D56 ( $P < 0,0001$ ). En cambio, el grupo de control de exposición siguió siendo seronegativo por ELISA para PRRS hasta 7 días después de la exposición (D125). Desde D132 hasta la conclusión del estudio, todas las cerdas jóvenes de título bajo, de título alto y de control de exposición fueron seropositivas por ELISA para PRRS. El porcentaje de cerdas jóvenes positivas para viremia después de la vacunación alcanzó su máximo en D7 para ambos grupos de vacunas como se demuestra por 50% y 36% para los grupos de título bajo y alto, respectivamente ( $P \leq 0,0007$ ). La viremia cayó rápidamente al 4% (1 de 28, el n° 64) y al 0% (0 de 28) para los grupos de título bajo y de título alto, respectivamente en D14 ( $P = 1,0000$  o no se realizó la prueba). La viremia siguió siendo 4% para los grupos de título bajo (1 de 28, el n° 56) y de título alto (1 de 28, el n° 91) en D21. En D56, una de 26 (4%, el n° 89) cerdas jóvenes de título bajo y una de 25 (4%, el n° 66) cerdas jóvenes de título alto fueron positivas para viremia. Todas las cerdas jóvenes fueron negativas para viremia en D84 y D118.

No se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición con respecto al porcentaje de cerdas jóvenes por grupo después de la vacunación con una evaluación clínica anormal durante al menos un día de D1 a D113 ( $P = 1,0000$ ). Individualmente, sólo tres cerdas jóvenes presentaron alguna evaluación anormal durante este periodo de tiempo. Dos cerdas jóvenes presentaron cojera (una cerda joven de control de exposición y una cerda joven de control negativo) y una cerda joven de título bajo presentó hinchazón en la región izquierda del cuello. Como la vacuna se administró en la región derecha del cuello, no se observaron acontecimientos adversos asociados a esta vacuna.

Los resultados de viremia del PRRS en lechones sobre el DOF dieron adicionalmente la oportunidad de ver el nivel de protección en cerdas jóvenes en la prevención de infección placentaria cruzada de lechones. En el DOF, una media de 58,1% y 55,0% de los lechones por cerda joven en los grupos de título bajo y de título alto, respectivamente, fueron positivos por qPCR. En cambio, una media de 86,3% de los lechones por cerda joven en el grupo de control de exposición fueron positivos por qPCR en suero/fluidos corporales, que fue significativamente superior a ambos grupos de vacunas ( $P \leq 0,0381$ ). Cuando se examinó la carga vírica de los lechones en DOF 0, los lechones de título alto tuvieron significativamente menor carga vírica en comparación con los lechones del control de exposición ( $P = 0,0030$ ); mientras que no se detectó diferencia para la carga vírica entre lechones de título bajo y de control de exposición ( $P = 0,0620$ ). Reducciones significativas ( $P \leq 0,05$ ) en el porcentaje de lechones por cerda joven positivos para viremia indican una reducción de la transmisión vertical del PRRSv virulento de cerda joven vacunada a cría cuando se inmuniza con cualquier dosis de MLV contra el PRRSV 94881 EU PRRS 94881. Además, el grupo de título alto tuvo una mediana del valor de lechón por qPCR por cerda joven de 3,00  $\log_{10}$  GE/ml en el DOF;

- 5 mientras que el grupo de control de exposición tuvo una mediana del valor de lechón por qPCR por cerda joven de 6,40 log<sub>10</sub> GE/ml en suero/fluidos corporales (**P=0,0030**). No se detectó diferencia significativa entre el grupo de dosis baja y el grupo de control de exposición para la carga vírica de los lechones en DOF (P=0,0620). Los datos soportan adicionalmente la eficacia de la dosis alta de MLV contra el PRRSV 94881 cuando se administra a cerdas jóvenes y cerdas.
- 10 Los grupos de título bajo y de título alto presentaron medias de 32,5% y 33,4%, respectivamente, para lechones por camada con enfermedad clínica (una puntuación de observación clínica de > 0) durante al menos un día de DOF+1 a DOF +20. Estos resultados fueron significativamente inferiores para el grupo de control de exposición, que presentó una media de 91,6% de lechones por camada para el mismo parámetro (**P≤0,0001**), soportando adicionalmente la eficacia de la vacuna para ambos niveles de dosis.
- 15 No se detectó diferencia significativa entre grupos para pesos corporales medios de lechones en DOF 0 (P≥0,2972); mientras que ambos grupos de vacunas tuvieron pesos corporales significativamente mayores en DOF+20 y ADWG de DOF 0 a DOF+20 (**P≤0,0028**). De nuevo, estos resultados soportan la eficacia de ambas dosis de MLV contra el 94881 del PRRS.
- 20 Los resultados de la autopsia confirmaron la correcta clasificación de casi todos los fetos en el parto. Debido al número muy pequeño de fetos que se anotaron como aplastados que fueron en realidad nacidos muertos y nacidos muertos que fueron en realidad aplastados en el parto, en comparación con el número total de fetos correctamente clasificados en el parto, no se hicieron cambios en los datos de rendimiento de las cerdas jóvenes antes de analizarse. Un lechón de control de exposición murió posteriormente a la recogida de sangre. Como esta situación sólo implicó a un lechón en comparación con el gran número total de lechones en el grupo de control de exposición, este lechón no se eliminó de los análisis.
- 25 Las muestras de pulmón se recogieron de 141, 79, 75 y 4 fetos/lechones muertos de los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. Se determinó un valor de pulmón por qPCR medio de 4,68, 4,10, 3,55 y 0,00 log<sub>10</sub> GE/ml para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. No se realizaron análisis en estos datos ya que a los lechones vivos a los 20 días de edad no se les hizo la autopsia, pero estos resultados ponen de relieve que las cerdas jóvenes vacunadas con MLV contra el PRRSV 94881 produjeron menor carga vírica en los pulmones de lechones cuando las cerdas jóvenes se expusieron a un PRRSV virulento.
- 30 En conclusión, los resultados de este estudio demostraron porcentajes significativamente mayores de lechones vivos por camada en el parto (**P≤0,0455**) y mayores porcentajes y números de lechones por camada en el destetamiento (**P≤0,0203**) para ambos grupos de vacunas en comparación con el grupo de control de exposición. Por tanto, se cumplió el objetivo del estudio y los datos de este estudio establecen la MID de MLV contra el PRRSV 94881 en cerdas jóvenes como 1 x 10<sup>2,43</sup> TCID<sub>50</sub>/2 ml. Estos resultados se alcanzaron 118 días después de la vacunación, que además establece la duración de la inmunidad (DOI) en cerdas jóvenes en aproximadamente 4 meses.
- 35 Cuando se examinaron los datos de apoyo, la dosis alta de MLV contra el PRRSV 94881 (1 x 10<sup>3,90</sup> TCID<sub>50</sub>/2 ml) se asoció a un mayor porcentaje y número de lechones sanos por cerda joven en el parto (**P≤0,0211**), un menor porcentaje y número de fetos débiles y momificados (**P≤0,0090**), un menor porcentaje de cerdas jóvenes positivas por qPCR y menor carga vírica en cerdas jóvenes después de la exposición en D125, DOF 0 y DOF+13 (**P≤0,0155**), un menor porcentaje de lechones por cerda joven positiva por qPCR y menor carga vírica en lechones en DOF 0 (**P≤0,0030**), un menor porcentaje de lechones por cerda joven con enfermedad clínica (**P<0,0001**) y mayores pesos corporales de los lechones en DOF+20 y ADWG (**P<0,0013**).
- 40 El grupo de dosis baja se asoció a un mayor porcentaje de lechones sanos por cerda joven en el parto (**P=0,0138**), un menor porcentaje y número de fetos momificados (**P≤0,0190**), un menor porcentaje de cerdas jóvenes positivas por qPCR y menor carga vírica en cerdas jóvenes después de la exposición en D125, D132, DOF 0 y DOF+13 (**P≤0,0290**), un menor porcentaje de lechones por cerda joven positiva por qPCR en DOF 0 (**P=0,0381**), un menor porcentaje de lechones por cerda joven con enfermedad clínica (**P<0,0001**) y mayor peso corporal de los lechones en DOF+20 y ADWG (**P<0,0028**).
- 45 Ejemplo 7 Evaluación de la aparición de inmunidad de MLV contra el PRRSV 94881 en lechones susceptibles tras la exposición a una cepa aislada europea heteróloga del PRRS dos semanas después de la vacunación
- 50 El objetivo de este estudio de exposición a vacunación fue evaluar la aparición de inmunidad (OOI) dos semanas después de la administración del candidato a vacuna contra el síndrome reproductor y respiratorio porcino, la cepa aislada derivada de europea 94881, virus vivo modificado (MLV contra el 94881 del PRRS), en lechones susceptibles de 14 ± 3 días de edad. El criterio de eficacia primaria para satisfacer una OOI de 2 semanas después de la vacunación fue si el grupo vacunado (Grupo 1) demostró una diferencia significativa (p≤0,05) para lesiones pulmonares después de la exposición en comparación con el grupo de control de exposición sin vacunar (Grupo 2).
- 55 Los parámetros secundarios incluyeron evaluaciones clínicas después de la vacunación, observaciones clínicas después de la exposición, temperaturas rectales, aumento de peso diario promedio, evaluación de anticuerpos del PRRS y viremia en muestras de suero y cuantificación del virus PRRS en muestras de pulmón recogidas en la

autopsia.

Los lechones se asignaron aleatoriamente a cualquier Grupo 1 (vacuna MLV contra el PRRSV 94881 que contiene  $1 \times 10^{3,82}$  TCID<sub>50</sub>/ml y expuesto; n=20), Grupo 2 (vacuna de placebo y expuesto; n=20) o Grupo 3 (vacuna de placebo y no expuesto; n=10). Los lechones se alojaron en corrales de plástico con suelos elevados (n=5/corral). Cada grupo de tratamiento se alojó en una habitación diferente para evitar la transmisión del PRRSV por vías mecánicas, que incluyen aerosolización.

Todos los animales asignados a este estudio completaron el estudio. No se informaron acontecimientos adversos durante este estudio. Las puntuaciones de lesión pulmonar medias en D24 fueron 27,4% y 54,8% para los cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 y los controles de exposición, respectivamente. La puntuación de lesión pulmonar media para los cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 fue significativamente menor que la de los controles de exposición ( $p=0,0002$ ) y, por tanto, se cumplió la variable de eficacia primaria y la OOI se estableció en 2 semanas tras una única vacunación. Una proporción significativamente mayor de cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 tuvieron títulos de anticuerpos del PRRS positivos en D14, D17 y D21 en comparación con los controles de exposición ( $p \leq 0,0012$ ). El ABC media para viremia fue significativamente menor para cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 en comparación con los controles de exposición para D17-D24 (50,72 y 54,61 log<sub>10</sub> GE/ml, respectivamente;  $p=0,0039$ ) después de la exposición. Los cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 no presentaron signos de letargo (0%) después de la exposición en comparación con 45% de los cerdos del control de exposición ( $p=0,0012$ ). Los cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 tuvieron mayores aumentos de peso durante la fase después de la exposición (SD 14-SD 24) del estudio en comparación con los controles de exposición (0,3 y 0,1 kg, respectivamente;  $p=0,0003$ ).

La significativa reducción ( $p \leq 0,05$ ) de las lesiones pulmonares, signos clínicos, replicación del virus en la sangre y los pulmones después de la exposición, además de la mejora de los rendimientos de crecimiento en animales vacunados, demuestra la eficacia de la vacuna contra el PRRSV virulento cuando la exposición se realiza 2 semanas después de la vacunación. Por tanto, soporta la demostración de una aparición de inmunidad al menos 2 semanas después de la vacunación con MLV contra el 94881 del PRRS.

#### Objetivos/fin del estudio

El objetivo de este estudio de exposición a vacunación fue evaluar la aparición de inmunidad (OOI) dos semanas después de la administración del candidato a vacuna contra el síndrome reproductor y respiratorio porcino, cepa aislada derivada de europea 94881, virus vivo modificado (MLV contra el 94881 del PRRS), en lechones susceptibles de  $14 \pm 3$  días de edad. El criterio de eficacia primaria para satisfacer una OOI de 2 semanas después de la vacunación fue si el grupo vacunado (Grupo 1) demostró una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) para lesiones pulmonares disminuidas después de la exposición en comparación con el grupo de control de exposición sin vacunar (Grupo 2).

Los parámetros de eficacia secundarios analizados entre el grupo de vacunas y el grupo de control de exposición incluyeron evaluaciones clínicas después de la vacunación, serología del PRRS, viremia del PRRS después de la exposición, observaciones clínicas después de la exposición, aumento de peso diario promedio (ADWG), temperaturas rectales y cuantificación del PRRSV en los pulmones.

Un grupo de control negativo (Grupo 3), que no se vacunó ni se expuso, se incluyó en el estudio para demostrar que la pira fuente estuvo libre de infección por PRRSV durante el periodo de ensayo y que la bioseguridad no se infringió durante este ensayo.

#### Programa de acontecimientos

Tabla 7.1 Programa de acontecimientos

Día de estudio	Fechas	Acontecimiento clave del estudio
-8	14-Dic-09	Cribado para estado por ELISA del PRRS negativo
-1	21-Dic-09	Llegada a VRI; examen de salud
-1 a 12	21-Dic-09 a 03-Ene-10	Evaluaciones clínicas
0	22-Dic-09	Recogida de pesos corporales Vacunación del Grupo 1 con IVP, vacunación de los Grupos 2 y 3 con CP
7	29-Dic-09	Muestra de sangre
13 a 24	04-Ene-10 a 15-Ene-10	Observaciones clínicas y temperaturas rectales
14	05-Ene-10	Recogida de pesos corporales y muestra de sangre; Grupos de exposición 1 y 2 con cepa aislada del PRRS europea heteróloga
17 y 21	08-Ene-10 y	Muestra de sangre

Día de estudio	Fechas	Acontecimiento clave del estudio
	12-Ene-10	
24	15-Ene-10	Sacrificio y autopsia de cerdos después de la recogida de datos y muestras; puntuación de pulmones para patología; recogida de tejidos de pulmón

Diseño del estudio

Tabla 7.2 Diseño del estudio

Grupo	Número de lechones en D0	Tratamiento en D0 (14 ± 3 días de edad)	Exposición en D14 con 1 ml/orificio nasal y 1 ml IM de PRRSv 205817	Sacrificio y autopsia en D24
1	20	1,0 ml IM de IVP (1 x 10 <sup>3,82</sup> TCID <sub>50</sub> /ml)	Sí	Sí
2	20	1,0 ml IM de producto de control (CP; placebo del mismo producto sin MLV contra el 94881 del PRRS)	Sí	Sí
3	10	1,0 ml IM de CP	No	Sí

## 5 Criterios de cegado

El investigador del estudio y los representantes fueron cegados a los grupos de tratamiento asignados durante la fase en vida del estudio. Para mantener este cegado, un individuo que no participó en las evaluaciones de los cerdos (es decir, evaluaciones clínicas, observaciones clínicas o autopsias) realizó la aleatorización y administró los tratamientos de IVP y CP asignados en D0. El personal del laboratorio de BIVI se cegó al tratamiento que recibía cada cerdo mientras que realizaban sus tareas respectivas.

10

Materiales

Producto veterinario en investigación (IVP) y producto de control (CP)

Tabla 7.3 IVP

Nombre del producto genérico:	Síndrome reproductor y respiratorio porcino, virus vivo modificado
Cepa:	94881
Producción y formulación:	La producción de BIVI produjo MLV contra el 94881 del PRRS, lote 390-005 (Apéndice 4), según el Resumen de producción, código 19S1.U_ y el Dossier EU parte 2b. En D0, BIVI-Ames reconstituyó/diluyó la vacuna MLV contra el 94881 del PRRS, lote 390-005 (Apéndice 4), con solución salina tamponada con fosfato (PBS; lote 809-003, Apéndice 5) para formular el IVP, lote n° 257-086. Los registros de la formulación transcrita para el IVP se presentan en el Apéndice 7 (registros originales disponibles a petición).
Fabricante:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506, EE.UU.
Lote n°:	N257-086
Fecha de caducidad:	Se asignó una fecha de caducidad del 22-Dic-09 al IVP sólo para fines de estudio.
Condiciones de almacenamiento:	Vacuna liofilizada: 2-8°C IVP rehidratado/diluido: 2-8°C o sobre hielo
Pruebas:	El lote 390-005 se probó por BIVI-QC según el borrador del Resumen de producción y el Dossier de EU parte 2F. Al principio y al final del método de la vacunación se contactó con personal de BIVI-Ames. El personal de laboratorio de BIVI-Ames probó antes de y después de la vacunación alícuotas para el IVP para el título de virus según el Método de títulos de PRRSv (Apéndice 1, Anexo 6).
Resultados de las pruebas:	Serie 390-005: Los resultados fueron satisfactorios (Apéndice 4). Lote de IVP N257-086: Título medio de 1 x 10 <sup>3,82</sup> TCID <sub>50</sub> /ml (Apéndice 7).
Retención de IVP:	IVP se formuló sólo para este estudio y no se retuvo.



Tabla 7.4 CP

Nombre del producto genérico:	Placebo
Formulación:	La producción de BIVI produjo producto de placebo liofilizado que contenía material inerte comprendido en la serie de vacuna sin MLV contra el PRRSV 94881 (lote N240-191-062409, Apéndice 6). En D0, BIVI-Ames reconstituyó el lote N240-191-062409 con solución salina tamponada con fosfato (PBS; lote 809-003, Apéndice 5) para formular el CP, lote n° 257-085. Los registros de la formulación transcrita para el CP se presentan en el Apéndice 7 (registros originales disponibles a petición).
Fabricante:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506, EE.UU.
Número de lote:	N257-085
Fecha de caducidad:	Se asignó una fecha de caducidad del 22-Dec-09 al CP sólo para fines de estudio.
Condiciones de almacenamiento:	Vacuna liofilizada: 2-8°C CP rehidratado: 2-8°C o sobre hielo
Pruebas:	CP se probó por BIVI-QC para esterilidad según EP según el Resumen especial n° 96 (Apéndice 1, Anexo 5).
Resultados de las pruebas:	Se determinó que CP era estéril (Apéndice 7).
Retención de CP:	CP se formuló sólo para este estudio y no se retuvo.

## Material de exposición

5 Tabla 7.5 Material de exposición

Nombre/número de cepa aislada	Cepa aislada del PRRS 205817
Localización y fecha de aislamiento, incluidos síntomas clínicos	La cepa aislada del virus PRRS europeo 205817 se derivó de la cepa aislada 190136 originariamente obtenida de tejido de pulmón de un lechón recién nacido de una granja que mostraba signos reproductivos típicos de PRRS (abortos en cerdas y debilidad en lechones recién nacidos) durante un brote en baja Sajonia, Alemania, en abril de 2004. Los veterinarios enviaron las muestras de pulmón a BioScreen (la muestra llegó el 21 de abril de 2004) para pruebas de diagnóstico. La cepa aislada n° 190136 se propagó directamente en células MA 104 y para su uso en futuros ensayos clínicos en BIVI se preparó una disolución madre de exposición de cultivo puro. Un cultivo puro de la cepa aislada 190136 se usó para inocular cerdos para la evaluación de su capacidad para reproducir la enfermedad respiratoria específica para PRRS en un ensayo de laboratorio controlado. Los animales expuestos presentaron dificultades respiratorias y revelaron pruebas de neumonía intersticial tras el examen histopatológico. Al virus PRRS que se volvió a aislar satisfactoriamente de lesiones pulmonares se le dio la designación de cepa aislada 205817. La cepa aislada 205817 se propagó directamente en células MA104 y para su uso en futuros ensayos clínicos de BIVI se preparó una disolución madre de exposición de cultivo puro.
Formulación:	El virus de exposición se descongeló y se diluyó con MEM (medio esencial mínimo) a un título elegido como diana de aproximadamente $1 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub> /3 ml en D14. Se preparó un volumen adecuado de material de exposición. Se tomaron dos alícuotas del material de exposición.
Número de lote:	N257-093
Fabricante:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. – EE.UU.
Condiciones de almacenamiento	Se almacenó material de exposición a granel a $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ . Una vez preparado, el material de exposición diluido se mantuvo sobre hielo hasta que se administró.
Pruebas:	Al principio y al final del método de exposición se contactó con BIVI-Ames. El personal del laboratorio de BIVI-Ames probó antes y después de la exposición alícuotas para el título de virus según el Método de títulos de PRRSv
Resultados de las pruebas:	El material de exposición tuvo un título medio de $1 \times 10^{4,71}$ TCID <sub>50</sub> /3 ml de dosis

Vía de administración	1,0 ml/orificio nasal y 1,0 ml IM en el cuello izquierdo (administrado a todos los cerdos en los Grupos 1 y 2 en D14).
Retención del material de exposición:	El material de exposición sólo se formuló para este estudio y no se retuvo.

Tratamientos

Justificación de la dosificación

- 5 El IVP se administró como una dosis de 1,0 ml a cerdos asignados para evaluar la OOI de MLV contra el PRRSV 94881 2 semanas después de la vacunación. El CP se administró como una dosis de 1,0 ml a los Grupos 2 y 3 como una vacuna de placebo.

Pauta de dosificación

- 10 IVP o CP se administró a un cerdo asignado en la región derecha del cuello IM en D0 usando una jeringuilla Luer-lock estéril de 3,0 ml y una aguja estéril 20g x 1 pulgada (2,54 cm) o 18g x ¾ pulgada (1,91 cm) por una persona que no recogía datos del estudio. La pauta de dosificación se muestra a continuación en la Tabla 7.6.

Tabla 7.6 Pauta de dosificación

Grupo	Número	Tratamiento	Dosis/vía	Día de estudio
1	20	IVP	1,0 ml IM	D0
2	20	CP	1,0 ml IM	D0
3	10	CP	1,0 ml IM	D0

Información sobre los animales

Detalles de los animales del estudio

Tabla 7.7 Información sobre los animales

Fuente:	Wilson Prairie View Farm N5627 Highway DD Burlington, WI 53105 EE.UU.		
Número de lechones:	50		
Fecha de llegada:	Los cerdos llegaron a las instalaciones de Veterinary Resources, Inc. (VRI) Cambridge el 21 de diciembre de 2009 (D-1).		
Tratamiento a la llegada:	A los 50 cerdos asignados al estudio se les administró EXCEDE® a la dosis de etiqueta IM en el jamón derecho después de la llegada.		
Identificación:	Oreja etiquetada individualmente con un único número		
Especie:	Porcina		
Raza:	Cruzada comercial		
Sexo:	Mezclado (hembras y machos castrados)		
Intervalo de edad:	11 a 17 días de edad en D0		
Intervalo de peso:	3,2 a 5,5 kg en D0		
Propietario de los animales de prueba:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.		
Estado fisiológico:	En D-1, los cerdos seleccionados para la asignación al estudio fueron observados por el investigador del estudio y determinó que estaban en buen estado de salud y nutricional. Las observaciones se registraron en el cuaderno de recogida de datos del examen de salud del animal.		
Asignaciones de cerdos a grupos	Grupo 1 (n=20): 55, 56, 60, 72, 75, 76, 77, 83, 87, 91, 99, 102, 116, 117, 124, 141, 142, 144, 156 y 162	Grupo 2 (n=20): 57, 61, 62, 68, 78, 81, 86, 89, 97, 110, 129, 132, 135, 150, 152, 154, 160, 165, 167 y 168	Grupo 3 (n=10): 51, 69, 80, 85, 104, 105, 128, 131, 133 y 155

Criterios de inclusión/exclusión

Todos los lechones enrolados en este estudio fueron negativos por ELISA para PRRS y estaban sanos en el momento de la vacunación como se ha determinado por observación.

5 Criterios de eliminación después de la inclusión

No se eliminaron cerdos del estudio.

Manipulación y alojamiento de los animales

Alojamiento de los animales

10 Los lechones se alojaron en Veterinary Resources, Inc. (VRI) en Cambridge, IA, durante la duración del estudio. Los grupos 1, 2 y 3 se alojaron en habitaciones uniformes pero separadas para garantizar la bioseguridad. Los lechones se alojaron en múltiples corrales (5 lechones/corral) dentro de cada habitación. El Grupo 1 se alojó en 4 corrales en la Habitación 5, el Grupo 2 se alojó en 4 corrales en la Habitación 6 y el Grupo 3 se alojó en 2 corrales en la Habitación 4. Los corrales estaban constituidos por cubas de plástico sobre bases elevadas con revestimiento del suelo de pizarra de plástico. Cada corral contuvo un comedero de 6 orificios de plástico y un bebedero de boquilla.

15 Cada habitación de aislamiento se construyó idéntica a las otras y todas cumplen el nivel de biorriesgo 2 (BL2), se filtran con Hepa, se ventilan mecánicamente con control de temperatura regulado por termostato.

20 El aislamiento del grupo de tratamiento fue necesario en este estudio ya que es muy conocido dentro de la comunidad científica que el PRRSv se propaga fácilmente de cerdo a cerdo por diversos mecanismos que incluyen la aerosolización. Esto incluye vacunas contra el PRRS vivas avirulentas ya que estos productos biológicos incluyen partículas víricas atenuadas que imitan las características del PRRS natural virulento sin la capacidad para producir enfermedad. Los métodos apropiados fueron *in situ* para garantizar que se mantenía la bioseguridad y que los animales vacunados no se contaminaban accidentalmente de forma cruzada con animales de control negativo sin tratamiento previo contra el PRRSv no vacunados. El personal de la instalación de prueba tomó medidas apropiadas para limpiar y desinfectar adecuadamente cada habitación antes de su uso para este estudio.

25 Cada habitación en la instalación tiene ventiladores y calefactores para ayudar en la suficiente circulación y el calentamiento del aire. El sistema de ventilación es separado aunque idéntico para cada habitación, por lo que el aire no es compartido entre habitaciones.

30 El pienso sólido se almacenó en bolsas, libres de bichos. El agua estaba a voluntad. Los lechones se alimentaron con una ración comercial (Lean Metrics Infant, Purina Mills, St. Louis, MO) medicada con tiamulina (35 g/ton) y clortetraciclina (400 g/ton) a voluntad apropiada para su tamaño, edad y condición; según prácticas de cría de animales aceptables para la región. Los cerdos tenían buen estado de salud y nutricional antes de iniciarse el estudio como se ha determinado por el investigador del estudio.

35 Durante el estudio se observaron animales seleccionados con una leve pérdida de condición corporal, aspecto despeinado del pelo, articulaciones hinchadas y grados variables de cojera. El investigador del estudio consideró que todo esto eran condiciones no específicas que comúnmente se producían en grupos de cerdos alojados en confinamiento. También se anotaron tos, estornudos, respiración rápida, disnea y letargo de leve a moderado en cerdos seleccionados después de la exposición y se consideraron signos clínicos típicos asociados a neumonía, aunque no específicos para etiología. El investigador del estudio determinó que no se requerían tratamientos concomitantes para ningún animal durante este estudio.

40 Todos los cerdos asignados a este estudio fueron desechados por incineración comercial después de la eutanasia y autopsia en D24. Ningún producto alimenticio de los animales enrolados en este estudio entró en la cadena alimentaria humana.

Evaluación de la eficacia

45 Para evaluar la OOI de MLV contra el PRRSV 94881 2 semanas después de la vacunación, los Grupos 1 y 2 se expusieron en D14 y se evaluaron las lesiones pulmonares después de la exposición. Se logró una OOI de 2 semanas después de la vacunación cuando el Grupo 1 (dosis de inmunización mínima de MLV contra el 94881 del PRRS) demostró una patología pulmonar significativamente disminuida ( $p \leq 0,05$ ) después de la exposición en comparación con el grupo de control de exposición (Grupo 2).

50 Los parámetros de eficacia secundaria analizados entre el grupo de vacunas y el grupo de control de exposición incluyeron evaluaciones clínicas después de la vacunación, observaciones clínicas después de la exposición, temperaturas rectales, peso corporal y aumento de peso diario promedio (ADWG), evaluación de anticuerpos del PRRS y viremia en muestras de suero y cuantificación del virus PRRS en muestras de pulmón recogidas en la autopsia.

Un grupo de control negativo (Grupo 3), que no se expuso, se incluyó en el estudio para demostrar que la pira fuente estaba libre de infección por PRRS y que la bioseguridad se mantenía durante el estudio.

#### Criterios para una prueba válida

5 Se requirió que todas las muestras de suero antes de la compra y en D0 fueran negativas para anticuerpos del PRRS.

Las muestras de suero recogidas de los Grupos 2 y 3 hasta el día de la exposición y del Grupo 3 hasta que se completara el estudio tuvieron que estar libres de anticuerpos del PRRS para que el estudio fuera válido.

#### Parámetros de resultados primarios

10 La variable de eficacia primaria para la evaluación estadística fue puntuaciones de lesión pulmonar totales en D24 del estudio.

#### Puntuaciones de lesión pulmonar total

15 En el Día 24, después de recogerse y registrarse los datos y las muestras, todos los cerdos del estudio se sacrificaron siguiendo VRI SOP PRC1027 (Apéndice 1, Anexo 8). A cada cerdo se le practicó la autopsia según VRI SOP PRC 1028. La cavidad torácica se expuso por un representante y se extrajeron el corazón y los pulmones. El investigador del estudio examinó cada conjunto de pulmones, describió cualquier patología macroscópica observada y determinó el % de patología para cada lóbulo del pulmón. Las observaciones y los datos se registraron en el cuaderno de recogida de datos del informe de la autopsia. Para cada cerdo se determinó una puntuación de lesión pulmonar total usando la fórmula de EP.

#### Parámetros de apoyo

20 Otros parámetros que iban a analizarse entre el Grupo 1 y el Grupo 2 incluyeron evaluaciones clínicas después de la vacunación, serología del PRRS, viremia después de la vacunación, observaciones clínicas después de la exposición, ADWG, temperaturas rectales y cuantificación del virus en los pulmones después de la exposición. Estos parámetros se analizaron como parámetros de apoyo y no sirvieron de parámetros primarios para satisfacer el objetivo del estudio.

25 Evaluación clínica

Todos los cerdos se observaron en los días expuestos en la Tabla 7.1 para evaluaciones clínicas después de la vacunación por el investigador del estudio o representantes. Las observaciones se registraron en el cuaderno de recogida de datos de las evaluaciones clínicas.

#### Serología del PRRS

30 Se recogió sangre venosa completa en los días expuestos en la Tabla 3. Brevemente, se recogieron aproximadamente 2-5 ml de sangre de cada lechón en un tubo(s) separador(es) de suero (SST) de tamaño apropiado. Se registraron las recogidas de muestras Se registraron las recogidas de muestras en el cuaderno de recogida de datos de la recogida de muestras. Se dejó que la sangre coagulara a temperatura ambiente en los SST. Las muestras de sangre fueron llevadas a BIVI-Ames en el día de recogida y se completó el cuaderno de recogida de datos de la entrega de especímenes. Las muestras de sangre se centrifugaron por BIVI-Ames y el suero se recogió, se fraccionó y se transfirió a tubos apropiados. Cada tubo se etiquetó con el número de ID del lechón, el número de estudio, la fecha de recogida, el día de estudio y el tipo de muestra. En BIVI-Ames, un conjunto de muestras de suero se mantuvo a 2-8°C y el otro conjunto de muestras de suero se mantuvo a -70 ± 10°C.

40 Las muestras de suero recogidas los días 0, 7, 14, 17, 21 y 24 y mantenidas a 2-8°C se probaron por BIVI-Ames para anticuerpos del PRRS. Los resultados se informaron como negativos (relación S/P de ELISA de < 0,4) o positivos (relación S/P de ELISA de ≥ 0,4).

#### Viremia del PRRS

El otro conjunto de muestras de suero recogido en los días 0, 7, 14, 17, 21 y 24 y mantenido a -70 ± 10°C en BIVI-Ames hasta que se completó la fase en vida del estudio.

45 Un cuaderno de recogida de datos de la entrega de especímenes completo se incluyó con el envío. BioScreen probó las muestras de suero para ARN del PRRSv por qPCR. Los resultados se informaron como equivalente de genoma/ml (log GE/ml).

#### Observaciones clínicas después de la exposición

50 Los lechones se observaron para signos clínicos de enfermedad en los días expuestos en la Tabla 7.1. Las observaciones se realizaron por el investigador del estudio o representantes y se registraron en el cuaderno de

recogida de datos de las observaciones clínicas. Los lechones se observaron cada día para respiración, comportamiento y tos basándose en el sistema de puntuación de observaciones clínicas explicado a continuación en la Tabla 7.8.

Tabla 7.8 Sistema de puntuación de observaciones clínicas

Respiración	Comportamiento	Tos
0 = respiración normal	0 = normal	0 = ninguna
1 = respiración jadeante/rápida	1 = letargo de leve a moderado	1 = tos suave o intermitente
2 = disnea	2 = gravemente letárgico o recostado	2 = tos áspera o grave, repetitiva
3 = muerto	3 = muerto	3 = muerto

5

Aumento de peso diario promedio (ADWG)

Los pesos corporales individuales se recogieron en los días expuestos en la Tabla 3. Cada cerdo se pesó en una báscula calibrada por el investigador del estudio o representantes. Los resultados se informaron en kg en el cuaderno de recogida de datos del peso corporal. El aumento de peso diario promedio se determinó de D0 a D14 y de D14 a D24.

10

Temperaturas rectales

Las temperaturas rectales se recogieron por el investigador del estudio o representantes en los días expuestos en la Tabla 6.1. Las temperaturas rectales se registraron en °C en el cuaderno de recogida de datos de las observaciones clínicas.

15

Cuantificación del virus PRRS en tejido de pulmón

Para cada conjunto de pulmones se retuvieron dos muestras de los lóbulos apicales izquierdo y derecho, los lóbulos cardíacos izquierdo y derecho, los lóbulos diafragmáticos izquierdo y derecho y el lóbulo intermedio. Cada muestra de pulmón tenía aproximadamente 1 pulgada (2,54 cm) x 1 pulgada (2,54 cm). Para un conjunto de muestras de pulmón, las tres muestras del lado izquierdo se combinaron en un recipiente; mientras que las tres muestras del lado derecho y la muestra del lóbulo intermedio del pulmón se combinaron en otro recipiente. Cada recipiente se llenó con una cantidad suficiente de 10% de disolución de formalina. Para el otro conjunto de muestras de pulmón, las tres muestras de pulmón del lado izquierdo se combinaron en un Whirlpak®; mientras que las tres muestras del lado derecho y la muestra del lóbulo intermedio del pulmón se combinaron en otro Whirlpak®. Todos los recipientes y Whirlpak® se etiquetaron apropiadamente con el número de animal, número de estudio, fecha de recogida, día de estudio, tipo de muestra y si las muestras son del lado izquierdo o derecho. Las muestras de pulmón en Whirlpak® se almacenaron sobre nieve carbónica hasta que se transportaron a BIVI-Ames, mientras que las muestras en formalina se almacenaron a temperatura ambiente. Las recogidas de muestras se registraron en el cuaderno de recogida de datos del informe de la autopsia. Las muestras de tejido de pulmón fijadas en formalina y las muestras de pulmón en Whirlpak® se transfirieron a BIVI-Ames. Un cuaderno de recogida de datos de la entrega de especímenes completo se incluyó con cada envío.

20

25

30

Un cuaderno de recogida de datos de la entrega de especímenes completo se incluyó con el envío. BioScreen probó las muestras de pulmón para ARN del PRRSv por qPCR (Apéndice 1, Anexo 7). Los tejidos de pulmón izquierdo se homogeneizaron y probaron. Los tejidos del pulmón derecho y las muestras del lóbulo intermedio del pulmón se homogeneizaron y se probaron. Los resultados se informaron como equivalente de genoma (log GE/ml) para muestras del pulmón izquierdo y derecho.

35

Acontecimientos adversos

No se informó de acontecimientos adversos durante este estudio.

Métodos estadísticos

Unidad experimental

40

Los grupos de tratamiento tuvieron que alojarse en habitaciones separadas en este estudio para evitar la transmisión del PRRSv a grupos no vacunados. Por tanto, la habitación fue la unidad experimental. Sin embargo, para los fines de este análisis se ignoró un posible debido a confundir los efectos de "habitación" y "tratamiento", y el lechón se usó como unidad experimental.

Aleatorización

45

Cincuenta (50) lechones se asignaron a bloques por peso (n=5 lechones/bloque). A cada cerdo se le asignó un número aleatorio usando la función de números aleatorios en Excel. Dentro de cada bloque de peso, los cerdos se clasificaron en orden numérico ascendente del número aleatorio asignado. Entonces, los grupos de tratamiento se

asignaron a cerdos en este orden numérico: los 2 números aleatorios más bajos se asignaron al grupo 1, los 2 siguientes números se asignaron al grupo 2 y el número más alto se asignó al Grupo 3. Los Grupos 1 y 2 contuvieron cada uno 20 cerdos y el Grupo 3 contuvo 10 cerdos.

Análisis

- 5 Los análisis estadísticos y los resúmenes de datos se realizaron por Dr. rer. hort. Martin Vanselow, Biometrie & Statistik, Zum Siemenshop 21, 30539 Hannover, Alemania, +49(0) 511 606 777 650, [m.vanselow@t-online.de](mailto:m.vanselow@t-online.de).

Los datos se analizaron suponiendo una estructura de diseño completamente aleatoria. Los análisis estadísticos se realizaron usando la versión del software SAS 8.2 (SAS, Cary, EE.UU./Carolina del Norte, SAS Institute Inc). Todas las pruebas en diferencias se diseñaron como pruebas bilaterales a  $\alpha = 5\%$ .

- 10 Puntuaciones de lesión pulmonar total

La puntuación de lesión pulmonar total en el día de la autopsia (D24) se midió como el porcentaje de implicación pulmonar calculado según la fórmula de ponderación recomendada en el borrador de la monografía Vacuna contra la neumonía enzoótica porcina (inactivada). Esta fórmula tiene en cuenta el peso relativo de cada uno de los siete lóbulos del pulmón. El porcentaje evaluado del área del lóbulo del pulmón con lesiones típicas se multiplicó por el factor respectivo por lóbulo del pulmón dando la puntuación de lesión pulmonar ponderada total. Los factores para los lóbulos de pulmón respectivos se presentan en la Tabla 7.9.

Tabla 7.9 Factores para calcular las puntuaciones de lesión pulmonar

Lóbulo del pulmón	Factor
Apical izquierdo	0,05
Cardíaco izquierdo	0,06
Diafragmático izquierdo	0,29
Apical derecho	0,11
Cardíaco	0,10
Diafragmático derecho	0,34
Accesorio/intermedio derecho	0,05

Los grupos de tratamiento se compararon en diferencias usando la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney.

- 20 Evaluación clínica después de la vacunación

Se generaron tablas de frecuencias de animales con al menos un hallazgo positivo entre D1 y D12. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se probaron por la prueba exacta de Fisher.

Serología del PRRS

- 25 Se generaron tablas de frecuencias de resultados positivos por ELISA. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se probaron por la prueba exacta de Fisher.

Viremia del PRRS

Los datos de viremia se evaluaron por separado para cada día de investigación. Adicionalmente, para la carga vírica se analizaron las áreas bajo las curvas de respuesta individuales entre D14 y D24 (ABC D14-D24) y entre D17 y D24 (ABC D17-D24).

- 30 Los datos de PCR cuantitativa (carga vírica del PRRS [ $\log_{10}$  GE/ml]) se usaron para comparaciones entre los grupos de tratamiento por la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney. Antes de los cálculos, el resultado analítico 'no detectado' se sustituyó por un valor de  $\log_{10}$  GE/ml de 0,0 y 'positivo' se sustituyó por 3,0. Los grupos de tratamiento se probaron en diferencias usando la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney.

Observaciones clínicas después de la exposición

- 35 Se generaron tablas de frecuencias de animales con al menos un hallazgo positivo entre D15 y D24. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se probaron por la prueba exacta de Fisher.

Las puntuaciones máximas y las puntuaciones medias por animal de D15 a D24 para respiración, comportamiento, tos y para los tres sumados juntos (total) se usaron para la evaluación estadística. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se probaron por la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney.

- 40

Peso corporal y aumento de peso diario promedio

Los aumentos de peso diarios individuales se calcularon para los periodos de tiempo entre D0 y D14 y entre D14 y D24. Para cada día de investigación y para cada periodo de tiempo se calcularon las estadísticas descriptivas. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se probaron usando análisis de la varianza y posteriores pruebas de la t.  
 5 Las medias por mínimos cuadrados de los grupos y las diferencias entre las medias por mínimos cuadrados con intervalos de confianza de 95% se calcularon a partir del análisis de la varianza.

Temperaturas rectales

Las diferencias entre los grupos de tratamiento con respecto a los datos de temperatura originales se probaron usando análisis de la varianza y posteriores pruebas de la t. Las medias por mínimos cuadrados de los grupos y las diferencias entre las medias por mínimos cuadrados con intervalos de confianza de 95% se calcularon a partir del análisis de la varianza.  
 10

Cuantificación del virus PRRS en tejidos de pulmón

Los datos de PCR cuantitativa (carga vírica del PRRS [ $\log_{10}$  GE/ml]) de pulmones recogidos en D24 se usaron para comparaciones entre los grupos de tratamiento por la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney. Para la evaluación se usó el promedio ( $\log_{10}$  GE/ml) de los resultados de qPCR del pulmón izquierdo y derecho. Antes de los cálculos, el resultado analítico 'no detectado' se substituyó por  $\log_{10}$  GE/ml de 0,0 y 'positivo' se substituyó por 3,0.  
 15

Se generaron tablas de frecuencias de resultados por qPCR positivos. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se probaron por la prueba exacta de Fisher.

Resultados

20 Puntuaciones de lesión pulmonar total

Un resumen de las puntuaciones de lesión pulmonar totales por grupo y del valor de p asociado se muestra a continuación en la Tabla 7.10.

Tabla 7.10 Puntuaciones de lesión pulmonar totales (%)

Grupo <sup>1</sup>	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	Valor de p
1	20	0,06	59,30	27,550	12,270	40,600	29,515	27,368	<b>0,0002</b>
2	20	13,86	91,60	55,200	47,300	66,500	21,850	54,841	
3	10	0,00	0,06	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el PRRSV 94881 a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NI = no incluido en el análisis estadístico.  
 25

Las puntuaciones de lesión pulmonar totales medias de lechones de D24 fueron 27,368% y 54,841% para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y controles de exposición, respectivamente. La puntuación de lesión para los cerdos vacunados contra el PRRS fue significativamente menor que la puntuación de lesión media para los controles de exposición (**p=0,0002**).

30 Viremia del PRRS

Un resumen del ARN del PRRSv detectado en suero por datos de qPCR se muestra a continuación en la Tabla 7.11.

Tabla 7.11 ARN del PRRSv detectado por qPCR en suero ( $\log_{10}$  GE/ml) por día

Día	Grupo <sup>1</sup>	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	Valor de p
7	1	20	0,00	5,34	3,00	3,00	3,79	0,82	3,17	<b>&lt;0,0001</b>
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
14	1	20	0,00	4,29	3,32	3,00	3,77	0,84	3,30	<b>&lt;0,0001</b>
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
17	1	20	5,54	8,07	6,72	6,47	7,08	0,80	6,78	<b>&lt;0,0001</b>
	2	20	6,44	9,02	8,18	7,47	8,47	1,09	8,00	
	3	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
21	1	20	6,18	8,73	7,38	7,13	8,08	0,98	7,51	0,0565

	2	20	7,22	8,86	7,87	7,62	8,11	0,57	7,88	
	3	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
24	1	20	5,82	8,54	7,15	6,73	7,84	1,16	7,26	0,6251
	2	20	6,53	8,29	7,27	6,97	7,60	0,67	7,34	
	3	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
ABC 14-24	1	20	56,95	78,02	65,10	60,39	70,05	9,76	65,84	0,4945
	2	20	58,74	74,30	67,02	64,38	68,24	4,83	66,61	
	3	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
ABC17-24	1	20	42,98	59,51	49,52	47,46	54,30	7,14	50,72	<b>0,0039</b>
	2	20	49,08	60,99	54,35	52,93	55,38	3,63	54,61	
	3	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el PRRSV 94881 a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NI = no incluido en el análisis estadístico. ABC = área bajo la curva; GE/ml por día

- 5 El ARN del PRRSV no se detectó en el suero de ningún lechón en D0. Los cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 tuvieron valores medios de 3,17 y 3,30 log<sub>10</sub> GE/ml en D7 y D14, respectivamente. Los valores fueron significativamente superiores a los controles de exposición en ambos días (**p<0,0001**), ya que los controles de exposición no tuvieron ARN del PRRSV detectado hasta D17. En ese día, los valores medios fueron 6,78 y 8,00 log<sub>10</sub> GE/ml para lechones vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 y controles de exposición, respectivamente. El valor de D17 para controles de exposición fue significativamente mayor que para los lechones vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 (**p<0,0001**). Los valores medios para cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 en D21 y D24 fueron 7,51 y 7,26 log<sub>10</sub> GE/ml en D21 y D24 respectivamente, en comparación con 7,88 y 7,34 log<sub>10</sub> GE/ml para controles de exposición en los mismos días. No hubo diferencias significativas entre cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 en D21 ó 24 (p≥0,0565). No se detectó ARN del PRRSV en suero de ningún cerdo de control negativo durante este estudio.
- 10
- 15 No hubo diferencias entre el ABC 14-24 para cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 y cerdos del control de exposición (65,84 y 66,61, respectivamente; p=0,4945). Los cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 tuvieron un ABC significativamente menor para D17-D24 en comparación con los controles de exposición (50,72 y 54,61, respectivamente; **p=0,0039**).

#### Cuantificación del virus PRRS en tejidos de pulmón

- 20 Los resultados individuales de qPCR del PRRSV de tejidos de pulmón recogidos en la autopsia en D24 se presentan en el Apéndice 1, Tabla 30. Un resumen del ARN del PRRSV detectado en tejidos de pulmón por datos de qPCR se muestra a continuación presentado en la Tabla 7.12 y un resumen de la frecuencia de animales con qPCR positiva en la autopsia se muestra a continuación en la Tabla 7.13.

Tabla 7.12 Aislamiento del virus de los pulmones, qPCR (log<sub>10</sub> GE/ml medio) en la autopsia (D24)

Grupo <sup>1</sup>	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	Valor de p
1	20	6,63	8,26	7,46	7,07	7,86	0,84	7,47	<b>0,0101</b>
2	20	6,55	8,67	7,99	7,69	8,14	0,54	7,88	
3	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI

- 25 <sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el PRRSV 94881 a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NA = no aplicable debido a la falta de variabilidad. NI = no incluido en el análisis estadístico.

Tabla 7.13 Frecuencia de animales con posible ARN del PRRSV, PCR de tejidos de pulmón recogidos en la autopsia (D24)

Día	Grupo	N	%	IC de 95%		Total	P
24	1	20	100	83,2	100,0	20	NA
	2	20	100	83,2	100,0	20	
	3	0	0	0,0	30,8	10	NI

- 30 <sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el PRRSV 94881 a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NA = no aplicable debido a la falta de variabilidad. NI = no incluido en el análisis estadístico.



Se detectó ARN del PRRSv en los tejidos de pulmón de todos los lechones en tanto el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 como en todos los lechones en el grupo de control de exposición. No hubo diferencia entre estos grupos. No se detectó ARN del PRRSv en las muestras de pulmón de ningún lechón de control negativo.

Observaciones clínicas después de la exposición

- 5 La frecuencia de lechones con al menos una puntuación de evaluación clínica positiva en el periodo después de la exposición (D15-D24) se muestra a continuación en la Tabla 7.14.

Tabla 7.14 Frecuencia de lechones con una observación clínica positiva después de la exposición (D15-D24)

Parámetro	Grupo <sup>1</sup>	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Total	Valor de p
Respiración	1	2	10	1,2	31,7	20	0,2351
	2	6	30	11,9	54,3	20	
	3	0	0	0,0	30,8	10	NI
Comportamiento	1	0	0	0,0	16,8	20	<b>0,0012</b>
	2	9	45	23,1	68,5	20	
	3	0	0	0,0	30,8	10	NI
Tos	1	6	30	11,9	54,3	20	0,2003
	2	11	55	31,5	76,9	20	
	3	0	0	0,0	30,8	10	NI
Total	1	6	30	11,9	54,3	20	0,0562
	2	13	65	40,8	84,6	20	
	3	0	0	0,0	30,8	10	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el PRRSV 94881 a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NI = no incluido en el análisis estadístico.

- 10 La respiración anormal se observó en tanto el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 (10%) como en el grupo de control de exposición (30%), sin embargo, estos valores no fueron significativamente diferentes (p=0,2351).

El comportamiento anormal sólo se observó en el grupo de control de exposición (45%), y no en el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 (0%). El grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 tuvo una incidencia significativamente menor del comportamiento anormal que los controles de exposición (**p=0,0012**).

- 15 La tos se observó en tanto el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 (30%) como en el grupo de control de exposición (55%). Estos valores no fueron significativamente diferentes (p=0,2003).

Los porcentajes de lechones con puntuaciones clínicas totales > 0 fueron de 30% y 65% para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. Estos valores no fueron significativamente diferentes (p=0,0562).

- 20 No se observaron signos clínicos en el grupo de control negativo en ningún momento después de la exposición.

Un resumen de las puntuaciones de observaciones clínicas máximas por grupo para el periodo después de la exposición (D15 a D24) se muestra a continuación en la Tabla 7.15.

Tabla 7.15 Puntuaciones clínicas máximas después de la exposición, D15 a D24

Parámetro	Grupo <sup>1</sup>	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	Valor de p
Respiración	1	20	0	1	0	0	0	0	0,1	0,1872
	2	20	0	2	0	0	1	1	0,4	
	3	10	0	0	0	0	0	0	0,0	NI
Comportamiento	1	20	0	0	0	0	0	0	0,0	<b>0,0012</b>
	2	20	0	1	0	0	1	1	0,5	
	3	10	0	0	0	0	0	0	0,0	NI
Tos	1	20	0	1	0	0	1	1	0,3	0,1129
	2	20	0	2	1	0	1	1	0,7	
	3	10	0	0	0	0	0	0	0,0	NI
Total	1	20	0	1	0	0	1	1	0,3	<b>0,0072</b>

	2	20	0	4	1	0	2	2	1,2	
	3	10	0	0	0	0	0	0	0,0	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el PRRSV 94881 a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NI = no incluido en el análisis estadístico.

5 La respiración anormal se observó en tanto el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 como en los controles de exposición después de la administración de exposición, con puntuaciones máximas de 1 (respiración jadeante/rápida) y 2 (disnea), respectivamente. No hubo diferencia significativa entre estas puntuaciones de respiración (**p=0,1872**). La mediana de la puntuación de respiración máxima fue 0 para ambos grupos.

10 No se observó comportamiento anormal en el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 en el periodo después de la exposición (puntuación máxima = 0). A diferencia, el grupo de control de exposición tuvo una puntuación de comportamiento máxima de 1 (letargo de leve a moderado; p=0,0012), aunque la mediana de la puntuación para este grupo fue 0. La puntuación máxima para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 fue significativamente menor que la puntuación para el grupo de control de exposición (**p=0,0012**). Las medianas de las puntuaciones de comportamiento máximas fue 0 para ambos grupos.

15 Se observó tos en tanto el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 como en el grupo de control de exposición después de la exposición. Las puntuaciones máximas fueron 1 (tos suave o intermitente) y 2 (tos áspera o grave, repetitiva), y las medianas de las puntuaciones fueron 0 y 1 para vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 y controles de exposición, respectivamente. No hubo diferencias significativas entre estos grupos (**p=0,1129**). Las medianas de las puntuaciones de tos máximas fueron 0 y 1 para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente.

20 Las puntuaciones totales máximas fueron 1 y 4 y las medianas de las puntuaciones totales fueron 0 y 1 para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. La puntuación máxima para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 fue significativamente menor que la puntuación para el grupo de control de exposición (**p=0,0072**). Las medianas de las puntuaciones totales fueron 0 y 1 para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente.

25 No se observaron signos clínicos de D15 a D24 en el grupo de control negativo no expuesto durante este estudio. Este grupo tuvo una puntuación máxima de 0 para cada parámetro.

Un resumen de las puntuaciones de observaciones clínicas medias por grupo para el periodo después de la exposición (D15 a D24) se muestra a continuación en la Tabla 7.16.

Tabla 7.16 Puntuaciones clínicas medias después de la exposición, D15 a D24

Parámetro	Grupo <sup>1</sup>	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	Valor de p
Respiración	1	20	0,0	0,2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,1394
	2	20	0,0	0,6	0,00	0,00	0,10	0,10	0,07	
	3	10	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
Comportamiento	1	20	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>0,0012</b>
	2	20	0,0	0,8	0,00	0,00	0,10	0,10	0,12	
	3	10	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
Tos	1	20	0,0	0,4	0,00	0,00	0,10	0,10	0,07	0,0835
	2	20	0,0	0,7	0,10	0,00	0,30	0,35	0,17	
	3	10	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
Total	1	20	0,0	0,4	0,00	0,00	0,10	0,15	0,08	<b>0,0103</b>
	2	20	0,0	1,4	0,25	0,00	0,40	0,50	0,35	
	3	10	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI

30 <sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el PRRSV 94881 a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NI = no incluido en el análisis estadístico

Las puntuaciones de observaciones clínicas medias siguieron un patrón similar a las puntuaciones clínicas máximas con diferencias significativas sólo observadas entre el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición para la puntuación de comportamiento media (**p=0,0012**) y la puntuación total media (**p=0,0103**).

35 Las puntuaciones de respiración medias fueron 0,02 y 0,07 para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. Las puntuaciones de comportamiento medias fueron 0,00 y 0,12 para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición,

respectivamente. Las puntuaciones de los medios fueron 0,07 y 0,17 para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. Las puntuaciones totales medias fueron 0,08 y 0,35 para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y grupo de control de exposición, respectivamente.

5 No se observaron signos clínicos de D15 a D24 en los controles negativos no expuestos durante este estudio. Este grupo tuvo una puntuación media de 0 para cada parámetro.

Peso corporal y aumento de peso diario promedio

Un resumen de los pesos corporales en D0, D14 y D24 y ADWG para D0 a D14 y D14 a D24 se muestra a continuación en la Tabla 7.17.

Tabla 7.17 Peso corporal y aumento de peso diario promedio (kg y kg/d)

Día(s)	Grupo <sup>1</sup>	N	Mín.	Máx.	Mediana	Media	DE
0	1	20	3,3	5,5	3,95	4,14	0,589
	2	20	3,2	5,2	4,05	4,17	0,603
	3	10	3,4	5,1	4,00	4,07	0,556
14	1	20	5,6	9,4	7,60	7,64	1,029
	2	20	6,0	8,9	7,30	7,39	0,909
	3	10	5,5	9,3	6,95	7,22	1,187
24	1	20	7,0	13,9	10,40	10,26	1,693
	2	20	6,4	10,9	8,80	8,87	1,328
	3	10	6,8	12,9	10,90	10,64	1,807
ADWG 0 – 14	1	20	0,164	0,343	0,2571	0,2500	0,05254
	2	20	0,179	0,307	0,2357	0,2304	0,03939
	3	10	0,150	0,307	0,2071	0,2250	0,04906
ADWG 14 – 24	1	20	0,090	0,460	0,2600	0,2620	0,08907
	2	20	-0,060	0,290	0,1600	0,1475	0,09060
	3	10	0,130	0,440	0,3700	0,3420	0,10130

10 <sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el PRRSV 94881 a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto.

15 Los pesos corporales medios en D0 fueron 4,1 y 4,2 kg para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. En D14, los pesos corporales medios fueron 7,6 y 7,4 kg para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. En D24, los pesos corporales medios fueron 10,3 y 8,9 kg para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. Los aumentos de peso diario promedio (ADWG) durante el periodo de vacunación (D0 a D14) fueron 0,25 y 0,23 kg/d para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. Los ADWG durante el periodo de exposición (D14 a D24) fueron 0,26 y 0,15 kg/d para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. Los ADWG para los controles negativos fueron 0,23 y 0,34 kg/d para D0-D14 y D14-D24, respectivamente.

20 Los lechones de control negativo tuvieron pesos corporales medios de 4,1, 7,2 y 10,6 kg en D0, D14 y D28, respectivamente.

25 Un resumen de la media por LS y el análisis estadístico de pesos corporales y ADWG para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición se muestra a continuación en la Tabla 7.18.

Tabla 7.18 Peso corporal medio de LS y aumento diario (kg)

Día(s)	Grupo <sup>1</sup>	Media por LS	Intervalo de confianza de 95%		Valor de p
0	1	4,14	3,865	4,405	0,8743
	2	4,17	3,895	4,435	
	Dif. 1-2	-0,03	-0,411	0,351	
14	1	7,64	7,196	8,074	0,4297
	2	7,39	6,951	7,829	
	Dif. 1-2	0,25	-0,376	0,866	

24	1	10,26	9,566	10,944	<b>0,0063</b>
	2	8,87	8,176	9,554	
	Dif. 1-2	1,39	0,416	2,364	
ADWG 0 – 14	1	0,2500	0,22898	0,27102	0,1889
	2	0,2304	0,20934	0,25138	
	Dif. 1-2	0,0196	-0,01008	0,04937	
ADWG 14 – 24	1	0,2620	0,22133	0,30267	<b>0,0003</b>
	2	0,1475	0,10683	0,18817	
	Dif. 1-2	0,1145	0,05699	0,17201	

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el PRRSV 94881 a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto.

- 5 Los pesos corporales medios por LS en Día 0 fueron 4,14 y 4,17 kg para los lechones vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. La diferencia fue -0,03 kg, que no fue significativamente diferente ( $p=0,8743$ ). En D14, los pesos corporales medios por LS fueron 7,64 y 7,39 kg para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. La diferencia fue 0,25 kg, que tampoco fue significativamente diferente ( $p=0,4297$ ). En D24, los pesos corporales medios por LS fueron 10,26 y 8,87 para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. La diferencia en este día fue 1,39 kg, y el peso del grupo vacunado fue significativamente superior al del grupo de control de exposición ( $p=0,0063$ ).
- 10 Los ADWG medios por LS durante el periodo de vacunación (D0-D14) fueron 0,25 y 0,23 kg/d para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. Estos valores no fueron significativamente diferentes ( $p=0,1889$ ). Los ADWG medios por LS durante el periodo después de la exposición (D14-D24) fueron 0,26 y 0,15 para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. El ADWG para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 fue significativamente superior al ADWG para el grupo de control de exposición ( $p=0,0003$ ).
- 15

#### Temperaturas rectales

Un resumen de temperaturas rectales se muestra a continuación en las Tablas 7.19 y 7.20. Un resumen de la media por LS y el análisis estadístico de la temperatura rectal para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición se muestra a continuación en las Tablas 7.21 y 7.22.

20 Tabla 7.19 Temperatura rectal (°C) Día 13-22

Día	Grupo <sup>1</sup>	N	Mín.	Máx.	Mediana	Media	DE
13	1	20	39,3	40,3	39,80	39,77	0,247
	2	20	38,9	40,0	39,35	39,39	0,292
	3	10	39,0	39,7	39,15	39,26	0,267
14	1	20	39,4	40,2	39,75	39,76	0,226
	2	20	39,0	39,8	39,40	39,37	0,220
	3	10	39,1	40,3	39,40	39,51	0,375
15	1	20	39,3	40,4	39,65	39,69	0,258
	2	20	39,4	41,1	39,70	39,90	0,538
	3	10	39,1	40,3	39,40	39,52	0,371
16	1	20	39,9	41,3	40,80	40,68	0,417
	2	20	39,3	40,3	39,75	39,77	0,279
	3	10	39,1	39,9	39,45	39,46	0,263
17	1	20	39,2	40,6	39,80	39,89	0,363
	2	20	39,4	40,6	39,85	39,90	0,285
	3	10	39,2	40,0	39,50	39,53	0,226
18	1	20	39,3	41,0	39,95	39,99	0,492
	2	20	39,5	41,2	40,20	40,29	0,472
	3	10	38,9	39,7	39,30	39,30	0,211
19	1	20	39,7	41,6	40,35	40,40	0,464

ES 2 692 809 T3

	2	20	39,5	41,1	40,65	40,55	0,451
	3	10	39,0	39,6	39,20	39,22	0,199
	1	20	39,7	41,5	40,50	40,52	0,449
20	2	20	39,5	41,5	40,65	40,61	0,531
	3	10	39,1	40,1	39,40	39,49	0,281
	1	20	39,6	41,1	40,30	40,22	0,413
21	2	20	39,4	41,0	40,10	40,12	0,371
	3	10	39,2	40,2	39,45	39,59	0,351
	1	20	39,8	41,0	40,20	40,34	0,391
22	2	20	39,6	41,2	40,30	40,41	0,437
	3	10	39,0	40,0	39,40	39,45	0,276

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el PRRSV 94881 a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto.

Tabla 7.20 Temperatura rectal (°C) Día 23-24

Día	Grupo <sup>1</sup>	N	Min.	Máx.	Mediana	Media	DE
23	1	20	39,6	41,2	40,25	40,36	0,454
	2	20	39,5	41,6	40,60	40,60	0,482
	3	10	39,3	40,1	39,70	39,68	0,290
24	1	20	39,8	41,3	40,30	40,39	0,421
	2	20	39,7	41,6	40,30	40,50	0,531
	3	10	39,1	40,2	39,60	39,66	0,389

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el PRRSV 94881 a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto

5

Tabla 7.21 Temperatura rectal media por LS (°C) Día 13 – 20

Día	Grupo <sup>1</sup>	Media por LS	Intervalo de confianza de 95%		Valor de p
13	1	39,77	39,648	39,892	<b>&lt;0,0001</b>
	2	39,39	39,268	39,512	
	Dif. 1-2	0,38	0,207	0,553	
14	1	39,76	39,654	39,856	<b>&lt;0,0001</b>
	2	39,37	39,269	39,471	
	Dif. 1-2	0,39	0,242	0,528	
15	1	39,69	39,494	39,876	0,1241
	2	39,90	39,704	40,086	
	Dif. 1-2	-0,21	-0,480	0,060	
16	1	40,68	40,514	40,836	<b>&lt;0,0001</b>
	2	39,77	39,609	39,931	
	Dif. 1-2	0,91	0,678	1,132	
17	1	39,89	39,737	40,033	0,8852
	2	39,90	39,752	40,048	
	Dif. 1-2	-0,02	-0,224	0,194	
18	1	39,99	39,767	40,203	0,0528
	2	40,29	40,072	40,508	
	Dif. 1-2	-0,31	-0,614	0,004	
19	1	40,40	40,188	40,602	0,3065
	2	40,55	40,338	40,752	
	Dif. 1-2	-0,15	-0,443	0,143	
20	1	40,52	40,293	40,737	0,5659

	2	40,61	40,383	40,827	
	Dif. 1-2	-0,09	-0,405	0,225	

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el PRRSV 94881 a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto

Tabla 7.22 Temperatura rectal media por LS (°C) Día 21 – 24

Día	Grupo <sup>1</sup>	Media por LS	Intervalo de confianza de 95%		Valor de p
21	1	40,22	40,037	40,393	0,4489
	2	40,12	39,942	40,298	
	Dif. 1-2	0,10	-0,156	0,346	
22	1	40,34	40,152	40,528	0,6231
	2	40,41	40,217	40,593	
	Dif. 1-2	-0,07	-0,331	0,201	
23	1	40,36	40,143	40,567	0,1062
	2	40,60	40,388	40,812	
	Dif. 1-2	-0,25	-0,545	0,055	
24	1	40,39	40,168	40,602	0,4526
	2	40,50	40,283	40,717	
	Dif. 1-2	-0,12	-0,422	0,192	

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el PRRSV 94881 a MID, expuesto; Grupo 2= tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto

5

La temperatura rectal media y media por LS para los lechones vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 fue 39,77°C en el día antes de la exposición y osciló de 39,69°C (D15) a 40,68°C (D16) después de la exposición. La temperatura rectal media y media por LS para los controles de exposición fue 39,39°C en el día antes de la exposición y osciló de 39,77°C (D16) a 40,61°C (D20) después de la exposición. Las temperaturas rectales medias por mínimos cuadrados fueron significativamente inferiores para controles de exposición en comparación con lechones vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 antes de la administración de exposición (D13 y D14) y en D16 después de la exposición ( $p < 0,0001$ ). No hubo otras diferencias significativas en temperaturas rectales entre cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 y controles de exposición en este estudio ( $p \geq 0,0528$ ). Las temperaturas rectales medias y medias por LS para los controles negativos siguieron siendo  $\leq 39,68^\circ\text{C}$  durante el estudio.

10

15

#### Evaluación clínica después de la vacunación

Un resumen del porcentaje de lechones con al menos una evaluación positiva de D1 a D12 se muestra a continuación en la Tabla 7.23.

Tabla 7.23 Porcentaje de lechones con al menos una evaluación clínica positiva de D1-D12

Grupo <sup>1</sup>	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Total	Valor de p
1	0	0	0,0	16,8	20	1,0000
2	1	5	0,1	24,9	20	
3	0	0	0,0	30,8	10	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el PRRSV 94881 a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NI = no incluido en el análisis estadístico.

20

Ningún lechón en ningún grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 o controles negativos tuvo hallazgos de evaluación clínica durante el periodo de vacunación D-1 a D12. El lechón 110 en el grupo de control de exposición se observó con una llaga detrás de la pata delantera derecha empezando en D9. No hubo diferencia significativa entre lechones vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 y controles de exposición para este parámetro ( $p=1,0000$ ).

25

#### Serología del PRRS

Un resumen de la frecuencia de lechones con títulos de anticuerpos del PRRS positivos se muestra a continuación en la Tabla 7.24.

30

Tabla 7.24 Frecuencia de lechones con título de anticuerpos del PRRS positivos por día

Día	Grupo <sup>1</sup>	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Total	Valor de p
7	1	0	0	0,0	16,8	20	NA
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	30,8	10	NI
14	1	17	85	62,1	96,8	20	<0,0001
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	30,8	10	NI
17	1	19	95	75,1	99,9	20	<0,0001
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	30,8	10	NI
21	1	20	100	83,2	100,0	20	0,0012
	2	11	55	31,5	76,9	20	
	3	0	0	0,0	30,8	10	NI
24	1	20	100	83,2	100,0	20	1,0000
	2	19	95	75,1	99,9	20	
	3	0	0	0,0	30,8	10	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el PRRSV 94881 a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NA = no aplicable, no expuesto. NI = no incluido en el análisis estadístico.

5 Todos los lechones en todos los grupos de tratamiento fueron negativos para anticuerpos del PRRS en D0 y D7. En D14, 85% de los cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 tuvieron títulos para anticuerpos del PRRS positivos. Este número aumentó al 95% en D17 y fue 100% en tanto D21 como D24. Ningún cerdo en el grupo de control de exposición desarrolló títulos de anticuerpos del PRRS positivos hasta D21 (7 días después de la administración de exposición) cuando 55% de los cerdos tenía títulos positivos. Este valor aumentó al 95% en D24. En D14, D17 y D21, los cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 tuvieron una proporción significativamente mayor de cerdos con títulos de anticuerpos del PRRS positivos en comparación con el grupo de control de exposición ( $p \leq 0,0012$ ). Ningún cerdo en el grupo de control negativo desarrolló títulos de anticuerpos del PRRS durante este estudio.

#### Discusión/conclusión

15 Para lograr el objetivo del estudio, tres grupos se incluyeron en el diseño del estudio en D0: un grupo de vacunas que recibió  $1 \times 10^{3,82}$  TCID<sub>50</sub> de MLV contra el PRRSV 94881 (Grupo 1); un grupo de control de exposición que recibió producto de control (Grupo 2) y un grupo de control negativo (Grupo 3) que también recibió producto de control.

20 Veinte (20) lechones sanos susceptibles y seronegativos para PRRS se inocularon IM con 1 ml de MLV contra el PRRSV 94881 a aproximadamente 14 días de edad. Treinta (20 lechones del grupo de control de exposición y 10 lechones del grupo de control negativo) lechones susceptibles y seronegativos para PRRS se inocularon IM con 1 ml de producto de control a aproximadamente 14 días de edad.

25 Para determinar si se logró una aparición de inmunidad de 2 semanas para MLV contra el 94881 del PRRS, el grupo de vacunas y el grupo de control de exposición se expusieron 14 días después de la vacunación a una cepa aislada europea heteróloga del PRRSv (cepa aislada 205817) y se evaluaron después de la exposición para la reducción relevante en lesiones pulmonares.

#### Validación del estudio (Grupo de control negativo 3)

30 Para garantizar que los lechones fuente estuvieran libres de PRRSv y que no se produjera exposición externa al PRRSv o contaminación cruzada entre los grupos de tratamiento y de control durante el estudio, un grupo de control negativo (Grupo 3) se incluyó en el diseño del estudio. Los lechones en el grupo de control negativo fueron negativos para PRRSv (viremia; qPCR), además de para anticuerpos del PRRS durante el estudio, validándose así este ensayo.

#### Validación del modelo de exposición (Grupo de control de exposición 2)

35 Es necesario un modelo de exposición que induzca suficiente enfermedad clínica de PRRS para evaluar adecuadamente la aparición de inmunidad a la vacuna contra el PRRS en un entorno de laboratorio. Tras la inoculación con la cepa aislada del PRRS europea 205817 mediante el método descrito anteriormente, el grupo de

control de exposición presentó una temperatura rectal media de  $\geq 40,50^{\circ}\text{C}$  en D19, D20 D23 y D24 ( $\leq 39,68^{\circ}\text{C}$  en los mismos días, grupo de control negativo), un ADWG medio de 0,15 kg/día en comparación con un ADWG medio de 0,34 kg/día para el grupo de control negativo de D14 a D24, comportamiento anormal, tos y una mediana de la puntuación de lesión pulmonar de 55,2% (0,00%; grupo de control negativo). Estos resultados ponen de relieve que la enfermedad clínica específica para PRRS grave se indujo en el grupo de control de exposición aún cuando el título de virus de exposición era ligeramente menor que la dosis elegida como diana, validándose así este modelo de exposición como una herramienta de laboratorio clínico adecuada para evaluar la eficacia de la vacuna contra el PRRS y más específicamente la OOI de MLV contra el 94881 del PRRS.

Determinación de la aparición en dos semanas de inmunidad de MLV contra el PRRSV 94881 (Grupo 1)

- 10 La determinación de una aparición de inmunidad (OOI) para MLV contra el PRRSV 94881 2 semanas después de la vacunación se basó en el grupo de vacunas que presentó una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) en lesiones pulmonares después de la exposición en comparación con el grupo de control de exposición.

15 Las lesiones pulmonares se seleccionaron como el parámetro primario para la determinación de la OOI de 2 semanas debido a que este parámetro proporciona las pruebas de eficacia más clínicamente relevantes y convincentes cuando se evalúa una nueva vacuna dentro del modelo de exposición respiratoria del PRRS en cerdos. El desarrollo de lesiones pulmonares es uno de los distintivos de la enfermedad de PRRS respiratoria en cerdos. Las lesiones pulmonares frecuentemente van acompañadas de posteriores manifestaciones de características de la enfermedad por el PRRSV secundarias tales como signos clínicos, fiebre, disminución del ADWG, etc.

- 20 El grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 presentó una reducción significativa en la patología pulmonar macroscópica después de la exposición, como se demuestra por la mediana de la puntuación de lesión pulmonar total de 27,6% en comparación con el grupo de control de exposición, que presentó una mediana de la puntuación de lesión pulmonar total de 55,2% ( $p=0,0002$ ). Por tanto, se estableció una OOI de 2 semanas para MLV contra el PRRSV 94881 a la dosificación de  $1 \times 10^{3,82}$  TCID<sub>50</sub> basándose en el parámetro primario de una reducción significativa para lesiones pulmonares después de la exposición. Este resultado se logró con una dosis de vacuna ligeramente menor que la dosis de inmunización mínima de  $1 \times 10^{4,5}$  TCID<sub>50</sub>/dosis.

La viremia después de la exposición se seleccionó como el parámetro secundario más importante debido a que representa el nivel de replicación y persistencia vírica que se produce dentro del animal huésped tras la exposición. Una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) en la viremia se correspondería con una vacuna contra el PRRS que induce inmunidad adecuada para limitar la patogénesis del PRRS dentro del huésped. 3 días después de la exposición (D17), el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 se asoció a una reducción significativa en la mediana de viremia (qPCR) en comparación con el grupo de control de exposición (6,72 GE/ml frente a 8,18 GE/ml;  $p \leq 0,0001$ ). Para evaluar adicionalmente la viremia después de la exposición entre grupos se calculó la cantidad de la carga vírica durante una duración específica de tiempo después de la exposición, como se representa como "área bajo la curva" o ABC. El grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 tuvo una mediana del valor de ABC de D17 a D24 de 49,52 GE/ml/día; mientras que el grupo de control de exposición tuvo una mediana del valor de ABC de 54,35 GE/ml/día. La mediana del valor de ABC fue significativamente menor para el grupo de vacunas en comparación con el grupo de control de exposición de D17 a D24 ( $p=0,0039$ ). Si la viremia se examinó 3 días después de la exposición o durante el transcurso del periodo después de la exposición, la MLV contra el PRRSV 94881 administrada 2 semanas antes de exposición a una cepa europea heteróloga virulenta del PRRS redujo significativamente ( $p \leq 0,05$ ) la viremia después de la inoculación de la exposición. En asociación con una reducción de viremia del PRRS después de la exposición, una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) en la carga vírica en el tejido de pulmón también sería de gran importancia desde el punto de vista de la inmunidad de la vacuna contra el PRRS. Una reducción de la carga vírica en el tejido de pulmón puede asociarse a una estabilidad vírica reducida, replicación y persistencia dentro del huésped y puede conducir secundariamente a una reducción de la propagación del PRRSV a otros cerdos. En este estudio, los tejidos de pulmón del grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 tuvieron una mediana del resultado de qPCR de pulmón de 7,46 log<sub>10</sub> GE/ml 10 días después de la exposición (D24), mientras que el grupo de control de exposición tuvo una mediana del resultado de qPCR de pulmón de 7,88 log<sub>10</sub> GE/ml. La diferencia entre el grupo de vacunas y el grupo de control de exposición fue significativa ( $p=0,0101$ ), soportándose así adicionalmente una OOI de 2 semanas.

Una reducción marcada en la gravedad y frecuencia de signos clínicos después de la exposición en lechones también soportaría la eficacia de la vacuna contra el PRRS y el establecimiento de una OOI de 2 semanas para MLV contra el 94881 del PRRS. No se observó respiración anormal de suficiente gravedad y frecuencia en ningún grupo después de la exposición y no se detectaron diferencias ( $p \geq 0,1394$ ). En cambio, la gravedad y la frecuencia de la tos fueron aproximadamente iguales entre grupos y no se detectaron diferencias ( $p \geq 0,0835$ ). Se detectaron diferencias entre los grupos para gravedad y frecuencia del comportamiento anormal (letargo) después de la exposición. Cero de 20 (0%) y 9 de 20 (45%) lechones vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 y del control de exposición, respectivamente, presentaron comportamiento anormal durante al menos un día después de la exposición ( $p=0,0012$ ). Asimismo, el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 presentó menores puntuaciones clínicas anormales máximas y clínicas anormales medias después de la exposición en comparación con el grupo de control de exposición ( $p=0,0012$ ). Las puntuaciones clínicas totales (suma de puntuaciones de respiración, comportamiento



y tos) fueron significativamente diferentes entre grupos cuando se analizaron las puntuaciones máximas y las puntuaciones medias de D15 a D24. Debido a la influencia de las puntuaciones de comportamientos anormales sobre las puntuaciones totales, el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 tuvo una puntuación total máxima significativamente menor y puntuación total media menor en comparación con el grupo de control de exposición ( $p \leq 0,0103$ ). Las diferencias entre los grupos para gravedad y frecuencia de comportamiento anormal soportan adicionalmente una OOI de 2 semanas después de la vacunación.

Antes de la exposición, el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 tuvo ligeramente mayores temperaturas rectales medias en comparación con el grupo de control de exposición en D13 (39,77°C frente a 39,39°C, respectivamente;  $p < 0,0001$ ) y en D14 (39,76°C frente a 39,37°C, respectivamente;  $p < 0,0001$ ). Aunque se detectaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los grupos antes de la exposición, estas diferencias no fueron biológicamente relevantes. Después de la exposición, el único día en el que se detectó una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los grupos para la temperatura rectal media fue en D16 (2 días después de la exposición). En D16, los grupos vacunados y de control de exposición tuvieron temperaturas rectales medias de 40,68°C y 39,77°C, respectivamente, y la diferencia entre grupos fue significativa ( $p < 0,0001$ ). La media temperatura rectal 4-5 días después de la exposición se elevó por encima de 40°C y siguió estando por encima de 40°C hasta el fin del estudio para ambos grupos.

La presencia de comportamiento anormal significativo, viremia, patología pulmonar y carga vírica en tejidos de pulmón debido a PRRS en el grupo de control de exposición produjo diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los grupos para ADWG después de la exposición. En este estudio, los grupos vacunados y de control de exposición tuvieron ADWG medios de D14 a D24 de 0,3 kg/día y 0,1 kg/día, respectivamente, y la diferencia entre grupos fue significativa ( $p = 0,0003$ ). Una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los grupos para ADWG después de la exposición soporta adicionalmente el establecimiento de una OOI de 2 semanas después de la vacunación.

Parámetros examinados después de la vacunación en este estudio

No se observaron evaluaciones clínicas anormales relacionadas con la vacunación con MLV contra el 94881 PRRS o producto de control en lechones tras la inoculación en D0. Un lechón de control de exposición presentó una llaga detrás de la pata delantera derecha empezando en D9 que pareció que no se asociaba a la administración del producto de control.

Todos los lechones fueron negativos en serología por ELISA para PRRS en D0, confirmándose así que todos los lechones cumplieron los criterios de inclusión de ser negativos para PRRS tras la entrada en el estudio. La mayoría de los lechones que recibieron MLV contra el PRRSV 94881 se seroconvirtieron para PRRS en D14 y todos los lechones vacunados contra el PRRS fueron seropositivos 7 días después de la exposición (D21). En cambio, el control de exposición siguió siendo seronegativo hasta 7 días después de la exposición, cuando este grupo empezó a demostrar seroconversión del PRRS. El grupo de control negativo siguió siendo seronegativo para PRRS durante todo el estudio.

7 y 14 días después de la vacunación, el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 presentó resultados de qPCR medios de 3,17 y 3,30,  $\log_{10}$  GE/ml, respectivamente. Estos resultados ponen de relieve que en el plazo de 2 semanas desde la vacunación, una dosificación de  $1 \times 10^{3,82}$  TCID<sub>50</sub> de MLV contra el PRRSV 94881 indujo suficiente replicación de la MLV que es frecuentemente requerida para construir la inmunidad protectora ya a las 2 semanas después de la vacunación. En cambio, el grupo de control de exposición y el grupo de control negativo fueron negativos para viremia del PRRSV de D0 a D14.

Conclusión

La reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) de las lesiones pulmonares, signos clínicos, replicación del virus en la sangre y los pulmones después de la exposición, además de la mejora de los rendimientos de crecimiento, soportan el establecimiento de una OOI de 2 semanas tras la vacunación con una dosis única de MLV contra el PRRSV 94881 a  $1 \times 10^{3,82}$  TCID<sub>50</sub>/ml en lechones de aproximadamente 14 días de edad.

Ejemplo 8 Evaluación de la duración de la inmunidad de la MLV contra el PRRSV 94881 en cerdos de dos semanas de edad susceptibles tras la exposición a una cepa aislada europea heteróloga de PRRS 26 semanas después de la vacunación

El objetivo de este estudio de exposición a vacunación era evaluar la duración de la inmunidad (DOI) 26 semanas después de la administración del candidato a vacuna contra el síndrome reproductor y respiratorio porcino, cepa aislada derivada de europea 94881, virus vivo modificado (MLV contra el 94881 del PRRS), en cerdos seronegativos para PRRS de  $14 \pm 3$  días de edad. El criterio de eficacia primaria para satisfacer una DOI de 26 semanas después de la vacunación fue una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) en las puntuaciones de lesión pulmonar (macroscópica o histológica) después de la exposición en el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 (Grupo 1) en comparación con el grupo de control de exposición (Grupo 2).

En el Día 0 (D0), 22 cerdos asignados al grupo vacunado recibieron 1,0 ml IM de MLV contra el PRRSV 94881 ( $1 \times 10^{4,27}$  TCID<sub>50</sub>) IM (Grupo 1), 22 cerdos asignados al grupo de control de exposición recibieron 1,0 ml IM de producto

de control (placebo del mismo producto sin MLV contra el 94881 del PRRS, Grupo 2) y 12 cerdos asignados al grupo de control negativo también recibieron 1,0 ml IM de producto de control (Grupo 3). Los Grupos 1 y 2 se expusieron en D179 (día después de la exposición {DPC} 0) a una cepa virulenta del PRRSV europeo y los cerdos se monitorizaron 10 días después de la exposición para signos clínicos, aumento de peso diario promedio y viremia. A los cerdos se les hizo la autopsia en D189 (DPC 10) y se determinaron las lesiones pulmonares macroscópicas e histológicas, y la carga vírica del pulmón.

Las medianas de las puntuaciones de lesión pulmonar macroscópica en D189 (DPC 10) fueron 0,1% y 13,8% para cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 y controles de exposición, respectivamente ( $p < 0,0001$ ). Las medianas de las puntuaciones de lesión pulmonar histológica en DPC 10 fueron 6,0 y 19,5 para cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 y controles de exposición, respectivamente ( $p < 0,0001$ ). Los cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 tuvieron significativamente menos carga vírica en suero 3, 7 y 10 días después de la exposición en comparación con los controles de exposición ( $p \leq 0,0001$ ). El análisis del área bajo la curva (ABC) después de la exposición para viremia de DPC 0 a DPC 10 y DPC 3 a DPC 10 también fue significativamente inferior para cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 (15,54 y 8,88  $\log_{10}$  GE/ml por día, respectivamente) en comparación con el grupo de control de exposición (44,77 y 36,43  $\log_{10}$  GE/ml por día, respectivamente,  $p < 0,0001$ ). La mediana de valores de qPCR para tejidos de pulmón recogidos en la autopsia fue 3,69 y 6,25  $\log_{10}$  GE/ml para cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 y controles de exposición, respectivamente ( $p < 0,0001$ ). No hubo diferencias significativas en signos clínicos después de la exposición ( $p \geq 0,4878$ ).

Una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) de lesiones pulmonares macroscópicas e histológicas, la carga vírica en tejidos de pulmón recogidos en la autopsia y la viremia después de la exposición para cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 en comparación con los controles de exposición soportaron la eficacia de la vacuna contra el PRRSV virulento cuando se expuso 26 semanas después de la vacunación. Los resultados de este estudio establecen una duración de la inmunidad de 26 semanas después de la vacunación en cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 a las 2 semanas de edad. Estos resultados se alcanzaron con una dosis de vacuna de  $1 \times 10^{4,27}$  TCID<sub>50</sub>/ml, que fue ligeramente inferior a la dosis de inmunización mínima ( $1 \times 10^{4,5}$  TCID<sub>50</sub>/ml) para este producto veterinario en investigación.

#### Objetivo(s)/Fin del estudio

El objetivo de este estudio de exposición a vacunación era evaluar la duración de la inmunidad (DOI) de la cepa aislada derivada de europea contra el síndrome reproductor y respiratorio porcino 94881, virus vivo modificado, código 19S1.U (MLV contra el 94881 del PRRS), administrada a cerdos seronegativos para PRRS,  $14 \pm 3$  días de edad, contra una exposición virulenta a una cepa aislada europea heteróloga de PRRS 26 semanas después de la vacunación. El criterio de eficacia primaria para satisfacer una DOI de 26 semanas después de la vacunación fue una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) en las puntuaciones de lesión pulmonar (macroscópica o histológica) después de la exposición en el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 (Grupo 1) en comparación con el grupo de control de exposición (Grupo 2).

Los parámetros de eficacia secundaria incluyeron viremia después de la vacunación y después de la exposición, evaluaciones clínicas después de la vacunación, serología del PRRS, observaciones clínicas después de la exposición, aumento de peso diario promedio (ADWG), temperaturas rectales y cuantificación del PRRSV en pulmón. La viremia después de la exposición se consideró que era el parámetro secundario más importante ya que es un parámetro objetivo y cuantificable. La temperatura rectal y las observaciones clínicas se consideraron entonces de apoyo en el método de definición de DOI. Por último lugar, el rendimiento del crecimiento, la serología y la detección del virus en pulmones se usaron como parámetros de apoyo hacia los parámetros primarios en satisfacer el objetivo del estudio.

#### Programa de acontecimientos

Tabla 8.1 Programa de acontecimientos

Día de estudio	Fechas	Acontecimiento clave del estudio
-7	04-Feb-10	Recogida de muestras de sangre para cribar para estado por ELISA del PRRS negativo
-2	09-Feb-10	Realización del examen de salud
-1 a 21	10-Feb-10-04-Mar-10	Realización diaria de evaluaciones clínicas
0	11-Feb-10	Registro de pesos corporales; recogida de muestras de sangre para serología y viremia; vacunación del Grupo 1 con IVP, vacunación de los Grupos 2 y 3 con CP
7	18-Feb-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
13	24-Feb-10	Vacunación de cerdos con 1,0 ml de la vacuna CircoFlex® Inserción SC de microchip en el cuello izquierdo de cada cerdo en estudio

Día de estudio	Fechas	Acontecimiento clave del estudio
14	25-Feb-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
21	04-Mar-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
22 a 177	05-Mar-10-07 -Ago-10	Evaluaciones clínicas al menos 3 veces/semana
28	11-Mar-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
56	08 -Abr-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
84	06-May-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
112	03-Jun-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
140	01-Jul-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
168	29-Jul-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
D178 (DPC-1) a D189 (DPC 10)	08-Ago-10-19-Ago-10	Observaciones clínicas y temperaturas rectales diarias
D179 (DPC 0)	09-Ago-10	Recogida de pesos corporales; recogida de muestras de sangre para serología y viremia; exposición de Grupos 1 y 2 a la cepa aislada del PRRS europea heteróloga
D182 (DPC 3)	12-Ago-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
D186 (DPC 7)	16-Ago-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
D188 (DPC 9)	18-Ago-10	Recogida de pesos corporales
D189 (DPC 10)	19-Ago-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia Sacrificio y autopsia de cerdos Puntuación de lesiones pulmonares para patología Recogida de tejidos de pulmón para el aislamiento del virus e histopatología

Diseño del estudio

Fue un estudio de eficacia de la exposición a vacunación ciego realizado en 56 cerdos seronegativos para PRRS destetados,  $14 \pm 3$  días de edad en el día 0 (D0). Un resumen del estudio se proporciona en la Tabla 8.2.

5 Tabla 8.2 Diseño del estudio

Grupo	Número de cerdos en D0	Tratamiento en D0 ( $14 \pm 3$ días de edad)	Exposición en D179 (DPC 0) a 1,0 ml/orificio nasal y 1,0 ml IM del PRRSv 205817 (media $1 \times 10^{6,27}$ TCID <sub>50</sub> /3 ml)	Sacrificio y autopsia en D189 (DPC 10)
1	22	1,0 ml IM de IVP (MLV contra el 94881 del PRRS)	Sí	Sí
2	22	1,0 ml IM de producto de control (CP; placebo del mismo producto sin MLV contra el 94881 del PRRS)	Sí	Sí
3	12	1,0 ml IM de CP	No	Sí

Criterios de cegado

10 El investigador del estudio y los representantes fueron cegados a los grupos de tratamiento asignados durante la fase en vida del estudio. Para mantener este cegado, el monitor del BIVI realizó la aleatorización y un individuo que no participó en las evaluaciones de los cerdos (es decir, evaluaciones clínicas, observaciones clínicas o autopsias) administró los tratamientos de IVP y CP asignados en D0. El personal del laboratorio de BIVI se cegó al tratamiento que recibía cada cerdo mientras que realizaban sus tareas respectivas.

Materiales

Producto veterinario en investigación (IVP) y producto de control

Tabla 8.3 IVP

Nombre del producto genérico:	Síndrome reproductor y respiratorio porcino, virus vivo modificado
Cepa:	94881
Producción y formulación:	La producción de BIVI-St. Joseph produjo MLV contra el 94881 del PRRS, lote 390-

ES 2 692 809 T3

	005 (Sección 15.4), según el Resumen de producción, código 19S1.U_ y el Dossier EU parte 2b. En D0, BIVI-Ames reconstituyó/diluyó la vacuna MLV contra el 94881 del PRRS, lote 390-005, con solución salina tamponada con fosfato (PBS; lote 809-002, Sección 15.5) para formular el IVP, lote nº N257-137, a una dosificación diana de aproximadamente $1 \times 10^{4.5}$ TCID <sub>50</sub> /ml.
Fabricante:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506, EE.UU.
Lote nº:	390-005, reconstituido al lote N257-137
Fecha de caducidad:	Se asignó una fecha de caducidad del 11-Feb-10 al IVP sólo para fines de estudio.
Condiciones de almacenamiento:	Vacuna liofilizada: 2-8°C IVP rehidratado/diluido: sobre hielo
Pruebas:	MLV contra el 94881 del PRRS, lote 390-005, y PBS, lote 809-002, se probaron por BIVI-QC según el borrador del Resumen de producción (Sección 15.1) y como se ha especificado adicionalmente en el Dossier de EU parte 2.F. El personal de laboratorio de BIVI-Ames probó antes de y después de la vacunación alícuotas del IVP para el título de virus según el Método de títulos de PRRSv (Sección 15.1).
Resultados de las pruebas:	Lote 390-005: Los resultados fueron satisfactorios (Sección 15.4). Lote 809-002: Los resultados fueron satisfactorios (Sección 15.5). Lote de IVP N257-137: Título medio de $1 \times 10^{4.27}$ TCID <sub>50</sub> /ml (Sección 15.7).
Retención de IVP:	El IVP sólo se reconstituyó / diluyó para uso inmediato en este estudio y no se retuvo más allá del acontecimiento de vacunación.

Tabla 8.4 CP

Nombre del producto genérico:	Placebo
Formulación:	La producción de BIVI produjo producto de placebo liofilizado que contenía material inerte comprendido en la serie sin MLV contra el PRRSV 94881 (lote N240-191-062409, Sección 15.6). En D0, BIVI-Ames reconstituyó el lote N240-191-062409 con solución salina tamponada con fosfato (PBS; lote 809-002, Sección 15.5) para formular el CP, lote nº N257-134
Fabricante:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506, EE.UU.
Número de lote:	Lote N240-191-062409, reconstituido al lote N257-134
Fecha de caducidad:	Se asignó una fecha de caducidad del 11-Feb-10 al CP sólo para fines de estudio.
Condiciones de almacenamiento:	Vacuna liofilizada: 2-8°C CP rehidratado: 2-8°C o sobre hielo
Pruebas:	El lote N240-191-062409 y el lote N257-134 se probaron por BIVI-QC para la esterilidad según EP
Resultados de las pruebas:	Lote N240-191-062409: Los resultados fueron satisfactorios para esterilidad (Sección 15.6). Lote 809-002: Los resultados fueron satisfactorios para esterilidad. Se determinó que CP era estéril (Sección 15.7).
Retención de CP:	CP sólo se reconstituyó para su uso en este estudio y no se retuvo más allá del acontecimiento de vacunación.

Material de exposición

5 Tabla 8.5 Material de exposición

Nombre/número de cepa aislada	Cepa aislada del PRRS 205817
Localización y fecha de aislamiento, incluidos	La cepa aislada del virus PRRS europeo 205817 se derivó de cepa aislada 190136 originariamente obtenida de tejido de pulmón de un cerdo recién nacido de una granja con signos reproductivos típicos de PRRS (abortos en cerdas y debilidad en cerdos recién

síntomas clínicos	nacidos) durante un brote en baja Sajonia, Alemania, en abril de 2004. Los veterinarios enviaron las muestras de pulmón a BioScreen (la muestra llegó el 21 de abril de 2004) para pruebas de diagnóstico. La cepa aislada 190136 se propagó directamente en células MA 104 y se preparó una disolución madre de exposición de cultivo puro. Un cultivo puro de la cepa aislada 190136 se usó para inocular cerdos para la evaluación de su capacidad para reproducir la enfermedad respiratoria específica para PRRS en un ensayo de laboratorio controlado. Los animales expuestos presentaron dificultades respiratorias y revelaron pruebas de neumonía intersticial tras el examen histopatológico. Al virus PRRS que se volvió a aislar satisfactoriamente de lesiones pulmonares se le dio la designación de cepa aislada 205817. La cepa aislada 205817 se propagó directamente en células MA104 y para su uso en futuros ensayos clínicos de BIVI se preparó una disolución madre de exposición de cultivo puro.
Formulación:	El virus de exposición se propagó en células AK-MA104 y se formuló a un título elegido como diana de aproximadamente $1 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub> /3 ml de dosis en D179. Se preparó un volumen adecuado de material de exposición. Se tomaron dos alícuotas x 5 ml del material de exposición para fines de ensayo antes de que el material de exposición se transportara a VRI.
Número de lote:	N270-179
Fabricante:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. - EE.UU.
Condiciones de almacenamiento	Se almacenó material de exposición a granel a $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ . Una vez preparado, el material de exposición diluido se mantuvo sobre hielo hasta que se administró.
Pruebas:	El personal del laboratorio de BIVI-Ames probó antes y después de la exposición alícuotas para el título de virus según el Método de títulos de PRRSv
Resultados de las pruebas:	El material de exposición tuvo un título medio de $1 \times 10^{6,27}$ TCID <sub>50</sub> /3 ml de dosis
Vía de administración	1,0 ml/orificio nasal y 1,0 ml IM en el cuello derecho
Retención del material de exposición:	El material de exposición sólo se descongeló / diluyó para este estudio y no se retuvo más allá del acontecimiento de exposición.

#### Tratamientos

##### Justificación de la dosificación

- 5 El IVP se administró como una dosis de 1,0 ml a cerdos asignados para evaluar la DOI de MLV contra el PRRSV 94881 26 semanas después de la vacunación. El CP se administró como una dosis de 1,0 ml a los Grupos 2 y 3 como una vacuna de placebo.

##### Pauta de dosificación

- 10 IVP o CP se administró a un cerdo asignado en la región derecha del cuello IM en D0 usando una jeringuilla Luer-lock estéril de 3,0 ml y una aguja estéril 20g x 1 pulgada (2,54 cm) por una persona que no recogía datos del estudio. La pauta de dosificación se muestra a continuación en la Tabla 8.6.

Tabla 8.6 Pauta de dosificación

Grupo	Número	Tratamiento	Dosis/vía	Día de estudio
1	22	IVP	1,0 ml IM	D0
2	22	CP	1,0 ml IM	D0
3	12	CP	1,0 ml IM	D0

##### Tratamientos concomitantes

- 15 Debido al hecho de que varios cerdos se encontraron muertos pronto en el estudio posteriormente a las infecciones bacterianas, el investigador y el monitor del estudio estuvieron de acuerdo con la administración de los siguientes tratamientos concomitantes adicionales a todos los animales del estudio (Sección 15.10):

Día 20: Mu-Se<sup>®</sup> (vitamina E/Selenio, Intervet/Schering Plough Animal Health, EE.UU.), 0,1 ml IM en el jamón derecho

Día 21: EXCEDE<sup>®</sup> (ceftiofur, Pfizer Animal Health, EE.UU.), 0,5 ml en el jamón izquierdo

Día 35: EXCEDE<sup>®</sup> (ceftiofur, Pfizer Animal Health, EE.UU.), 1,0 ml en el jamón derecho.

- 20 Día 42: EXCEDE<sup>®</sup> (ceftiofur, Pfizer Animal Health, EE.UU.), 1,0 ml en el jamón izquierdo.

Día 47: BAYTRIL 100® (enrofloxacin, Bayer Animal Health, EE.UU.), 1,5 ml SC en el cuello izquierdo

La vitamina E/selenio se administró para la prevención de enfermedad cardiaca de Mulberry y los tratamientos con antibiótico se administraron para el tratamiento/prevención de infecciones bacterianas.

Información sobre los animales

5 Detalles de los animales del estudio

Tabla 8.7 Información sobre los animales

Fuente:	Prairie View Farms, N5627 Hwy DD, Burlington, WI 53105		
Número de cerdos:	56		
Día de llegada:	Los cerdos llegaron a las instalaciones de Veterinary Resources, Inc. (VRI) Cambridge el D-2 (09-Feb-10).		
Identificación:	Cada animal se identificó con etiquetas para las orejas dobles individuales en la llegada en D-2. Cada animal también tuvo un microchip electrónico insertado SC en el cuello izquierdo en D13.		
Especie:	Porcina		
Raza:	Cruzada comercial		
Sexo:	Hembras o machos castrados.		
Intervalo de edad:	13 a 17 días de edad en D0		
Intervalo de peso:	2,4 a 5,4 kg en D0		
Propietario de los animales de prueba:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.		
Estado fisiológico:	En D-2, los cerdos seleccionados para la asignación al estudio fueron observados por el investigador del estudio y determinó que estaban en buen estado de salud y nutricional. Las observaciones se registraron en el cuaderno de recogida de datos del examen de salud del animal.		
Asignaciones de cerdos a grupos	Grupo 1 (n=22): 117, 118, 119, 121, 127, 128, 129, 131, 133, 136, 139, 141, 142, 144, 146, 147, 153, 154, 162, 163, 164 y 179	Grupo 2 (n=22): 123, 124, 125, 130, 134, 137, 138, 148, 149, 150, 156, 157, 158, 160, 161, 165, 167, 169, 170, 172, 177 y 178	Grupo 3 (n=12): 116, 120, 126, 132, 135, 145, 151, 152, 155, 159, 166 y 171

Criterios de inclusión/exclusión

10 Todos los cerdos enrolados en este estudio fueron negativos por ELISA para PRRS (relación S/P de ELISA de <0,4) y fueron sanos en el momento de la vacunación (D0) como se ha determinado por observación.

Criterios de descarte después de la inclusión

No se descartó ningún cerdo del estudio. Se encontraron muertos tres cerdos antes de la administración de exposición. Más resultados sobre estos tres cerdos se presentan en la Sección 12.8.

Manipulación y alojamiento de los animales

15 Los cerdos se alojaron en Veterinary Resources, Inc. (VRI) en Cambridge, IA, durante la duración del estudio. Los cerdos se alojaron en múltiples corrales (11 ó 12 cerdos/corral) dentro de cada habitación, con animales vacunados (Grupo 1) y de control (Grupos 2 y 3) alojados en habitaciones uniformes pero separadas para garantizar la bioseguridad. Los cerdos con MLV contra el PRRSV 94881 se alojaron en la Habitación CB8 hasta D78, luego en CC1 hasta D105 y luego CC3 para el resto del estudio. Los cerdos del control de exposición se alojaron en la Habitación CC2 durante todo el estudio. Los cerdos del control negativo se alojaron en la Habitación CB6 hasta D73 y luego en CB7 para el resto del estudio. Los corrales para los animales eran elevados con revestimiento del suelo de pizarra de plástico, con comederos apropiados para la edad y bebedores de boquilla y taza. Cada habitación de aislamiento se construyó idéntica a las otras y todas cumplieron el nivel de biorriesgo 2 (BL2), se filtraron con Hepa, se ventilaron mecánicamente con control de temperatura regulado por termostato.

25 El aislamiento del grupo de tratamiento fue necesario en este estudio ya que es muy conocido dentro de la comunidad científica que el PRRSv se propaga fácilmente de cerdo a cerdo por diversos mecanismos que incluyen la aerosolización. Esto incluye vacunas contra el PRRS vivas avirulentas ya que estos productos biológicos incluyen

partículas víricas atenuadas que imitan las características del PRRS natural virulento sin la capacidad para producir enfermedad. Los métodos apropiados fueron *in situ* para garantizar que se mantenía la bioseguridad y que los animales vacunados no se contaminaban accidentalmente de forma cruzada con animales de control negativo sin tratamiento previo contra el PRRSv no vacunados.

- 5 El personal de la instalación de prueba tomó medidas apropiadas para limpiar y desinfectar adecuadamente cada habitación antes de su uso para este estudio.

Cada habitación en la instalación tenía ventiladores y calefactores para ayudar en la suficiente circulación y el calentamiento del aire. El sistema de ventilación era separado aunque idéntico para cada habitación, por lo que el aire no era compartido entre habitaciones.

- 10 El pienso sólido se almacenó en bolsas, libres de bichos. El pienso y el agua estaban disponibles a voluntad. Los cerdos se alimentaron con pienso medicado para lactantes Lean Metrics (Purina Mills LLC, St. Louis, MO) desde la llegada hasta D5, cuando se cambiaron a pienso medicado sénior Lean Metrics (Purina Mills LLC, St. Louis, MO). En D64 los cerdos se cambiaron a pienso Lean Metrics Complete 85 (Purina Mills LLC, St. Louis, MO) y en D82 se cambiaron a pienso Lean Metrics Complete CE85, T40 (Purina Mills LLC, St. Louis, MO), con el que se alimentaron para el resto del estudio. Durante el estudio, los piensos proporcionados fueron apropiados para el tamaño, edad y condición de los cerdos según prácticas de cría de animales aceptables para la región.
- 15

- Los cerdos tenían buen estado de salud y nutricional antes de iniciarse el estudio como se ha determinado por el investigador del estudio. Durante el estudio se observaron animales seleccionados con otras afecciones que incluían delgadez, tos, hinchazones, recubrimiento de pelo despeinado, depresión, abscesos y escasa condición corporal. El investigador del estudio consideró que todo esto eran condiciones que eran típicas de cerdos en crecimiento/maduración alojados en grupo. Estas condiciones se consideraron transitorias o sin importancia y no se trataron.
- 20

#### Evaluación de la eficacia

- 25 Para evaluar la DOI de MLV contra el PRRSV 94881 26 semanas después de la vacunación, los grupos de MLV contra el PRRSV 94881 y de control de exposición se expusieron en D179 (DPC 0) y las lesiones pulmonares después de la exposición se evaluaron 10 días después (DPC 10). Una DOI de 26 semanas después de la vacunación se logró cuando el grupo de MLV contra el PRRSV 94881 tuvo patología pulmonar significativamente disminuida ( $p \leq 0,05$ ) (macroscópica o histológica) después de la exposición en comparación con el grupo de control de exposición.

- 30 Los parámetros de eficacia secundaria analizados entre el grupo de vacunas y el grupo de control de exposición incluyeron viremia después de la vacunación y después de la exposición, observaciones clínicas después de la exposición, temperaturas rectales después de la exposición, evaluaciones clínicas después de la vacunación, aumento de peso diario promedio (ADWG) y serología del PRRS. La viremia después de la exposición se consideró que era el parámetro secundario más importante ya que es un parámetro objetivo y cuantificable. La temperatura rectal y las observaciones clínicas se consideraron entonces de apoyo en el método de definición de DOI. Por último lugar, el rendimiento del crecimiento, la serología y la detección del virus en los pulmones se usaron como parámetros de apoyo hacia los parámetros primarios en satisfacer el objetivo del estudio.
- 35

#### Criterios para una prueba válida

- 40 Se requirió que todos los cerdos fueran negativos por ELISA para PRRS (relación S/P de ELISA de  $<0,4$ ) en el cribado antes de la compra y en D0. Se requirió que todos los cerdos del control de exposición fueran negativos para anticuerpos del PRRS hasta la exposición y se requirió que el grupo de control negativo fuera negativo para anticuerpos del PRRS durante el estudio.

#### Parámetro de resultados primarios

- 45 La variable de resultados para eficacia primaria fue la patología pulmonar (lesiones macroscópicas e histológicas) en D189 (DPC 10) del estudio.

#### Puntuaciones de lesión pulmonar macroscópica

- 50 En D189, después de recogerse y registrarse los datos y las muestras, todos los cerdos restantes del estudio se sacrificaron siguiendo VRI SOP PRC1027 (Sección 15.1). A cada cerdo se le practicó la autopsia según VRI SOP PRC 1028 (Sección 15.1). La cavidad torácica de cada cerdo se expuso por un representante y se extrajeron el corazón y los pulmones. El investigador del estudio examinó cada conjunto de pulmones, describió cualquier patología macroscópica y determinó el porcentaje de patología para cada lóbulo del pulmón. Las observaciones y los datos se registraron en el cuaderno de recogida de datos del informe de la autopsia.

#### Puntuaciones de lesión pulmonar histológica

Para cada conjunto de pulmones se retuvieron dos muestras de los lóbulos apicales izquierdo y derecho, los lóbulos

cardíacos izquierdo y derecho, los lóbulos diafragmáticos izquierdo y derecho y el lóbulo intermedio. Cada muestra de pulmón tenía aproximadamente 1 pulgada (2,54 cm) x 1 pulgada (2,54 cm). Para un conjunto de muestras de pulmón, las tres muestras del lado izquierdo se combinaron en un recipiente; mientras que las tres muestras del lado derecho y la muestra del lóbulo intermedio del pulmón se combinaron en otro recipiente. Cada recipiente se llenó con una cantidad suficiente de 10% de disolución de formalina. Para el otro conjunto de muestras de pulmón, las tres muestras de pulmón del lado izquierdo se combinaron en un Whirlpak®; mientras que las tres muestras del lado derecho y la muestra del lóbulo intermedio del pulmón se combinaron en otro Whirlpak®. Todos los recipientes y Whirlpak® se etiquetaron apropiadamente con el número de animal, número de estudio, fecha de recogida, día de estudio, tipo de muestra y si las muestras fueron del lado izquierdo o derecho. Las muestras de pulmón en formalina se almacenaron a temperatura ambiente mientras que las muestras de pulmón en Whirlpak® se almacenaron sobre nieve carbónica hasta que se transportaron a BIVI-Ames. Las recogidas de muestras se registraron en el cuaderno de recogida de datos del informe de la autopsia. Las muestras de tejido de pulmón fijadas en formalina y las muestras de pulmón en Whirlpak® se transfirieron a BIVI-Ames. Un cuaderno de recogida de datos de la entrega de especímenes completo se incluyó con cada envío.

Las muestras de tejido de pulmón fijadas en formalina fueron mantenidas por BIVI-Ames a temperatura ambiente hasta que fueron enviadas por BIVI-Ames al Laboratorio de diagnóstico veterinario de la Universidad del Estado de Iowa (ISU VDL). Las muestras de pulmón fueron manipuladas y procesadas por personal de ISU VDL según métodos de ISU VDL en el plazo de una semana desde la autopsia. Para cada cerdo se generó un único portaobjetos que contenía siete secciones (cada uno de los siete lóbulos del pulmón). Cada portaobjetos de H & E se identificó con un único código identificador. El ISU VDL proporcionó un registro informático que contenía el número de estudio, códigos identificadores y tejidos de cerdo asociados.

Una vez al día, en los días en los que los portaobjetos del estudio se leyeron para histopatología, un patólogo del ISU VDL (K. Schwartz) leyó primero los portaobjetos positivos y de control negativo del PRRS EU. Después, el patólogo leyó los portaobjetos de pulmón teñidos con H & E para hipertrofia e hiperplasia neumocítica, infiltración septal con células mononucleares, residuos necróticos, acumulación intraalveolar de células inflamatorias y acumulación perivascular de células inflamatorias. Los resultados se registraron en una hoja de cálculo de Excel. El sistema de puntuación de histopatología pulmonar se muestra a continuación en la Tabla 8.8.

Tabla 8.8 Sistema de puntuación de histopatología pulmonar

<b>Hipertrofia e hiperplasia neumocítica</b>	<b>Acumulación intraalveolar de células inflamatorias</b>
0 = no presente 1 = leve 2 = moderada 3 = grave	0 = no presente 1 = leve 2 = moderada 3 = grave
<b>Infiltración septal con células mononucleares</b>	<b>Acumulación perivascular de células inflamatorias</b>
0 = no presente 1 = leve 2 = moderada 3 = grave	0 = no presente 1 = leve 2 = moderada 3 = grave
<b>Residuos necróticos</b>	<b>Definiciones del sistema de puntuación aplicado a parámetros histológicos (excepto residuos necróticos):</b>
0 = no presentes 3 = sí presentes	<b>0 = no presente:</b> lesiones no detectables presentes dentro de un área de visión <b>1 = lesiones leves:</b> pocas células positivas (1-5 células/área) presentes dentro de un área de visión <b>2 = lesiones moderadas:</b> múltiples células positivas (>5 células/área) en una única localización o pocas células (1-5 células/área) en múltiples localizaciones dentro de un área de visión <b>3 = lesiones graves:</b> múltiples células positivas (>5 células/área) en múltiples localizaciones dentro de un área de visión.

Tras completarse la lectura de todos los portaobjetos, los portaobjetos se devolvieron al representante del patrocinador y se archivarán en Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., St. Joseph, MO, hasta que se complete el informe final.



Parámetros secundarios

5 Las variables secundarias incluyeron viremia después de la vacunación y después de la exposición, observaciones clínicas después de la exposición, temperaturas rectales después de la exposición, aumento de peso diario promedio (ADWG), cuantificación del PRRSv en los pulmones, evaluaciones clínicas después de la vacunación y serología del PRRS.

qPCR del PRRS en suero

10 Se recogió sangre venosa completa antes de la compra y en los días 0, 7, 14, 21, 28, 56, 84, 112, 140, 168, 179 (DPC 0), 182 (DPC 3), 186 (DPC 7) y 189 (DPC 10). Brevemente, se recogieron aproximadamente 2-5 ml de sangre de cada cerdo en un tubo(s) separador(es) de suero (SST) de tamaño apropiado. Se registraron las recogidas de muestras en el cuaderno de recogida de datos de la recogida de muestras. Se dejó que la sangre coagulara a temperatura ambiente en los SST. Las muestras de sangre fueron llevadas a BIVI-Ames el día de recogida y se completó el cuaderno de recogida de datos de la entrega de especímenes. Las muestras de sangre se centrifugaron por BIVI-Ames y el suero se recogió, se fraccionó y se transfirió a tubos apropiados. Cada tubo se etiquetó con el número de ID del cerdo, el número de estudio, la fecha de recogida, el día de estudio y el tipo de muestra. En BIVI-Ames, un conjunto de muestras de suero se mantuvo a 2-8°C y el otro conjunto de muestras de suero se mantuvo a 15 -70 ± 10°C.

Observaciones clínicas después de la exposición

20 Los cerdos se observaron para signos clínicos de enfermedad de D178 (DPC -1) a D189 (DPC 10). Las observaciones se realizaron por el investigador del estudio o representantes y se registraron en el cuaderno de recogida de datos de las observaciones clínicas. Los cerdos se observaron cada día para respiración, comportamiento y tos basándose en el sistema de puntuación de observaciones clínicas explicado a continuación en la Tabla 8.9.

Tabla 8.9 Sistema de puntuación de observaciones clínicas

Respiración	Comportamiento	Tos
0 = respiración normal	0 = normal	0 = sin tos
1 = respiración jadeante/rápida	1 = letargo de leve a moderado	1 = tos suave o intermitente
2 = disnea	2 = gravemente letárgico o recostado	2 = tos áspera o grave, repetitiva
3 = muerto	3 = muerto	3 = muerto

25 Temperaturas rectales

Las temperaturas rectales se recogieron por el investigador del estudio o representantes de D178 (DPC -1) a D189 (DPC 10). Las temperaturas rectales se registraron en unidades de °C en el cuaderno de recogida de datos de las observaciones clínicas.

Peso corporal y aumento de peso diario promedio

30 Los pesos corporales individuales se recogieron en D0, D179 (DPC 0) y D188 (DPC 9). Cada cerdo se pesó en una báscula calibrada por el investigador del estudio o representantes. Los resultados se registraron en unidades de kg en el cuaderno de recogida de datos del peso corporal. El aumento de peso diario promedio se determinó a partir de D179 (DPC 0) a D188 (DPC 9).

qPCR del PRRS en los pulmones

35 Las muestras de tejido de pulmón en Whirlpak® se mantuvieron a -70 ± 10°C en BIVI-Ames hasta que se enviaron a la dirección incluida en la Sección 9.3.1. Un cuaderno de recogida de datos de la entrega de especímenes completo se incluyó con el envío. BioScreen probó las muestras de pulmón para ARN del PRRSv por qPCR (Sección 15.1). Los tejidos del pulmón izquierdo se homogeneizaron y se probaron. Los tejidos del pulmón derecho y las muestras de lóbulo intermedio del pulmón se homogeneizaron y se probaron. Los resultados se informaron como equivalente de genoma (log<sub>10</sub> GE/ml) para muestras del pulmón izquierdo y derecho. Para cada cerdo, el estadístico calculará un título medio geométrico de valores de GE/ml derechos e izquierdos usando el programa SAS.

40

Evaluación clínica después de la vacunación

45 Todos los cerdos se observaron para evaluaciones clínicas después de la vacunación por el investigador del estudio o representantes. Las observaciones se realizaren diariamente de D-1 a D21 y luego al menos tres veces a la semana de D22 a D177. Las observaciones se registraron en el cuaderno de recogida de datos de las evaluaciones clínicas.

Serología del PRRS

5 Las muestras de suero recogidas antes de la compra y en los días 0, 7, 14, 21, 28, 56, 84, 112, 140, 168, 179 (DPC 0), 182 (DPC 3), 186 (DPC 7) y 189 (DPC 10) y mantenidas a 2-8°C se probaron por BIVI-Ames para anticuerpos del PRRS (Sección 15.1). Los resultados se informaron como negativos (relación S/P de ELISA de < 0,4) o positivos (relación S/P de ELISA de ≥ 0,4).

Acontecimientos adversos

No se observaron acontecimientos adversos atribuidos a la MLV contra el PRRSV 94881 en este estudio.

Métodos estadísticos

Unidad experimental

10 Los grupos de tratamiento se alojaron en habitaciones separadas en este estudio para evitar la transmisión del PRRSv a grupos no vacunados. Por tanto, la habitación fue la unidad experimental. Sin embargo, para los fines de este análisis se ignoró un posible debido a confundir los efectos de “habitación” y “tratamiento”, y el cerdo se usó como unidad estadística.

Aleatorización

15 Cincuenta y seis (56) cerdos se asignaron aleatoriamente a uno de los tres grupos. La aleatorización se realizó por BIVI. En el momento del envío, el nº 140 y 143 (grupo de control de exposición), además del nº 168 (grupo de MLV contra el 94881 del PRRS) se eliminaron. El número 178 se seleccionó aleatoriamente para sustituir al nº 140, el nº 177 se seleccionó aleatoriamente para sustituir al 143 y el nº 179 se seleccionó aleatoriamente para sustituir al nº 168 de un conjunto de cinco cerdos adicionales que cumplieron los criterios de inclusión. ANÁLISIS

20 Los análisis estadísticos y los resúmenes de datos se realizaron por Dr. rer. hort. Martin Vanselow, Biometrie & Statistik, Zum Siemenshop 21, 30539 Hannover, Alemania, +49(0) 511 606 777 650, m.vanselow@t-online.de. Los datos se analizaron suponiendo una estructura de diseño completamente aleatoria. Los análisis estadísticos se realizaron usando la versión del software SAS 8.2 o superior (SAS, 2001, Cary, EE.UU./Carolina del Norte, SAS Institute Inc.). El cerdo 179 de MLV contra el PRRSV 94881 y los cerdos del control de exposición 124 y 161 murieron antes de la exposición y se excluyeron de los análisis después de la exposición. Todas las pruebas en diferencias se diseñaron como pruebas bilaterales a  $\alpha = 5\%$ . El informe estadístico se presenta en la Sección 15.9.

Puntuaciones de lesión pulmonar macroscópica

30 La puntuación de lesión pulmonar macroscópica para cada cerdo se calculó usando los factores mostrados a continuación en la Tabla 8.10 multiplicados por el % de patología para un lóbulo del pulmón específico. Los cálculos se realizaron usando el programa SAS.

Tabla 8.10 Factores para calcular las puntuaciones de lesión pulmonar macroscópica

Lóbulo del pulmón	Factor
Apical izquierdo	0,05
Cardíaco izquierdo	0,06
Diafragmático izquierdo	0,29
Apical derecho	0,11
Cardíaco	0,10
Diafragmático derecho	0,34
Accesorio/intermedio derecho	0,05

Los grupos de tratamiento se compararon en diferencias usando la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney.

Puntuaciones de lesión pulmonar histológica

35 Las puntuaciones histológicas individuales de las muestras de pulmón se acumularon por lóbulo y animal. Esta puntuación suma se dividió entre el número de lóbulos examinados por animal. Los resultados se usaron como valores individuales para la comparación entre los grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento se probaron en diferencias usando la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney.

qPCR del PRRS en los pulmones

40 Los datos de PCR cuantitativa (carga vírica del PRRS [ $\log_{10}$  GE/ml]) de pulmones recogidos en D189 se usaron para comparaciones entre los grupos de tratamiento por la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney. El promedio ( $\log_{10}$  GE/ml)

de los resultados de qPCR del pulmón izquierdo y derecho se usaron para la evaluación. Antes de los cálculos, el resultado analítico 'no detectado' se sustituyó por  $\log_{10}$  GE/ml de 0,0 y 'positivo' se sustituyó por 3,0.

Se generaron tablas de frecuencias de resultados de qPCR positivos. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se probaron por la prueba exacta de Fisher.

5 qPCR del PRRS en suero

Los datos de viremia se evaluaron por separado para cada día de investigación. Adicionalmente, para la carga vírica se analizaron las áreas bajo las curvas de respuesta individuales entre D179 y D189 (ABC 0-10) y entre D182 y D189 (ABC 3-10).

10 Los datos de PCR cuantitativa (carga vírica del PRRS [ $\log_{10}$  GE/ml]) se usaron para comparaciones entre los grupos de tratamiento por la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney. Antes de los cálculos, el resultado analítico 'no detectado' se sustituyó por un valor de  $\log_{10}$  GE/ml de 0,0 y 'positivo' se sustituyó por 3,0. Los grupos de tratamiento se probaron en diferencias usando la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney.

Se generaron tablas de frecuencias de resultados de qPCR positivos. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se probaron por la prueba exacta de Fisher.

15 Observaciones clínicas después de la exposición

Se generaron tablas de frecuencias de animales con al menos un hallazgo positivo entre D180 y D189. Las puntuaciones totales fueron la suma de la puntuación de respiración + la puntuación de comportamiento + la puntuación de tos. Los cálculos se realizaron usando el programa SAS. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se probaron por la prueba exacta de Fisher.

20 Las puntuaciones máximas y las puntuaciones medias por animal de D180 a D189 para respiración, comportamiento, tos y para los tres sumados juntos (total) se usaron para la evaluación estadística. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se probaron por la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney.

Peso corporal y aumento de peso diario promedio

25 Los aumentos de peso diarios individuales se calcularon para el periodo de tiempo entre D179 a D188. Para cada día de investigación y para el periodo de tiempo se calcularon las estadísticas descriptivas. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se probaron usando análisis de la varianza y posteriores pruebas de la t. Las medias por mínimos cuadrados de los grupos y las diferencias entre las medias por mínimos cuadrados con intervalos de confianza de 95% se calcularon a partir del análisis de la varianza.

Temperaturas rectales

30 Las diferencias entre los grupos de tratamiento con respecto a los datos de temperatura originales se probaron usando análisis de la varianza y posteriores pruebas de la t. Las medias por mínimos cuadrados de los grupos y las diferencias entre las medias por mínimos cuadrados con intervalos de confianza de 95% se calcularon a partir del análisis de la varianza.

Evaluación clínica después de la vacunación

35 Se generaron tablas de frecuencias de animales con al menos un hallazgo positivo entre D1 y D21. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se probaron por la prueba exacta de Fisher.

Serología del PRRS

Se generaron tablas de frecuencias de resultados positivos por ELISA para cada momento de tiempo. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se probaron por la prueba exacta de Fisher.

40 Resultados

Puntuaciones de lesión pulmonar macroscópica

45 Las medianas de las puntuaciones de lesión pulmonar macroscópica en D189 (DPC 10) fueron 0,1% y 13,8% para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y los controles de exposición, respectivamente. La mediana de la puntuación de lesión pulmonar macroscópica para cerdos vacunados contra el PRRS fue significativamente menor que la mediana de la puntuación de lesión pulmonar macroscópica para los controles de exposición ( $p < 0,0001$ ). La mediana de la puntuación de lesión pulmonar macroscópica para el grupo de control negativo fue 0,0%.

50 El número 123 (grupo de control de exposición) no pudo puntuarse para lesiones pulmonares en D189 debido a pleuritis difusa y adhesiones. De los tejidos de pulmón de este cerdo se aislaron *Moraxella osloensis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hyicus* y especies de *Pseudomonas* después de la autopsia.

Un resumen de las puntuaciones de lesión pulmonar macroscópica por grupo y el valor de p asociado se muestra a continuación en la Tabla 8.11.

Tabla 8.11 Resumen de puntuaciones de lesión pulmonar macroscópica por grupo (%) en D189

Grupo <sup>1</sup>	N <sup>3</sup>	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	Valor de p
1	21	0,00	12,40	0,060	0,050	0,550	0,400	1,099	<0,0001
2	19 <sup>2</sup>	0,06	69,20	13,800	2,690	22,650	20,850	15,842	
3	12	0,00	0,59	0,000	0,000	0,110	0,085	0,093	NI

5 <sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. <sup>2</sup> El nº 123 no se puntuó debido a pleuritis difusa y adhesiones debido a infecciones bacterianas. <sup>3</sup> Un cerdo de MLV contra el PRRSV 94881 y dos cerdos del control de exposición murieron antes de la exposición y no se incluyeron en el análisis. NI = no incluido en el análisis estadístico

Puntuaciones de lesión pulmonar histológica

10 Las medianas de las puntuaciones de lesión pulmonar histológica fueron 6,0 y 19,5 para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y los controles de exposición, respectivamente. La mediana de la puntuación de lesión pulmonar histológica para el grupo vacunado contra PRRS fue significativamente menor que la mediana de la puntuación de lesión pulmonar histológica para controles de exposición (**p<0,0001**). La mediana de la puntuación de lesión pulmonar histológica para el grupo de control negativo fue 9,0.

15 Un resumen de las puntuaciones de lesión pulmonar histológica por grupo y el valor de p asociado se muestra a continuación en la Tabla 8.12.

Tabla 8.12 Resumen de puntuaciones de lesión pulmonar histológica por grupo

Grupo <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	Valor de p
1	21	2	20	6,0	3,0	8,0	5,0	6,6	<0,0001
2	20	8	47	19,5	15,0	23,0	10,0	20,2	
3	12	0	15	9,0	7,0	14,0	6,5	9,1	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. <sup>2</sup> Un cerdo de MLV contra el PRRSV 94881 y dos cerdos del control de exposición murieron antes de la exposición y no se incluyeron en el análisis. NI = no incluido en el análisis estadístico

20 qPCR del PRRS en los pulmones

25 Las medianas de los valores de pulmón por qPCR de tejidos de pulmón fueron 3,69 y 6,25 log<sub>10</sub> GE/ml para cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 y controles de exposición, respectivamente. La mediana del valor de qPCR para cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 fue significativamente menor que la mediana del valor de qPCR para controles de exposición (**p<0,0001**). No se detectó ARN del PRRSV en muestras de pulmón de ningún cerdo de control negativo.

Un resumen de valores de qPCR de pulmón por grupo y el resultado de la prueba (valor de p) está continuación en la Tabla 8.13.

Tabla 8.13 Resumen de los valores de qPCR de pulmón por grupo (media log<sub>10</sub> GE/ml)

Grupo <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	Valor de p
1	21	0,00	6,83	3,69	1,50	5,21	3,18	3,36	<0,0001
2	20	4,80	7,40	6,25	5,62	6,68	1,26	6,22	
3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI

30 <sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. <sup>2</sup> Un cerdo con MLV contra el PRRSV 94881 y dos cerdos del control de exposición murieron antes de la exposición y no se incluyeron en el análisis. NI = no incluido en el análisis estadístico

Se detectó ARN del PRRSV en tejidos de pulmón de 90% y 100% de cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 y cerdos del control de exposición, respectivamente. No hubo diferencia estadística entre el grupo vacunado y los controles de exposición (p=0,4878).

35 Un resumen de frecuencia por grupo de tejidos de pulmón positivos por qPCR para PRRS de cerdos en la autopsia se muestra a continuación en la Tabla 8.14.

Tabla 8.14 Frecuencia por grupo de tejidos de pulmón positivos por qPCR para PRRSv

Grupo <sup>1</sup>	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Número total <sup>2</sup>	Valor de p
1	19	90	69,6	98,8	21	0,4878
2	20	100	83,2	100,0	20	
3	0	0	0,0	26,5	12	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. <sup>2</sup> Un cerdo de MLV contra el PRRSV 94881 y dos cerdos del control de exposición murieron antes de la exposición y no se incluyeron en el análisis. NI = no incluido en el análisis estadístico

5 qPCR del PRRS en suero

No se detectó ARN del PRRSv en el suero de ningún cerdo en D0. Después de la vacunación, los cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 tuvieron valores medios de 3,00, 0, 0, 3,00, 0, 0, 0, 0 y 0 log<sub>10</sub> GE/ml en D7, D14, D21, D28, D56, D84, D112, D140 y D168, respectivamente. Los valores fueron significativamente superiores a los de los controles de exposición en D7, D14, D21 y D28 (**p≤0,0013**), ya que los controles de exposición no detectaron ARN del PRRSv hasta D182 (DPC 3).

10

No se detectó ARN del PRRSv en el suero de ningún cerdo en D179 (DPC 0). Después de la exposición, los cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 tuvieron valores medios de 4,44, 0 y 0 log<sub>10</sub> GE/ml en D182 (DPC 3), D186 (DPC 7) y D189 (DPC 10), respectivamente, en comparación con 5,88, 5,30 y 4,24 log<sub>10</sub> GE/ml para controles de exposición en los mismos días. Los valores medios para los controles de exposición fueron superiores a los del grupo de MLV contra el PRRSV 94881 en todos los días después de la exposición (**p≤0,0001**).

15

No se detectó ARN del PRRSv en suero de ningún cerdo de control negativo durante este estudio.

Las medianas de los valores del ABC para cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 fueron 15,54 y 8,88 log<sub>10</sub> GE/ml por día de DPC 0 a DPC 10 y de DPC 3 a DPC 10, respectivamente. A diferencia, las medianas de los valores del ABC para controles de exposición fueron 44,77 y 36,43 log<sub>10</sub> GE/ml por día de DPC 0 a DPC 10 y de DPC 3 a DPC 10, respectivamente. Los valores medios para el grupo de MLV contra PRRS MLV fueron significativamente inferiores a los valores medios para los controles de exposición para ambos periodos (**p<0,0001**).

20

Los resúmenes de los datos de qPCR para PRRS en suero se muestran a continuación en las Tablas 8.15 y 8.16.

Tabla 8.15 Resumen de resultados por qPCR para PRRS en suero (log<sub>10</sub> GE/ml) de D0 a D168

Día	Grupo <sup>1</sup>	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	Valor de p
0	1	22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,0000
	2	22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
7	1	21	3,00	4,63	3,00	3,00	3,00	0,00	3,23	<0,0001
	2	22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
14	1	21	0,00	3,00	0,00	0,00	3,00	3,00	1,43	0,0005
	2	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
21	1	21	0,00	3,00	0,00	0,00	3,00	3,00	1,29	0,0013
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
28	1	21	0,00	3,88	3,00	0,00	3,00	3,00	1,93	<0,0001
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
56	1	21	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,57	0,1069
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
84	1	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,0000
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

ES 2 692 809 T3

	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
112	1	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,0000
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
140	1	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,0000
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
168	1	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,0000
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. NI = no incluido en el análisis estadístico

Tabla 8.16 Resumen de resultados por qPCR para PRRS en suero ( $\log_{10}$  GE/ml) de D179 a D189

Día	Grupo <sup>1</sup>	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	Valor de p
179 (DPC 0)	1	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,0000
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
182 (DPC 3)	1	21	3,00	5,58	4,44	3,93	5,28	1,51	4,42	<0,0001
	2	20	5,09	6,33	5,88	5,75	6,00	0,32	5,81	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
186 (DPC 7)	1	21	0,00	3,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,61	<0,0001
	2	20	3,66	6,57	5,30	4,86	5,69	1,08	5,30	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
189 (DPC 10)	1	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,0001
	2	20	0,00	5,88	4,24	3,71	4,42	1,18	3,97	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
ABC DPC 0-10	1	21	10,50	31,22	15,54	13,76	19,53	5,95	17,61	<0,0001
	2	20	36,86	52,16	44,77	43,23	48,03	6,24	44,84	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
ABC DPC 3-DPC 10	1	21	6,00	23,45	8,88	7,86	11,16	3,40	10,97	<0,0001
	2	20	27,77	43,02	36,43	34,60	38,53	5,23	36,12	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. NI = no incluido en el análisis estadístico. ABC = área bajo la curva;  $\log_{10}$  GE/ml por día

- 5 Después de la vacunación, el grupo de MLV contra el PRRSV 94881 tuvo proporciones de cerdos positivos por qPCR significativamente mayores en D7, D14, D21 y D28 en comparación con el grupo de control de exposición. ( **$p \leq 0,0013$** ). No se detectó diferencia significativa entre grupos en D56 para la proporción de cerdos positivos por qPCR ( $p=0,1069$ ).
- 10 En D182 (DPC 3), 100% de los cerdos en los grupos de MLV contra el PRRSV 94881 y de control de exposición fueron positivos por qPCR (no se realizó la prueba). En D186 (DPC 7) y D189 (DPC 10), el grupo de MLV contra PRRS tuvo una proporción de cerdos positivos por qPCR significativamente menor en comparación con el grupo de control de exposición (**<0,0001**).

15 Los resúmenes de las proporciones por grupo de datos positivos por qPCR se muestran a continuación en las Tablas 8.17 y 8.18.

Tabla 8.17 Resumen de proporción por grupo de resultados positivos por qPCR en suero después de la vacunación

Día	Grupo <sup>1</sup>	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Número total	Valor de p
0	1	0	0	0,0	15,4	22	n.a.
	2	0	0	0,0	15,4	22	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
7	1	21	100	83,9	100,0	21	<0,0001
	2	0	0	0,0	15,4	22	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
14	1	10	48	25,7	70,2	21	0,0005
	2	0	0	0,0	16,1	21	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
21	1	9	43	21,8	66,0	21	0,0013
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
28	1	13	62	38,4	81,9	21	<0,0001
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
56	1	4	19	5,4	41,9	21	0,1069
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
84	1	0	0	0,0	16,1	21	n.a.
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
112	1	0	0	0,0	16,1	21	n.a.
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
140	1	0	0	0,0	16,1	21	n.a.
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
168	1	0	0	0,0	16,1	21	n.a.
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. n.a. = no se realizó la prueba; NI = no incluido en el análisis estadístico

5 Tabla 8.18 Resumen de la proporción por grupo de resultados positivos por qPCR en suero después de la exposición

Día	Grupo <sup>1</sup>	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Número total	Valor de p
179 (DPC 0)	1	0	0	0,0	16,1	21	n.a.
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
182 (DPC 3)	1	21	100	83,9	100,0	21	n.a.
	2	20	100	83,2	100,0	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
186 (DPC 7)	1	4	19	5,4	41,9	21	<0,0001
	2	20	100	83,2	100,0	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
189 (DPC 10)	1	0	0	0,0	16,1	21	<0,0001
	2	19	95	75,1	99,9	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. n.a. = no se realizó la prueba; NI = no incluido en el análisis estadístico

Observaciones clínicas después de la exposición

5 No se observó respiración anormal en ningún cerdo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 después de la exposición en comparación con un cerdo del control de exposición (n° 149) que demostró una puntuación de "1" en D185 (DPC 6). No se detectó diferencia entre grupos para el porcentaje de cerdos que demostró la respiración anormal durante al menos un día después de la exposición (p=0,4878).

No se observaron comportamiento y tos anormal después de la exposición en ningún cerdo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 o en cerdos del control de exposición.

10 Los porcentajes de cerdos con las puntuaciones clínicas totales > 0 durante al menos un día después de la exposición fueron 0% y 5% para el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. Estos valores no fueron significativamente diferentes (p=0,4878).

No se observaron signos clínicos en el grupo de control negativo de D179 a D189.

15 Un resumen de las frecuencias por grupo de cerdos con al menos una puntuación de observación clínica positiva durante el periodo después de la exposición se muestra a continuación en la Tabla 8.19.

Tabla 8.19 Resumen de las frecuencias por grupo de cerdos con al menos una puntuación de observación clínica positiva después de la exposición

Parámetro	Grupo <sup>1</sup>	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Número total <sup>2</sup>	Valor de p
Respiración	1	0	0	0,0	16,1	21	0,4878
	2	1	5	0,1	24,9	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
Comportamiento	1	0	0	0,0	16,1	21	NA
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
Tos	1	0	0	0,0	16,1	21	NA
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
Total	1	0	0	0,0	16,1	21	0,4878
	2	1	5	0,1	24,9	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI

20 <sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. <sup>2</sup> Un cerdo de MLV contra el PRRSV 94881 y dos cerdos del control de exposición murieron antes de la exposición y no se incluyeron en el análisis. NI = no incluido en el análisis estadístico; NA = prueba no aplicable debido a la falta de variabilidad

No hubo diferencia entre grupos para puntuaciones de respiración máximas o puntuaciones totales máximas después de la exposición (p=0,4878).

25 Un resumen de las puntuaciones de observaciones clínicas máximas por grupo para el periodo después de la exposición (DPC 1 a DPC 10) se muestra a continuación en la Tabla 8.20.

Tabla 8.20 Resumen de puntuaciones clínicas máximas después de la exposición por grupo

Parámetro	Grupo <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	Valor de p
Respiración	1	21	0	0	0	0	0	0	0,0	0,4878
	2	20	0	1	0	0	0	0	0,1	
	3	12	0	0	0	0	0	0	0,0	NI
Comportamiento	1	21	0	0	0	0	0	0	0,0	1,0000
	2	20	0	0	0	0	0	0	0,0	
	3	12	0	0	0	0	0	0	0,0	NI
Tos	1	21	0	0	0	0	0	0	0,0	1,0000



	2	20	0	0	0	0	0	0	0,0	
	3	12	0	0	0	0	0	0	0,0	NI
Total	1	21	0	0	0	0	0	0	0,0	0,4878
	2	20	0	1	0	0	0	0	0,1	
	3	12	0	0	0	0	0	0	0,0	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. <sup>2</sup> Un cerdo de MLV contra el PRRSV 94881 y dos cerdos del control de exposición murieron antes de la exposición y no se incluyeron en el análisis. NI = no incluido en el análisis estadístico

- 5 Las puntuaciones de observaciones clínicas medias siguieron un patrón similar al porcentaje de cerdos con puntuaciones clínicas positivas. No hubo diferencias significativas entre el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición ( $p \geq 0,4878$ ). Un resumen de las puntuaciones de observaciones clínicas medias por grupo para el periodo después de la exposición (DPC 1 a DPC 10) se muestra a continuación en la Tabla 8.21.

Tabla 8.21 Resumen de puntuaciones clínicas medias después de la exposición por grupo

Parámetro	Grupo <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	Valor de p
Respiración	1	21	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,4878
	2	20	0,0	0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	
	3	12	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
Comportamiento	1	21	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,0000
	2	20	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
Tos	1	21	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,0000
	2	20	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
Total	1	21	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,4878
	2	20	0,0	0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	
	3	12	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI

- 10 <sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. <sup>2</sup> Un cerdo de MLV contra el PRRSV 94881 y dos cerdos del control de exposición murieron antes de la exposición y no se incluyeron en el análisis. NI = no incluido en el análisis estadístico

Peso corporal y aumento de peso diario promedio

- 15 La diferencia entre grupos no fue significativa ( $p=0,2389$ ). En D179 (DPC 0), los pesos corporales medios y medios por LS fueron 134,6 y 128,2 kg para el grupo de MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. La diferencia no fue significativamente diferente ( $p=0,1090$ ). En D188 (DPC 9), los pesos corporales medios y medios por LS fueron 138,3 y 130,3 kg para el grupo de MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. El peso corporal para el grupo vacunado fue significativamente superior al del grupo de control de exposición en D188 ( $p=0,0455$ ).

- 20 Los ADWG medios por LS durante el periodo de exposición (DPC 0 a DPC 9) fueron 0,4 y 0,2 kg/d para el grupo de MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición, respectivamente. Estos valores no fueron significativamente diferentes ( $p=0,1041$ ).

Los cerdos del control negativo tuvieron pesos corporales medios de 2,7, 117,2 y 120,0 kg en D0, D179 y D188, respectivamente. El ADWG para el grupo de control negativo de D179 a D188 fue 0,5 kg/d.

- 25 Un resumen de los pesos corporales medios por grupo en D0, D179 (DPC 0) y D188 (DPC 9) y ADWG de DPC 0 a DPC 9 se muestra a continuación en la Tabla 8.22. Un resumen de media por LS y análisis estadístico de pesos corporales y ADWG para el grupo de MLV contra el PRRSV 94881 y el grupo de control de exposición se muestra a continuación en la Tabla 8.23.

Tabla 8.22 Resumen del peso corporal por grupo y el aumento de peso diario promedio (kg y kg/d)

Día(s)	Grupo <sup>1</sup>	N	Mín.	Máx.	Mediana	Media	DE
Pesos corporales en 0	1	22	2,8	5,4	4,00	3,96	0,730
	2	22	2,4	4,8	3,75	3,72	0,547
	3	12	2,7	4,5	3,60	3,71	0,552
Pesos corporales en D179 (DPC 0)	1	21	108,5	155,0	136,60	134,57	12,737
	2	20	103,3	152,6	130,10	128,15	12,288
	3	12	117,2	156,5	133,05	134,61	10,900
Pesos corporales en D188 (DPC 9)	1	21	112,2	157,8	141,50	138,28	12,879
	2	20	109,4	150,9	131,90	130,27	11,896
	3	12	120,0	162,5	136,60	139,11	11,922
ADWG DPC 0 a DPC 9	1	21	-0,422	0,956	0,4111	0,4124	0,31653
	2	20	-0,589	0,844	0,2889	0,2350	0,36530
	3	12	-1,600	2,656	0,5111	0,5000	0,92391

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo

Tabla 8.23 Resumen del peso corporal medio por LS por grupo y aumento diario (kg y kg/d)

Día(s)	Grupo <sup>1</sup>	Media por LS	Intervalo de confianza de 95%		Valor de p
Pesos corporales en 0	1	3,96	3,674	4,241	0,2389
	2	3,72	3,446	4,000	
	Dif. 1-2	0,23	-0,162	0,631	
Pesos corporales en D179 (DPC 0)	1	134,57	129,040	140,093	0,1090
	2	128,15	122,487	133,813	
	Dif. 1-2	6,42	-1,496	14,329	
Pesos corporales en D188 (DPC 9)	1	138,28	132,800	143,756	<b>0,0455</b>
	2	130,27	124,652	135,878	
	Dif. 1-2	8,01	0,170	15,856	
ADWG DPC 0 a DPC 9	1	0,4124	0,26180	0,56297	0,1041
	2	0,2350	0,08070	0,38930	
	Dif. 1-2	0,1774	-0,03822	0,39299	

5 <sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo

#### Temperaturas rectales

10 La temperatura rectal media para el grupo de MLV contra el PRRSV 94881 fue 39,3°C en el día de exposición (D179) y las medias oscilaron de 39,1°C (D189, DPC 10) a 39,8°C (D181, DPC 2) después de la exposición. La temperatura rectal media para el grupo de control de exposición fue 39,1°C en el día de exposición y las medias oscilaron de 39,1°C (D183, DPC 4) a 39,9°C (D182, DPC 3) después de la exposición. Las temperaturas rectales medias para el grupo de control negativo siguieron siendo ≤ 39,3°C durante el mismo periodo de tiempo.

Un resumen de las temperaturas rectales por grupo se muestra a continuación en la Tabla 8.24.

Tabla 8.24 Resumen de temperatura rectal por grupo (°C) Días D179 (DPC 0) a D189 (DPC 10)

Día	Grupo <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	Mín.	Máx.	Mediana	Media	DE
D179 (DPC 0)	1	21	38,5	40,0	39,40	39,33	0,360
	2	20	38,6	40,0	39,00	39,07	0,380
	3	12	38,8	39,7	39,30	39,27	0,257
D180 (DPC 1)	1	21	38,7	40,4	39,40	39,46	0,370
	2	20	38,9	40,9	39,60	39,61	0,527

Día	Grupo <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	Mín.	Máx.	Mediana	Media	DE
	3	12	38,8	39,5	39,00	39,09	0,227
D181 (DPC 2)	1	21	39,0	41,0	39,80	39,82	0,473
	2	20	38,6	40,5	39,35	39,42	0,487
	3	12	38,8	39,2	38,80	38,90	0,141
D182 (DPC 3)	1	21	38,5	40,6	39,50	39,52	0,542
	2	20	39,0	41,1	40,05	39,86	0,588
	3	12	38,7	39,4	39,00	39,05	0,254
D183 (DPC 4)	1	21	38,9	40,8	39,50	39,52	0,411
	2	20	38,4	40,3	39,00	39,08	0,508
	3	11	38,8	39,4	39,10	39,08	0,209
D184 (DPC 5)	1	21	39,0	40,3	39,70	39,72	0,360
	2	20	38,7	39,7	39,10	39,15	0,302
	3	12	38,8	39,5	39,10	39,10	0,191
D185 (DPC 6)	1	21	39,1	40,5	39,60	39,66	0,376
	2	20	38,9	40,9	39,25	39,48	0,546
	3	12	38,4	39,4	38,85	38,88	0,313
D186 (DPC 7)	1	21	38,1	40,4	39,20	39,22	0,413
	2	20	38,6	40,4	39,35	39,39	0,479
	3	12	38,5	39,6	38,90	38,98	0,328
D187 (DPC 8)	1	21	38,8	39,9	39,20	39,23	0,290
	2	20	38,8	40,8	39,45	39,58	0,573
	3	12	38,5	39,5	38,85	38,93	0,296
D188 (DPC 9)	1	21	38,8	39,9	39,10	39,17	0,288
	2	20	38,3	40,5	39,00	39,20	0,598
	3	12	38,4	39,1	38,85	38,85	0,173
D189 (DPC 10)	1	21	38,7	39,7	39,00	39,06	0,256
	2	20	39,0	40,8	39,50	39,51	0,408
	3	12	38,6	39,3	39,05	39,00	0,226

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. <sup>2</sup> Un cerdo de MLV contra el PRRSV 94881 y dos cerdos del control de exposición murieron antes de la exposición y no se incluyeron en el análisis

- 5 Las temperaturas rectales medias por mínimos cuadrados fueron significativamente mayores para cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 en comparación con los controles de exposición en DPC 0 ( $p=0,0281$ ), DPC 2 ( $p=0,0095$ ), DPC 4 ( $p=0,0034$ ) y DPC 5 ( $p<0,0001$ ). Las temperaturas rectales medias por mínimos cuadrados fueron significativamente inferiores para cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 en comparación con los controles de exposición en DPC 8 ( $p=0,0183$ ) y en DPC 10 ( $p=0,0001$ ). No se detectaron diferencias significativas entre grupos para los restantes días después de la exposición ( $p\geq 0,0642$ ). Un resumen de la media por LS por grupo y el análisis estadístico de la temperatura rectal se muestra a continuación en la Tabla 8.25.

Tabla 8.25 Resumen de la temperatura rectal media por LS por grupo (°C) D179 (DPC 0) a D189 (DPC 10)

Día	Grupo <sup>1</sup>	Media por LS	Intervalo de confianza de 95%		Valor de p
D179 (DPC 0)	1	39,33	39,170	39,496	<b>0,0281</b>
	2	39,07	38,903	39,237	
	Dif. 1-2	0,26	0,030	0,497	
D180 (DPC 1)	1	39,46	39,257	39,657	0,3025
	2	39,61	39,400	39,810	
	Dif. 1-2	-0,15	-0,434	0,138	
D181 (DPC 2)	1	39,82	39,612	40,036	<b>0,0095</b>
	2	39,42	39,198	39,632	

Día	Grupo <sup>1</sup>	Media por LS	Intervalo de confianza de 95%		Valor de p
	Dif. 1-2	0,41	0,105	0,712	
D182 (DPC 3)	1	39,52	39,274	39,773	0,0642
	2	39,86	39,604	40,116	
	Dif. 1-2	-0,34	-0,693	0,021	
D183 (DPC 4)	1	39,52	39,320	39,727	<b>0,0034</b>
	2	39,08	38,867	39,283	
	Dif. 1-2	0,45	0,158	0,740	
D184 (DPC 5)	1	39,72	39,572	39,866	<b>&lt;0,0001</b>
	2	39,15	38,999	39,301	
	Dif. 1-2	0,57	0,359	0,779	
D185 (DPC 6)	1	39,66	39,457	39,869	0,2164
	2	39,48	39,269	39,691	
	Dif. 1-2	0,18	-0,112	0,478	
D186 (DPC 7)	1	39,22	39,027	39,421	0,2408
	2	39,39	39,188	39,592	
	Dif. 1-2	-0,17	-0,448	0,116	
D187 (DPC 8)	1	39,23	39,034	39,432	<b>0,0183</b>
	2	39,58	39,376	39,784	
	Dif. 1-2	-0,35	-0,631	-0,062	
D188 (DPC 9)	1	39,17	38,966	39,377	0,8454
	2	39,20	38,989	39,411	
	Dif. 1-2	-0,03	-0,323	0,266	
D189 (DPC 10)	1	39,06	38,908	39,207	<b>0,0001</b>
	2	39,51	39,352	39,658	
	Dif. 1-2	-0,45	-0,662	-0,234	

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo

5 Tres de 21 (14%) cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 y 5 de 20 (25%) controles de exposición tuvieron una temperatura rectal  $\geq 40,5^{\circ}\text{C}$  durante al menos un día después de la exposición. No se detectó diferencia entre grupos para la proporción de cerdos que presentó a temperatura rectal  $\geq 40,5^{\circ}\text{C}$  durante al menos un día después de la exposición ( $p=0,4537$ ). Un resumen de la proporción por grupo de cerdos con fiebre ( $\geq 40,5^{\circ}\text{C}$ ) durante al menos un día después de la exposición se muestra a continuación en la Tabla 8.26.

Tabla 8.26 Resumen de la proporción por grupo de fiebre ( $\geq 40,5^{\circ}\text{C}$ ) durante al menos un día después de la exposición

Día	Grupo <sup>1</sup>	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Número total <sup>2</sup>	Valor de p
D180 (DPC 1) a D189 (DPC 10)	1	3	14	3,0	36,3	21	0,4537
	2	5	25	8,7	49,1	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	

10 <sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. <sup>2</sup> Un cerdo de MLV contra el PRRSV 94881 y dos cerdos del control de exposición murieron antes de la exposición y no se incluyeron en el análisis. NI = no incluido en el análisis estadístico

Evaluación clínica después de la vacunación

15 Cuatro de 22 (18%) cerdos de MLV contra el 94881 del PRRS, 8 de 22 (36%) cerdos del control de exposición y 2 de 12 (17%) cerdos del control negativo presentaron una evaluación clínica anormal durante al menos un día de D1 a D21. No hubo diferencia significativa entre grupos para este parámetro ( $p=0,3102$ ).

Un resumen del porcentaje por grupo de cerdos con al menos un evaluación clínica anormal de D1 a D21 se muestra a continuación en la Tabla 8.27.

Tabla 8.27 Resumen del porcentaje por grupo de cerdos con al menos una evaluación clínica anormal de D1-D21

Grupo <sup>1</sup>	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Número total	Valor de p
1	4	18	5,2	40,3	22	0,3102
2	8	36	17,2	59,3	22	
3	2	17	2,1	48,4	12	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. NI = no incluido en el análisis estadístico

5 En conjunto, 7 cerdos de MLV contra el PRRSV 94881 presentaron una evaluación clínica anormal durante al menos un día entre D1 y D177:

10 El cerdo 121 presentó hinchazón de la barriga de D61 a D146, una vaina hinchada de D147 a D167, hinchazón de la barriga en D168, una vaina hinchada de D169-172 e hinchazón de la barriga de 173 a 177. El cerdo 141 estuvo delgado de D4-D10, estuvo deprimido de D4-D6 y con recubrimiento de pelo despeinado en D5. El cerdo 144 presentó tos en D26. El cerdo 146 presentó hinchazón en el esternón en D82. El cerdo 147 tuvo debilidad en las patas de D84-D86 y tuvo sacudidas en D84. El cerdo 154 estuvo delgado de D4-D6. El cerdo 179 estuvo delgado de D2-D5, presentó recubrimiento de pelo despeinado en D5 y se encontró muerto en D6. Trece cerdos en el grupo de control de exposición presentaron una evaluación clínica anormal durante al menos un día de D1 a D177: el cerdo 124 presentó sacudidas y temblores en D20 y se encontró muerto en D21. El cerdo 134 presentó una vaina hinchada de D46-D68, hinchazón de la barriga de D69-D143, una hernia umbilical en D144 e hinchazón de la barriga de D145 a D177. El cerdo 137 presentó una vaina hinchada de D108-D143. El cerdo 138 presentó una vaina hinchada de D115-D143. El cerdo 148 presentó cojera o una pata hinchada de D16-20 y tos en D35. El cerdo 149 estuvo delgado de D5-D9 y en D12 y presentó recubrimiento de pelo despeinado de D12-D15. El cerdo 150 estuvo delgado de D4-D9 y en D13, presentó mala condición corporal de D10-D12 y estuvo deprimido en D11. El cerdo 161 estuvo delgado de D4-D9, presentó recubrimiento de pelo despeinado y signos del sistema nervioso central en D9 y se encontró muerto en D10. El cerdo 167 presentó una vaina hinchada de D117-D143. El cerdo 170 estuvo delgado de D4-D7 y presentó depresión en D7. El cerdo 172 presentó una llaga o una garra hinchada de D120-D143. El cerdo 177 presentó depresión en D19 e hinchazón en el cuello de D156-D159. El cerdo 178 presentó depresión en D5, de D17-20 y de D28-D36, estuvo cojo y/o pata hinchada de D15-D47, estuvo delgado de D16-D18 y tuvo entumecimiento de las patas de D39-D47. Seis cerdos en el control negativo presentaron una evaluación clínica anormal durante al menos un día de D1 a D177. El cerdo 120 presentó tos de D5-7 y en D12. El cerdo 126 estuvo delgado de D2-18, presentó depresión de D4-D5, en D10 y de D17-D19, recubrimiento de pelo despeinado en D5 y respiración fatigosa de D18-D22. El cerdo 132 presentó un absceso de D49-D56. El cerdo 145 presentó una vaina hinchada de D37-D43 y de D46 a D74, y una llaga en la vaina de D75-D83 y de D85 a D87. El cerdo 151 presentó cojera y/o una pata hinchada de D78-D83 y en D85. El cerdo 155 presentó un absceso en D69-D77.

30 Se produjeron tres mortalidades antes de la exposición. Cerdo 179 (MLV contra el 94881 del PRRS, D6): la autopsia reveló lesiones mínimas (delgado, mala condición corporal). Las pruebas de laboratorio mostraron una leve neumonía intersticial macrofágica. La inmunohistoquímica fue negativa para PRRS. Las muestras intestinales se autolisaron, pero no mostraron pruebas de necrosis grave o inflamación grave. Se aislaron sin complicaciones *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp (Sección 15.9). Cerdo 124 (control de exposición, D21): no se identificaron lesiones macroscópicas en la autopsia. Las pruebas de laboratorio revelaron meningoencefalitis supurativa a piogranulomatosa grave con perivasculitis supurativa. También fue evidente la marcada congestión pulmonar y hepática. El diagnóstico fue meningoencefalitis asociada a *Streptococcus suis*. Cerdo 161 (control de exposición, D10): la autopsia reveló lesiones mínimas (delgado, mala condición corporal). De tejidos de pulmón se aislaron *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus* alfa hemolítico y *Staphylococcus auricularis*.

#### 40 Serología del PRRS

45 Todos los cerdos fueron negativos por ELISA para PRRS en D0 y D7. En D14, 90% de los cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 tuvieron títulos de ELISA positivos para PRRS. Este número aumentó al 95% en D21 y fue 100%, 100%, 100%, 90%, 100% y 95% en D28, D56, D84, D112, D140 y D168, respectivamente. Ninguno de los cerdos del control de exposición desarrolló títulos de anticuerpos del PRRS durante la fase de vacunación de este estudio, y de D14 a D168, un porcentaje significativamente mayor de cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 tuvieron títulos de anticuerpos del PRRS positivos en comparación con los controles de exposición ( $p < 0,0001$ ).

50 Durante la fase de exposición del estudio, los porcentajes de cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 con títulos de ELISA positivos para PRRS fueron 95%, 95%, 100% y 100% en DPC 0, DPC 3, DPC 7 y DPC10, respectivamente. A diferencia, los cerdos del control de exposición no desarrollaron títulos de anticuerpos del PRRS hasta DPC 7, cuando 30% tuvo títulos. Éste aumentó al 80% en DPC 10. Los cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 tuvieron mayores porcentajes de animales con títulos de anticuerpos del PRRS positivos durante la fase de exposición del estudio ( $p \leq 0,0478$ ).

Los cerdos en el grupo de control negativo fueron seronegativos por ELISA para PRRS durante el estudio, con la

excepción de dos cerdos en D112. Los números 116 y 120 fueron seropositivos por ELISA para PRRS en D112.

Un resumen de porcentajes por grupo de cerdos con títulos de anticuerpos del PRRS positivos antes de la exposición se muestra a continuación en la Tabla 8.28. Los datos de la porción de exposición del estudio se muestran a continuación en la Tabla 8.29.

5 Tabla 8.27 Resumen de la frecuencia por grupo de cerdos con título de anticuerpos del PRRS positivos por día, Días 0-168

Día	Grupo <sup>1</sup>	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Número total	Valor de p
0	1	0	0	0,0	15,4	22	NA
	2	0	0	0,0	15,4	22	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
7	1	0	0	0,0	16,1	21	NA
	2	0	0	0,0	15,4	22	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
14	1	19	90	69,6	98,8	21	<0,0001
	2	0	0	0,0	16,1	21	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
21	1	20	95	76,2	99,9	21	<0,0001
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
28	1	21	100	83,9	100,0	21	<0,0001
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
56	1	21	100	83,9	100,0	21	<0,0001
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
84	1	21	100	83,9	100,0	21	<0,0001
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
112	1	19	90	69,6	98,8	21	<0,0001
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	2	17	2,1	48,4	12	NI
140	1	21	100	83,9	100,0	21	<0,0001
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
168	1	20	95	76,2	99,9	21	<0,0001
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. NI = no incluido en el análisis estadístico. NA = no aplicable, no expuesto

10 Tabla 8.29 Resumen de frecuencia por grupo de cerdos con título de anticuerpos del PRRS positivos por día, DPC 0 a DPC 10

Día	Grupo <sup>1</sup>	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Número total	Valor de p
D179 (DPC 0)	1	20	95	76,2	99,9	21	<0,0001
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
D182 (DPC 3)	1	20	95	76,2	99,9	21	<0,0001
	2	0	0	0,0	16,8	20	

Día	Grupo <sup>1</sup>	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Número total	Valor de p
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
D186 (DPC 7)	1	21	100	83,9	100,0	21	<b>&lt;0,0001</b>
	2	6	30	11,9	54,3	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
D189 (DPC 10)	1	21	100	83,9	100,0	21	<b>0,0478</b>
	2	16	80	56,3	94,3	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI

<sup>1</sup> Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. NI = no incluido en el análisis estadístico.

#### Discusión/Conclusión

5 Para lograr el objetivo del estudio, veintidós (22) cerdos sanos, susceptibles y seronegativos para PRRS se inocularon IM con 1 ml de MLV contra el PRRSV 94881 a aproximadamente 14 días de edad. Treinta y cuatro (22 cerdos del grupo de control de exposición y 12 cerdos del grupo de control negativo) cerdos susceptibles y seronegativos para PRRS se inocularon IM con 1 ml de producto de control a aproximadamente 14 días de edad.

#### Validación del estudio y modelo de exposición

10 Los cerdos en el grupo de control negativo siguieron siendo negativos para PRRSv (viremia; qPCR) durante el estudio. Dos cerdos (nº 116 y 120) en el grupo de control negativo tuvieron títulos positivos por ELISA en D112, mientras que todos los otros resultados de ELISA para este grupo fueron negativos. Considerando que no se detectó viremia en estos cerdos o en el grupo como conjunto; asimismo, todas las muestras de suero fueron negativas por ELISA, los resultados para estos dos cerdos en D112 se consideraron falsos positivos posiblemente debido a un error de laboratorio inasignable. Por tanto, éste fue un estudio válido. Sin guardar relación con el establecimiento de un estudio válido, el grupo de control negativo tuvo una mediana de la puntuación de lesión pulmonar histológica de 9,0 en D189 a diferencia de una mediana de la puntuación de lesión macroscópica de 0,0%. Estos datos ponen de relieve que los cerdos alojados bajo condiciones de cría de cerdos normales durante un periodo de tiempo prolongado desarrollan lesiones pulmonares menores que son sin importancia y no están relacionadas con patógenos específicos.

20 Tras la inoculación con la cepa aislada del PRRS europea 205817 mediante el método descrito anteriormente, el grupo de control de exposición presentó un ADWG medio de DPC 0 a DPC 9 de 0,2 kg/día (un ADWG medio de 0,5 kg/día para el grupo de control negativo), una mediana de la puntuación de lesión pulmonar macroscópica de 13,8% (0,0% para el grupo de control negativo), una mediana de la puntuación de lesión pulmonar histológica de 19,5 (9,0 para el grupo de control negativo) y un valor medio de 6,25 log<sub>10</sub> GE/ml para la detección de ARN del PRRSv en el tejido de pulmón (mediana de 0,0 log<sub>10</sub> GE/ml para el grupo de control negativo). Estos resultados ponen de relieve que la enfermedad clínica específica para PRRS se indujo en el grupo de control de exposición, validándose así este modelo de exposición como una herramienta de laboratorio clínico adecuada para evaluar la eficacia de la vacuna contra el PRRS y más específicamente una duración de 26 semanas de inmunidad de MLV contra el 94881 del PRRS.

30 Determinación de la duración de 26 semanas de la inmunidad de MLV contra el PRRSV 94881

La determinación de la DOI para MLV contra el PRRSV 94881 de 26 semanas después de la vacunación se basó en el grupo de vacunas que presentaba una reducción significativa (p≤0,05) en lesiones pulmonares (macroscópicas o histológicas) después de la exposición en comparación con el grupo de control de exposición.

35 Las lesiones pulmonares macroscópicas e histológicas se seleccionaron como el parámetro primario para la determinación de la DOI de 26 semanas debido a que este parámetro proporciona las pruebas de eficacia más clínicamente relevantes y convincentes cuando se evalúa una nueva vacuna dentro del modelo de exposición respiratoria del PRRS en cerdos. El desarrollo de lesiones pulmonares es uno de los distintivos de la enfermedad de PRRS respiratoria en cerdos y puede considerarse la fuente para todas las posteriores manifestaciones de características de la enfermedad por el PRRSv secundarias tales como signos clínicos, fiebre, disminución del ADWG, etc.

40 El grupo de MLV contra el PRRSV 94881 presentó una reducción significativa en la patología pulmonar macroscópica después de la exposición, como se demuestra por una mediana de la puntuación de lesión pulmonar macroscópica de 0,1% en comparación con el grupo de control de exposición, que presentó una mediana de la puntuación de lesión pulmonar macroscópica de 13,8% (p<0,0001). Además, el grupo de MLV contra el PRRSV 94881 presentó una reducción significativa en las puntuaciones de lesión pulmonar histológica, como se demuestra por una mediana de la puntuación de lesión pulmonar de histología de 6,0 para el grupo de MLV contra el PRRSV 94881 en comparación con una mediana de la puntuación de lesión pulmonar de histología de 19,5 para el grupo de

control de exposición ( $p < 0,0001$ ). Por tanto, la DOI de 26 semanas para MLV contra el PRRSV 94881 a la dosificación de  $1 \times 10^{4,27}$  TCID<sub>50</sub> se estableció basándose en el parámetro primario de una reducción significativa para lesiones pulmonares después de la exposición. Este resultado se logró con una dosis de vacuna ligeramente menor que la dosis de inmunización mínima elegida como diana de  $1 \times 10^{4,5}$  TCID<sub>50</sub>/ml. Un cerdo del control de exposición (nº 123) no pudo puntuarse para lesiones pulmonares macroscópicas debido a pleuritis y adhesiones debido a infecciones bacterianas, pero se puntuó para lesiones pulmonares histológicas. La omisión de este cerdo del grupo de control del análisis de la puntuación de lesión pulmonar macroscópica de la exposición no afectó el resultado de este estudio.

La viremia después de la exposición se seleccionó como el parámetro secundario más importante debido a que representa el nivel de replicación y persistencia vírica que se produce dentro del animal huésped tras la exposición. Una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) en la viremia se correspondería con una vacuna contra el PRRS que induce inmunidad adecuada para limitar la patogénesis del PRRS dentro del huésped. 3, 7 y 10 días después de la exposición, el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 demostró una reducción significativa en la viremia (qPCR) en comparación con el grupo de control de exposición ( $p < 0,0001$ ). Para evaluar adicionalmente la viremia después de la exposición entre grupos se calculó la cantidad de carga vírica durante una duración específica de tiempo después de la exposición, como se representa como "área bajo la curva" o ABC. El grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 tuvo una mediana del valor de ABC de DPC 0 a DPC 10 de  $15,54 \log_{10}$  GE/ml/día; mientras que el grupo de control de exposición tuvo una mediana del valor de ABC de  $44,77 \log_{10}$  GE/ml/día ( $p < 0,0001$ ). Además, el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 tuvo una mediana del valor de ABC de DPC 3 a DPC 10 de  $8,88 \log_{10}$  GE/ml/día; mientras que el grupo de control de exposición tuvo una mediana del valor de ABC para este periodo de  $36,43 \log_{10}$  GE/ml/día ( $p < 0,0001$ ). Si la viremia se examinó en momentos de tiempo específicos después de la exposición o durante el transcurso del periodo después de la exposición, la MLV contra el PRRSV 94881 administrada 26 semanas antes de exposición a una cepa europea heteróloga virulenta del PRRS redujo significativamente ( $p \leq 0,05$ ) la viremia después de la inoculación de la exposición.

En asociación con una reducción de viremia del PRRS después de la exposición, una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) en la carga vírica en el tejido de pulmón también sería de gran importancia desde el punto de vista de la inmunidad de la vacuna contra el PRRS. Una reducción de la carga vírica en el tejido de pulmón puede asociarse a estabilidad vírica reducida, replicación y persistencia dentro del huésped y puede conducir secundariamente a una reducción de la propagación del PRRSV a otros cerdos. En este estudio, los tejidos de pulmón del grupo de MLV contra el PRRSV 94881 tuvieron una mediana del resultado de qPCR de pulmón de  $3,69 \log_{10}$  GE/ml 10 días después de la exposición (DPC 10) mientras que el grupo de control de exposición tuvo una mediana del resultado de qPCR de pulmón de  $6,25 \log_{10}$  GE/ml. La diferencia entre el grupo de vacunas y el grupo de control de exposición fue significativa ( $p < 0,0001$ ), soportándose así adicionalmente la duración de la inmunidad de 26 semanas.

Una reducción marcada en la gravedad y la frecuencia de signos clínicos después de la exposición en cerdos también soportaría la eficacia de la vacuna contra el PRRS y el establecimiento de DOI de 26 semanas para MLV contra el 94881 del PRRS. Sólo un cerdo presentó signos clínicos tras la exposición: el cerdo 149 (control de exposición) tuvo una puntuación respiratoria de "1" (respiración jadeante/rápida) en D185. Ningún cerdo en el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 presentó signos clínicos durante la fase después de la exposición de este estudio y no hubo diferencias estadísticas entre los grupos vacunados y de control de exposición ( $p = 0,4878$  o no se realizó la prueba). Los signos clínicos después de la exposición no fueron suficientemente fuertes en este estudio para evaluar la DOI.

La fiebre entre grupos varió después de la exposición. Los cerdos vacunados con MLV contra el PRRSV 94881 presentaron significativamente menores temperaturas rectales medias por LS en dos días (DPC 8 y DPC 10;  $p \leq 0,0183$ ) y mayores temperaturas rectales medias por LS en cuatro días (DPC 0, DPC 2, DPC 4 y DPC 5;  $p \leq 0,0281$ ) en comparación con los cerdos del control de exposición. De otro modo, no se detectaron diferencias significativas entre grupos después de la exposición ( $p \geq 0,0642$ ). Aunque se detectaron diferencias estadísticas entre grupos después de la exposición, estas diferencias no fueron biológicamente significativas, considerando que las temperaturas rectales medias siguieron siendo  $\leq 39,9^\circ\text{C}$  (grupo de control de exposición, D182) para todos los grupos. No se detectó diferencia entre grupos con respecto a la proporción de cerdos con fiebre durante al menos un día después de la exposición ( $p = 0,4537$ ).

La presencia de viremia significativa, patología del pulmón y carga vírica en tejidos de pulmón debido a PRRS en el grupo de control de exposición produjo una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre grupos para peso corporal en DPC 9. En este estudio, los grupos vacunados y de control de exposición tuvieron pesos corporales medios por LS en DPC 9 de 138,3 kg y 130,3 kg, respectivamente ( $p = 0,0455$ ). Los ADWG medios por LS de DPC 0 a DPC 9 fueron 0,4 kg/día y 0,2 kg/día para grupos vacunados y de exposición, respectivamente. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,1041$ ).

Parámetros examinados después de la vacunación en este estudio

Se encontraron muertos tres cerdos durante la fase de vacunación de este estudio. El cerdo 179 (vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS) se encontró muerto en D6 asociado a infecciones por *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. sin complicaciones. El cerdo 161 (grupo de control de exposición) se encontró muerto en D10



asociado a infecciones por *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus* alfa hemolítico y *Staphylococcus auricularis*. El cerdo 124 (grupo de control de exposición) se encontró muerto en D21 asociado a una infección por *Streptococcus suis* que condujo a meningoencefalitis. Para controlar y prevenir cualquier muerte más, los cerdos se trataron en masa con vitaminas y antibióticos inyectables. Tras los tratamientos no se produjeron más muertes. Como las muertes se produjeron en ambos grupos de tratamiento puede asumirse que el propio IVP no se asoció a las infecciones. Más probablemente, los cerdos llegaron a la instalación de investigación alojando estas infecciones. Los datos para estos cerdos se incluyeron cuando estuvieron disponibles. Las puntuaciones de lesión pulmonar macroscópica e histológica de estos cerdos se omitieron de los análisis de lesión pulmonar ya que estos cerdos murieron antes de la administración de exposición. La pérdida de un cerdo de MLV contra el PRRSV 94881 y dos cerdos del control de exposición durante el prolongado periodo de tiempo desde la vacunación hasta la exposición no afectó el resultado del estudio.

No se observaron evaluaciones clínicas anormales relacionadas con la vacunación con MLV contra el PRRSV 94881 o producto de control en cerdos tras la inoculación en D0. Siete cerdos en el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 tuvieron evaluaciones anormales después de la vacunación; mientras que trece cerdos del control de exposición tuvieron evaluaciones anormales. Excluyendo los tres cerdos que murieron debido a infecciones bacterianas, estas evaluaciones anormales incluyeron delgadez, tos, hinchazones, recubrimiento de pelo despeinado, depresión, abscesos y mala condición corporal en diversos momentos de tiempo, ninguno de los cuales duró un periodo de tiempo prolongado. En opinión del autor, estos hallazgos no estuvieron relacionados con la administración de ningún producto experimental, sino que son hallazgos típicos en cerdos en crecimiento/maduración bajo situaciones de alojamiento en grupo durante un periodo de tiempo prolongado.

Todos los cerdos fueron negativos en serología por ELISA para PRRS en D0, confirmándose así que todos los cerdos cumplieron los criterios de inclusión de ser seronegativos para PRRS tras la entrada en el estudio. La mayoría de los cerdos (90%) que recibieron MLV contra el PRRSV 94881 se seroconvirtieron para PRRS en D14 y todos los cerdos vacunados contra el PRRS fueron seropositivos en D28. En cambio, los cerdos del control de exposición siguieron siendo seronegativos hasta 7 días después de la exposición, cuando este grupo empezó a demostrar seroconversión para PRRS. Como se ha contemplado anteriormente, dos cerdos del control negativo fueron seropositivos por ELISA para PRRS en D112, que se consideró un hallazgo secundario, posiblemente debido a un error de laboratorio inasignable. ç

7, 14, 21 y 28 días después de la vacunación, el grupo vacunado con MLV contra el PRRSV 94881 presentó las medianas de resultados de qPCR de 3,00, 0, 0 y 3,00 log<sub>10</sub> GE/ml, respectivamente. Estos resultados ponen de relieve que en el plazo de 4 semanas desde la vacunación, una dosificación de 1 x 10<sup>4.27</sup> TCID<sub>50</sub> de MLV contra el PRRSV 94881 indujo suficiente replicación de la MLV que frecuentemente se requiere para construir la inmunidad protectora ya a las 4 semanas después de la vacunación. En cambio, el grupo de control de exposición fue negativo para viremia del PRRS hasta tres días después de la exposición.

### 35 Conclusión

Una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) de lesiones pulmonares macroscópicas e histológicas en la autopsia, la carga vírica en tejidos de pulmón en la autopsia y la viremia después de la exposición para el grupo de MLV contra el PRRSV 94881 en comparación con el grupo de control de exposición demostró la eficacia de la vacuna contra el PRRSV virulento cuando se vacunó a las 2 semanas de edad y se expuso a las 26 semanas después de la vacunación. Por tanto, los resultados de este estudio soportan la demostración de la duración de la inmunidad de 26 semanas después de la vacunación con MLV contra el 94881 del PRRS. Estos resultados se alcanzaron con una dosis de vacuna de 1 x 10<sup>4.27</sup> TCID<sub>50</sub>/ml, que fue ligeramente menor que la dosis de inmunización mínima (1 x 10<sup>4.5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml).

Las secuencias de la cepa atenuada y la cepa parental PRRSV 94881 son como las siguientes:

45 SEQ ID NO:1: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA del virus de siembra maestro del PRRS de 94881

```

1 TTTGTGTACC TTGGAGGCGT GGGTACAGCC CTGCCCCACC CTTTGGTCCC TGTTCTAGCC
61 CGACAAGTAC CTTTCTCTCT CGGGGCGAGC GCGCCGCCTG CTGCTCCCTT GCGGCGGGAA
121 GGACCTCCCG AGTATTTCCG GAGAGCACCT GCTTTACGGG ATCTCCGCCC TTTAACCATG
50 181 TCTGGGATGT TCTCCCGGTG CATGTGCACC CCGGCTGCCC GGGTATTTTG GAACGCCGGC
241 CAAGTCTATT GCACACGGTG TCTCAGTGCA CGGTCTCTTC TCTCTCCAGA ACTTCAGGAC
301 ACGGACCTCG GTGCAGTTGG CTTGTTTTCAC AAGCCTAAAG ACAAGCTCCA TTGGAAAGTT
361 CCCATTGGTA TCCCCAGGT GGAATGTTCT CCATCTGGGT GTTGCTGGCT GTCAACCATT
421 TTTCTTTTAG CGCGCATGAC CTCCGGCAAT CACAACCTCC TTCAACGACT CGTGAAGGTT

```

ES 2 692 809 T3

481 GCTGATGTAT TGTACCGTGA CGGTTGCTTA ACCCCTAGAC ACCTCCGTGA ACTCCAAGTT  
 541 TACGAGCGTG GTTGAATTG GTATCCGATT ACGGGCCTG TGCCTGGGAT GGCTGTGTAC  
 601 GCGAACTCCA TGCACGTGTC CGACCAACCG TTCCCTGGTG CCACTCATGT GTTAACAAAT  
 661 TCCCCTTTGC CTCAACGGGC TTGTGCGCAG CCGTTCGTGC CGTTCGAAGA GGCCCATCTCT  
**5** 721 AGCATATACA GGTGGGAAAA ATTTGTAATT TTTATGGATT CCTCCTCCGA CGGTGATCTT  
 781 CGCATGATGT GGACTCCGGA ATCCGATGAC TCCACGGCTT TGAAGTTCT GCCGCCGAG  
 841 CTAGAACACC AGGTCAAGGT CCTTGTTCGG AGCTTTCCCG CCCATCACCT TGTCGACCTT  
 901 GCCGATTGGG AGCTCACTGA GTCCCCTGAT AACGGTTTTT CCTTCAGCAC GTCACATCCT  
 961 TGCGGCTACC TTGTTCGGGA CCCGGCTGTA TCCGAAGGCA AGTGTGGCT TTCCTGCTTT  
**10** 1021 TTGAGCCAGT CAGCCGAAGT GCTCAGTCGC GAGGCGCATC TGGCTACCGC CTATGGTTAC  
 1081 CAAACCAAGT GGGGTGTGCC TGGCAAGTAC ATCCAGCGCA GACTTCAAGT TCACGGTCTC  
 1141 CGTGCTGTGG TCGACCCTGA TGGTCCCATT CACGTTGAAG CATTGTCTTG CCCCCAGTCT  
 1201 TGGATCAGGC ACTTGACCCT GAATGATGAT GTCACCCCGG GATTGTTTCG CCTAATGTCT  
 1261 CTTGCGATTG TGCCGAACAC AGAGCCTACC ACACACCGGA TCTTTCGTTT TGGAGTGCAC  
**15** 1321 AAGTGGTATG GTGCCGCCG CAAACGGGCC CGTGGCAAGC GTGCCGCCAA AAGTGAGAAA  
 1381 GACTCGGCTT CCACCCCAA GGTGCCCCGA CCGACTTCCA CCAGTGGAAT CGTCACCTAC  
 1441 TCCCCACCTG CGGACGGGTC TTGTGGTTGG CATGCCCTTG CCGCCATACT GAACCGGATG  
 1501 ATTAATAATG ACTTCACGTC CCCTCTGCCT CGGTACAACA GGCCGGAGGA CGATTGGGCT  
 1561 TCTGATGGTG ACCTTGCTCA GGCCATTCAA TGTTTGCAAC TACCTGCCGC CATAGCTCGG  
**20** 1621 AACCGCGCCT GCCCTAACGC CAAATACCTC ATAAACTCA ACGGAGTTCA TTGGGAGGTA  
 1681 GAGGTGAGGC CTGGAATGGC TCCTCGCTCC CTCTCTCGTG AGTGCCTTGT TGGCGTCTGC  
 1741 TCTGAAGGCT GTGTGCGGTC GCCTTACCCG GAGGACGGGT TGCCTAAACG TGCACTTGAG  
 1801 GCCCTGGCGT CTGCTTATAG ACTGCCTTCA GACTGTGTTT GTGATGGTAT TATTGACTTC  
 1861 CTTGCCAATC CACCTCCCCA GGAGTTCTGG ACTCTTGACA AAATGTTGAC TTCCCCGTCA  
**25** 1921 CCGGAGCAGT CCGGCTTCTC TAGTCTGTAT AAATTGTTGT TAGAGATCTT GCCGCAGAAA  
 1981 TGCGGATCCA CAGAAGGGGA ATTCATCTAT ACTGTTGAGA GGATGTTGAA GGATTGTCCG  
 2041 AGCTCCAAAC AGGCCATGGC CCTCCTTGCA AAAATTAAGG TCCCATCCTC AAAGGCCCCA  
 2101 TCCGTGACTC TGAACGAGTG CTTCCCCACG GATGTTCCAG TCAACTCTGA GTTAATATCT  
 2161 TGGGAAGAGC CCAAAGACCC TGGCGCTGCT GTTGTCTTAT GTCCATCGGA TGCAAAAGAA  
**30** 2221 TCTAAGGAAA CAGCCCCTGA AGAAGCTCAA GCGAGAAACC GTAAGGTCCT TCACCCTGTG  
 2281 GTCCTTACCG AGGAACTTAG CGAGCAACAG GTGCAGGTGG TTGAGGGTGA TCAGGATATG  
 2341 CCACTGGATT TGACTTGGCC AACCTTAACC GCTACGGCGA CCCCTGTTAG AGGGCCGGTA  
 2401 CCGACAATT TGAGCTCTGG CATTGGTGCC CAGCCCGCTA CCGTTCAAGA ACTCATCTG  
 2461 GCGAGGCCTG CACCCCGTCT TGTTGAGCGC TGTGGCACGG AGTCGAACGG CAGCAGTTCA  
**35** 2521 TTTCTGGATT TGCCTGACGT GCAGACCTCG GACCAGCCTT TAGACCTGTC CCTGGCCGCG  
 2581 TGGCCTGTAA GGGCTACCGC GTCTGACCCC GGTGATCC ACGGTAGGCG TGAGCCTGTC  
 2641 TTTGTGAAGC CTCGAGGTGT TTTCTCTGAT GGCGAGTCGG CCCTTCAGTT CGGAGAGCTT

ES 2 692 809 T3

2701 TCCGAAGCCA GTTCTGTCTG CGATGACCGG AAAAAAGAAG CTCCGGTGGT TGACGCCCCC  
 2761 ATCGATTTGA CAACTTCGAA CGAGACGCTC TCTGGGTCTG ACCCCTTTGA ATTCGCCAAA  
 2821 TTCAGGCGCC CGCGTTTCTC CGCGCAAGCT TTAATCGACC GAGGTGGTCC GCTTGCCGAT  
 2881 GTTCATGCAA AGATAAAGAG TCGGGTATAT GAACAATGCC TTCAAGCTTG TGAACCTGGT  
**5** 2941 AGTCGTGCGA CCCCAGCCAC CAAGAAGTGG CTCGACAAA TGTGGGACAG GGTGGACATG  
 3001 AAAACTTGGC GCTGCACCTC GCAGTTCCAA GCTGGTCACA TTCTTGAGTC CCTCAAATTC  
 3061 CTCCCTGACA TGATTCAAGA CACACCGCCT CCTGTCCCA GGAAGAACCG AGCTGGTGAC  
 3121 AGTGCCGGCC TGAAGCAACT GGTGGCGCAG TGGGATAGGA AATCGAGTGT GACACCCCC  
 3181 AAAAAACCGG TTGGACCGGT GCTTGACCAG GCCGTCCCTC TGCCTATGGA CATCCAGCAA  
**10** 3241 GGAGATGCCA TCTCCGCTGA CAAGCCACCC CATTTCGAAA ACCCTTCTAG TCAAGTAGAT  
 3301 GTGGGTGGAG GTTGAAAAAG TTTTATGCTC TCCGGCACCC GTTTCGCGGG GTCCGTTAGT  
 3361 CAGCGCCTTA CGACATGGGT TTTTGAGGTT CTCTCCCATC TCCCAGCTTT TATGCTCACA  
 3421 CTTTTCTCGC CACGGGGCTC TATGGCTCCA GGTGATTGGC TGTTTGCAGG TGCTGTTCTA  
 3481 CTTGCTCTCC TGCTCTGCCG TTCTTACCCA ATACTCGGAT GCCTTCCCTT ATTGGGTGTC  
**15** 3541 TTTTCTGGTT CTGTGCGGTG TGTTTCGTTT GGTGTTTTTG GTTCTTGAT GGCTTTTGCT  
 3601 GTATTTTTAT TCTCGACTCC ACCCGACCCA GTCGGTCTT CTTGTGACCA CGATTCGCCG  
 3661 GAGTGTGATG CTGAGCTTTT GGCTCTTGTG CAGCGCCAAC TTTGGGAACC TGTGCGCAGC  
 3721 CTTGTGGTGC GGCCATCGGG CCTCTTATGC GTCATTCTTG GCAAGTTACT CGGTGGGTCA  
 3781 CGTTGTCTCT GGTGTTGTTCT CCTACGTATA TGCATGCTCG CAGATTTGGC AATTTCTCTT  
**20** 3841 ATTTATGTGG TGTCCCAAGG GCGTTGTGAC AAGTGTGGG GAAAGTGTAT AAGGACGGCT  
 3901 CCTGCAGAAG TGGCCCTTAA TGTGTTTCTT TTTTCGCGCG CCACCCGCTC ATCTCTTGTG  
 3961 TCCTTGTGTG ATCGGTTCCA AGCGCCAAAA GGAGTTGACC CCGTGCCTT GGCACAGGC  
 4021 TGGCGCGGGT GCTGGTGTGG TGAGAGCCCT ATTCATCAAT CACACCAAAA ACCGATAGCT  
 4081 TATGCCAACT TGGATGAAAA GAAGATATCC GCCCAGACGG TGATTGCTGT CCCGTATGAT  
**25** 4141 CCTAGTCAGG CCATTAAATG CCTGAAAGTT TTGCAGGCAG GAGGGGCTAT TGTGGACCAG  
 4201 CCTACGCCCG AGGTGCTCCG TGTGCTGTAG ATTCCCTTCT CGGCCCATT TTTTCCGAAG  
 4261 GTCCCAGTCA ACCCAGACTG CAGGGTTGTG GTAGATTCGG ACACTTTTGT GGCTGCGGTC  
 4321 CGCTGCGGTT ATTCGACAGC ACAACTGGTC CTTGGTCGGG GCAACTTTGC CAAGCTAAAT  
 4381 CAGACCCCCC TCAGGAATC TGTCCCACC AAAACAACG GTGGGGCCTC ATACACCCTT  
**30** 4441 GCCGTGGCCC AGGTATCTGT GTGGACTCTT GTTCATTTCA TCCTCGGCCT TTGGTTAACG  
 4501 TCACCTCAAG TGTGTGGTCG AGGGACCTCT GACCCGTGGT GTTCGAACCC TTTTTCGTAT  
 4561 CCTACTTATG GCCCCGAGT TGTGTGTTCC TCTCGACTCT GCGTGTCTGC CGACGGAGTT  
 4621 ACCCTGCCAT TGTTCTCAGC CGTTGCCCAT CTTTCCGGTA GAGAGGTGGG GATTTTTATT  
 4681 TTGGTGCTTG CCTCCTTGGG CGCTTTAGCC CACCGCTTGG CTCTTAAGGC AGACATGTCA  
**35** 4741 ATGGTCTTTT TGGCGTTTTG TGCTTACGCC TGGCCATGA GCTCCTGGTT AATTTGCTTC  
 4801 TTTCTATGCT TCTTGAGGTG GGTAACCCTT CATCCTCTCA CTATGCTTTG GGTGCACTCA  
 4861 TTTTGGTGTG TTTGCCTACC AGCTGCCGGC GTTCTCTCGC TGGAATAAC CGGTCTTCTT

ES 2 692 809 T3

4921 TGGGCAGTTG GCCGTTTCAC CCAGGTTGCC GGAATTATCA CACCTTATGA CATCCACCAG  
 4981 TATACCTCCG GACCACGTGG TGCAGCTGCT GTAGCAACGG CTCCAGAAGG TACTTACATG  
 5041 GCGGCCGTTT GGAGAGCCGC TTTGACTGGA CGGACTTTGA TCTTCACACC ATCTGCAGTC  
 5101 GGATCCCTTC TTGAAGGTGC TTTCAGAAGT CAAAAGCCCT GCCTTAACAC CGTGAATGTC  
**5** 5161 GTAGGCTCTT CCCTTGGTTC TGGAGGAGTT TTCACCATTG ATGGCAGAAG AGTCATCGTC  
 5221 ACTGCCACCC ATGTGTTGAA TGGTAACACA GCCAGGGTCA CTGGTGATTC CTACAACCGC  
 5281 ATGCACACGT TCAATACTAA TGGTGATTAT GCCTGGTCCC ATGCTGATGA CTGGCAAGGC  
 5341 GTTGCCCTTA TGGTAAAGAT CGCTAAGGGG TATCGCGGTC GTGCCTACTG GCAAACGTCA  
 5401 ACCGGAGTCG AACCTGGCAT CATGGGGGAA GGATTCGCCT TCTGTTTCAC TAACTGTGGC  
**10** 5461 GACTCAGGGT CACCTGTCTT TTCAGAAGCT GGTGACCTTA TTGGAGTCCA TACCGGTTCA  
 5521 AACAACTCG GTTCTGGTCT TGTGACAACC CCTGAAGGGG AGACCTGCTC CATCAAGGAA  
 5581 ACTAGGCTCT CTGACCTTTC TAGACATTTT GCAGGTCCAA GCGTCCCTCT TGGGGACATT  
 5641 AAGTTGAGCC CAGCCATCAT CCCTGATGTG ACAACTATTC CGAGTGACTT GGCATCGCTC  
 5701 CTTGCTTCTG TCCCCGTGAT GGAAGGTGGC CTCTCAACTG TCCAGCTTTT GTGCGTCTTT  
**15** 5761 TTCCTTCTCT GGCATGATG GGGCCATGCC TGGACACCCA TTGTTGCCGT AGGCTTCTTT  
 5821 TTGCTGAATG AAATTCCTCC AGCAGTCTTG GTCCGAGCTG TGTTCTCTTT TGCACCTTTT  
 5881 GTACTTGATG GGGCCACCCC CTGGTCGGCA CAAGTGTGTA TGATTAGACT CCTCACGGCG  
 5941 GCTCTCAACC GCAACAGGTT GTCCCTGGCG TTCTACGCAT TCGGAGGTGT CGTTGGCCTG  
 6001 GCCACAGAAA TCGGGACTTT TGCTGGTGGG TGGCCTGAAC TGTCCCAAGC CCTCTCGACA  
**20** 6061 TACTGCTTCC TGCCCAGGTT CCTTGCTGTG ACTAGTTATG TCCCCACCAT CATCATCGGT  
 6121 GGGCTCCATG CCCTCGGCGT AATTTTGTGG TTATTCAAAT ACCGATGCCT CCACAACATG  
 6181 CTGGTTGGTG ATGGGAGTTT CTCAAGCGCT TTCTTCTTAC GGTATTTTGC TGAGGGTAAT  
 6241 CTTAGGAAAG GCGTGTGCGA GTCCTGTGGC ATGAATAACG AATCCCTGAC AGCTGCTTTG  
 6301 GCTTGCAAGT TGTCGCAAGC TGACCTTGAT TTTTTGTCCA GTTTAACGAA CTTCAAGTGC  
**25** 6361 TTTGTGTCCG CTTCAAACAT GAAAAATGCA GCTGGCCAAT ACATCGAGGC GGCATATGCT  
 6421 AGAGCTCTGC GTCAGGAGCT GGCCTCCTTG GTTCAGGTTG ACAAGATGAA AGGAGTATTG  
 6481 GCCAAGCTCG AGGCTTTCGC TGAGACGGCC ACTCCGTAC TTGACACAGG GGACGTGATT  
 6541 GTTCTGCTTG GGCAACACCC CCATGGATCC ATCCTCGACA TTAATGTGGG GGGTGAAGG  
 6601 AAAACTGTGT CTGTGCAAGA AACACGATGC CTGGGTGGTT CCAAATTCAG TGTCTGCACT  
**30** 6661 GTCGTGTCCA ACACGCCCGT GGATACCTTG ACCGGTATCC CACTTCAGAC GCCAACCCCA  
 6721 CTTTTTGAAA ATGGCCCCGG CCATCGCAGC GAGGACGACG ACCTCAAAGT TGAGAGAATG  
 6781 AAAAAACACT GTGTATCCCT CGGCTTCCAC AAAATCAATG GTAAAGTTTA CTGCAAAATT  
 6841 TGGGACAAGT CTAACGGCGA CACCTTTTAC ACGGATGATT CCCGATACAC TCAAGACCAT  
 6901 GCTTTTCAGG ACAGGTCAAC CGACTATAGA GACAGGGATT ATGAAGGTGT ACAGACCGCC  
**35** 6961 CCCCAACAGG GATTTCGATC AAAGTCCGAA GCCCCTGTTG GCACTGTTGT AATCGGTGGC  
 7021 ATTACGTATA ACAGGCATCT GGTCAAAGGT AAGGAGGTCC TAGTTCCCAA ACCTGACAAC  
 7081 TGCCTTGAAG CTGCCAGACT GTCCCTTGAG CAAGCTCTTG CTGGGATGGG CCAAACCTGT

ES 2 692 809 T3

7141 GACCTTACAG CTACCGAAGT GGAGAAACTA AAGCGCATCA TTAGTCAACT CCAAGGTCTG  
7201 ACCACTGAAC AGGCTTTAAA CTGCTAGCCG CCAGCGGCTT GACCCGCTGT GGCCGCGGCG  
7261 GCCTAGTTGT AACTGAAACG GCGGTAAAAA TCGTAAAATA CCACAGCAGA ACTTTACCT  
7321 TAGGCTCTTT AGACCTAAAA GTCACCTCCG AGGTGGAGGT GAAGAAATCA ACTGAGCAGG  
**5** 7381 GGCACGCTGT CGTGGCGAAC TTATGTTCCG GTGTCTCTT GATGAGGCCT CACCCACCGT  
7441 CCCTTGTTGA CGTTCTCCTC AAACCCGGAC TTGACACAAC ACCCGGCATT CAACCAGGGC  
7501 ATGGGGCCGG GAATATGGGC GTGAACGGTT CTATTTGGGA TTTTGAAACT GCACCCACAA  
7561 AGGTAGAACT AGAGTTGTCC AAGCAAATAA TCCAAGCATG TGAAGTCAGG CGCGGGGACG  
7621 CCCCTAACCT CCAACTCCCC TACAAGCTTT ATCCTGTCAG GGGGGACCCC GAGCGGCGTA  
**10** 7681 AAGGTCGCCT TGTCAACACT AGGTTTGGAG ATTTACCTTA CAAAACCTCC CAAGACACCA  
7741 AGTCCGCAAT TCATGCGGCT TGTTGCCTGC ATCCCAATGG GGTCTCTGTG TCTGATGGCA  
7801 AATCCACGCT GGGTACCACT CTTCAACATG GTTTCGAGCT TTATGTCCCC ACTGTACCTT  
7861 ATAGTGTCAT GGAATACCTT GATTCACGCC CTGACACCCC TTTTATGTGT ACTAAACATG  
7921 GCACTTCCAA GGCTGCTGCA GAGGACCTCC AAAAATATGA CCTATCCACT CAAGGGTTTG  
**15** 7981 TCTTGCCCTG GGTCTACGC CTAGTGC GCA GGTTCATCTT TAGCCATGTT GGTAAGGCGC  
8041 CACCACTGTT CCTTCCATCA ACCTACCCTG CCAAGAACTC CATGGCAGGG GTCAATGGCC  
8101 AGAGGTTCCC AACAAAGGAT GTCCAGAGCA TACCTGAAAT TGATGAAATG TGCGCCCGTG  
8161 CCGTCAAGGA AAATTGGCAG ACTGTGACAC CTTGCACCCT CAAAAACAG TACTGTTCCA  
8221 AACCTAAAC TAGAACCATC CTAGGTACCA ACAACTTCAT AGCCTTGGCT CACAGGTCAG  
**20** 8281 CACTCAGTGG TGTCACCCAG GCGTTCATGA AGAAGGCCTG GAAGTCCCCA ATTGCCCTTGG  
8341 GGAAAAACAA GTTTAAGGAA TTGCATTGCA CTGTGCGCCG CAGATGCCTT GAGGCTGACC  
8401 TGGCTTCCTG CGATCGCAGC ACCCCCGCCA TTGTGAGGTG GTTTGTTGCC AACCTCCTGT  
8461 ATGAACTTGC AGGATGTGAA GAGTACTTGC CTAGCTACGT GCTCAACTGT TGCCATGACC  
8521 TTGTGGCAAC GCAGGATGGC GCTTTCACAA AACGCGGTGG CCTGTCTGTC GGGGACCCCG  
**25** 8581 TCACCAGTGT GTCCAACACC GTCTACTCAC TGATAATTTA CGCCCAGCAC ATGGTGCTTT  
8641 CGGCCTTGAA GATGGGTCAT GAAATTGGTC TCAAGTTCCT TGAGGAACAG CTCAAATTTG  
8701 AGGACCTTCT TGAAATCCAG CCCATGTTAG TGTATTCTGA TGACCTCGTC TTGTATGCGG  
8761 AAAGACCCAC TTTTCCCAAC TACCATTGGT GGGTCGAGCA TCTTGACCTG ATGTTGGGCT  
8821 TTAAAACGGA CCCAAAGAAA ACTGTCATAA CTGATAAACC CAGTTTTCTC GGCTGCAGAA  
**30** 8881 TTGAAGCAGG ACGGCAGTTA GTCCCAATC GCGACCGTAT TCTGGCTGCT CTTGCATATC  
8941 ATATGAAGGC GCAGAACGCC TCAGAGTATT ATGCGTCCGC TGCCGCAATT CTGATGGATT  
9001 CGTGTGCTTG CATTGACCAT GACCCCGAGT GGTATGAGGA TCTTATCTGC GGCATCGCCC  
9061 GGTGTGCTCG CCAGGACGGT TACCGTTTTC CAGGCCCGGC ATTTTTTCATG TCCATGTGGG  
9121 AGAAGCTGAA AAGTCATAAT GAAGGGAAGA AATGCCGTCA CTGCGGCATC TGCGACGCCA  
**35** 9181 AAGCCGACTA TGCGTCCGCC TGTGGACTTG ATTTGTGTTT GTTCCATTCA CACTTTCATC  
9241 AACACTGCCC AGTCACTCTG AGCTGTGGCC ACCATGCCGG TTCAAAGGAA TGTTCCGAGT  
9301 GTCAGTCACC TGTCGGGGCT GGCAAATCCC CCCTTGACGC TGTGCTGAAA CAAATCCCGT

ES 2 692 809 T3

9361 ACAAACCTCC TCGTACCATT ATCATGAAGG TGGACAACAA AACAAACGACC CTTGACCCGG  
 9421 GAAGATATCA GTCCCGTCGA GGTCTTGTG CAGTCAAAAG AGGTATTGCA GGTAATGAGG  
 9481 TTGATCTTTC TGATGGAGAC TACCAAGTGG TGCCTCTTTT GCCGACTTGC AAAGACATAA  
 9541 ACATGGTGAA GGTGGCTTGC AACGTACTAC TCAGCAAGTT TATAGTAGGG CCGCCAGGTT  
**5** 9601 CCGGAAAAAC CACCTGGCTA CTGAACCAAG TCCAGGACGA TGATGTCATT TACACACCTA  
 9661 CTCATCAGAC AATGTTTGAC ATAGTCAGTG CTCTTAAAGT TTGCAGGTAT TCCATCCCAG  
 9721 GAGCCTCAGG ACTCCCTTTT CCACCACCTG CCAGGTCCGG GCCGTGGGTT AGGCTCATCG  
 9781 CCAGCGGACA TGTCCCTGGC CGAGTGTGAT ATCTCGATGA GGCAGGATAT TGCAATCATC  
 9841 TAGACATTCT AAGGCTGCTT TCCAAAACAC CCCTTGTGTG TTTGGGTGAC CTTTACGCAAC  
**10** 9901 TTCACCCGGT CGGCTTTGAT TCCTATTGTT ATGTGTTTGA TCAGATGCCT CAGAAGCAGC  
 9961 TGACCACCAT TTATAGATTT GGCCCTAACA TCTGTGCAGC CATCCAGCCT TGTTACAGGG  
 10021 AGAAACTTGA ATCCAAGGCC AGGAACACCA GAGTGGTTTT CACCACCCGG CCTGTGGCCT  
 10081 TTGGTCAGGT CCTGACACCG TACCACAAAG ATCGTACCGG CTCTGCAATA ACTATAGATT  
 10141 CATCCCAGGG GGCACCTTC GACATTGTGA CATTGCATCT ACCATCGCCA AAGTCCCTAA  
**15** 10201 ACAAATCCCG AGCACTTGTA GCCATCACTC GGGCAAGACA TGGGTTGTTC ATTTATGACC  
 10261 CTCATGACCA ACTCCAGGAG TTTTTCAACT TAACCCCGA GCGCACTGAT TGTAACCTTG  
 10321 CGTTCAGCCG TGGGGATGAG CTGGTTGTTT TGAATGTGGA TAATGCGGTC ACAACTGTAG  
 10381 CGAAGGCCCT AGAGACAGGT TCACCCCGAT TTCGAGTATC GGACCCGAGG TGCAAGTCTC  
 10441 TCTTAGCCGC TTGTTCCGCC AGTCTAGAAG GGAGCTGCAT GCCACTACCA CAAGTAGCAC  
**20** 10501 ATAACCTGGG GTTTTACTTT TCCCCGACA GCCCAGCTTT TGCACCCCTG CCAAAGAGC  
 10561 TGGCGCCACA TTGGCCAGTG GTCACCCACC AGAATAATCG AGCGTGGCCT GATCGACTTG  
 10621 TCGCTAGTAT GCGCCCAATT GATGCCCGCT ACAGCAAGCC AATGGTCGGT GCAGGGTATG  
 10681 TGGTCGGGCC ATCCATTTTT CTTGGCACTC CTGGTGTGGT GTCATACTAT CTCACATTAT  
 10741 ACATCGGGGG CGAGCCTCAG GCCCTGCCAG AAACACTCGT TTCAACAGGA CGTATAGCCA  
**25** 10801 CAGATTGTGCG GGAATATCTC GACGCGGCTG AGGAAGAGGC AGCGAGAGAA CTTCCCCACG  
 10861 CATTATTTGG CGATGTCAA GGCACACGTA TCGGGGGGTG TCACCACATT ACATCGAAAT  
 10921 ACCTACCTAG GTCCCTGCCT AAAGACTCTG TTGCTGTGGT TGGGGTGAGT TCGCCCGGTA  
 10981 GGGCTGCTAA AGCCGTGTGC ACTCTCACCG ATGTGTACCT CCCCAGACTC CGACCATATT  
 11041 TGCAACCGGA GACGGCATCA AAATGCTGGA AACTTAACT GGATTTCAGG GATGTTTCGAC  
**30** 11101 TGATGGTCTG GAAAGCGGCC ACAGCCTATT TCCAGTTGGA AGGGCTGACA TGGTCAGCGC  
 11161 TGCCCGATTA TGCTAGGTTT ATTCAGCTAC CCAAGGATGC CGTTGTGTAC ATCGATCCGT  
 11221 GTATAGGGCC GGCAACAGCC AATCGCAAGG TTGTGCGAAC CACAGACTGG CGGGCCGACC  
 11281 TGGCAGTGAC ACCGTATGAT TACGGTGCTC AGGTCATTTT GACAACAGCC TGGTTCGAGG  
 11341 ACCTTGGGCC GCAGTGAAG ATTTTGGGGT TGCAGCCTTT CAGACGAACA TTTGGCTTTG  
**35** 11401 AGAACACTGA AGATTGGGCA ATTCTCGCAC GCCGTATGAA TGACGGCAA GATTACACTG  
 11461 ACTATAATTG GCATTGTGTA CGAGAACGCC CACACGCAAT TTACGGGCGC GCCCGTGACC  
 11521 ATACGTATCA TTTTGCCTT GGCACCTAAC TGCAAGTAGA GCTGGGCAGA CCCCAGGCTG

ES 2 692 809 T3

11581 CTCCTGAGCA AGTGCCGTGA ACGCGGAGTG ATGCAATGGG TTTACTGTGG AGTAAAATCA  
 11641 GTCAGTTGTT CGTGGATGCC TTCACTGAGT TCCTTGTTAG TGTGGTTGAC ATTGTCATCT  
 11701 TTCTCGCCAT ATTGTTTGGG TTCACTGTTG CAGGCTGGTT ATTGGTCTTC CTTCTCAGAG  
 11761 TGGTTTGCTC CGCGTTTCTC CGTTCGCGCT CTGCCATTCA CTCTTCCGAA CTATCGAAGG  
**5** 11821 TCCTATGAGG GCTTGCTACC CAACTGCAGA CCGGATGTCC CACAATTCGC AGTTAAGCAC  
 11881 CCGTTGGGTA TACTTTGGCA TATGCGAGTC TCCACCTAA TTGACGAAAT GGTCTCTCGC  
 11941 CGCATTTACC GGACCATGGA ACATTCGGGT CAAGCGGCCT GGAAGCAGGT TGTTAGTGAA  
 12001 GCCACTCTCA CAAAACCTGC AAGGCTTGAC GTAGTCACTC ATTTCCAACA CCTGGCCGCA  
 12061 GTGGAGGCTG ATTCTTGCCG CTTCTTAGC TCACGACTCG CGATGCTGAA AAACCTTGCC  
**10** 12121 GTTGGCAATG TGAGCCTGGA GTACAACACT ACTTTGGACC GCGTTGAGCT CATCTTTCCC  
 12181 ACACCAGGTA CGAGGCCCAA GTTGACCGAT TTTAGGCAAT GGCTTATCAG CGTGCACGCT  
 12241 TCCATCTTCT CCTCTGTGGC TTCGTCTGTT ACCTTGTTCA CAGTGCTTTG GCTTCGAATT  
 12301 CCAGCTCTAC GCTATGTTTT TGGTTTCCAT TGGCCCACGG CAACACATCA TTCGAACTAA  
 12361 CTATCAATTA CACTATATGT AAGCCATGCC CTACCAGTCA AGCTGCCCAA CAAAGACTCG  
**15** 12421 AGCCTGGCCG TAACGTGTGG TGCAAAATAG GGCACGACAG GTGTGAGGAA CGTGACCATG  
 12481 ATGAGTTGTC AATGTCCATT CCGTCCGGT ACGACAACCT CAAACTTGAG GGTTATTATG  
 12541 CTTGGCTGGC TTTTTTGTCC TTTTCTACG CGGCCCAATT CCATCCGGAG CTGTTCCGAA  
 12601 TAGGAAACGT GTCGCGCGTC TTTGTGGATA AGCGACACCA GTTCATTTGC GCCGAGCATG  
 12661 ATGGACAAAA TTCAACCATA TCTGCCAGAC ACAACATCTC CGCGTCGTAT GCGGTGTATF  
**20** 12721 ACCATCATCA AATAGACGGG GGCAATTGGT TTCATTTGGA ATGGCTGCGA CCATTCTTTT  
 12781 CCTCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT  
 12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCCT  
 12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT  
 12961 CAGGAGGTCG TCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAACGGC  
**25** 13021 TAATGTGACC GATGAATCGT ATTTGTACAA CGCGGACTTG CTGATGCTTT CCGCGTGCCT  
 13081 TTTCTACGCC TCGGAAATGA GCGAGAAAG CTTCAAAGTC ATCTTTGGGA ATATTTCTGG  
 13141 CGTTGTTTCC GCTTGTGTTA ATTTACAGA TTATGTGGCC CATGTGACCC AACACACTCA  
 13201 GCAGCACCAT TTGTAATTG ATCACATTCG GTTACTACAC TTCTTGACAC CGTCTACGAT  
 13261 GAGGTGGGCT ACAACCATTG CTTGTTTGCT TGCCATTCTT TTGGCGGTAT GAAATGTTCT  
**30** 13321 TGCAAGTTGG GGCATTTCTT GACTCCTCAC TCTTGCTTCT GGTGGCTTTT TTTGCTGTGT  
 13381 ACCGGCTTGT CTTGGTCCTT TGTCGATGGC AACGACGACA GCTCGACATC CCAATACATA  
 13441 TATAATTTGA CGATATGCGA GCTGAATGGG ACCGAATGGT TGTCCGGTCA TTTTGATTGG  
 13501 GCAGTCGAAA CCTTTGTGCT TTACCCAGTT GCCACTCATA TCATTTCACT GGGTTTTCTC  
 13561 ACAACAAGCC ATTTCTTGA TGCGCTCGGT CTCGGCGCTG TGTCCGCCAC AGGATTCATT  
**35** 13621 GGCGAGCGGT ATGTACTTAG CAGCATGTAC GGCGTTTGGC CCTTCGCGGC GTTCGTATGT  
 13681 TTTGTATCC GTGCTGCTAA AAATTGCATG GCTTGCCGCT ATGCCCGCAC CCGTTTTACC  
 13741 AACTTCATCG TGGACGACCG GGGAAGAATC CATCGATGGA AGTCTTCAAT AGTGGTGGAG

ES 2 692 809 T3

13801 AAATTGGGCA AAGCTGAAGT CGGTGGTGAC CTTGTCAACA TTAAGCATGT TGTCCTCGAA  
13861 GGGGTAAAG CTCAACCTTT GACGAGGACT TCGGCTGAGC AATGGGAAGC CTAGACGACT  
13921 TTTGCAACGA TCCCACCGCC GCACAAAAAC TCGTGCTGGC CTTTAGCATC ACATATACAC  
13981 CCATAATGAT ATACGCCCTT AAGGTGTAC GCGGCCGACT CCTGGGGCTG TTGCACATCT  
5 14041 TGATATTTCT GAATTGTTCC TTTACTTTTG GGTACATGAC ATATGTGCAT TTTCAATCCA  
14101 CCAACCGTGT CGCATTCACT CTGGGGGCTG TAGTCGCCCT TTTGTGGGGT GTTTACAGCC  
14161 TCACAGAGTC ATGGAAGTTC ATCACTTCCA GATGCAGATT GTGTTGCCTA GGCCGGCGAT  
14221 ACATTCTGGC CCCTGCCCAT CACGTAGAAA GTGCTGCAGG CCTCCATTCA ATCCCAGCGT  
14281 CTGGTAACCG AGCATAAGCT GTGAGAAAAG CCGGACTAAC ATCAGTGAAC GGCCTCTAG  
10 14341 TACCTGGGCT TCGGAGCCTC GTGCTGGGCG GCAAACGAGC TGTTAAACGA GGAGTGGTTA  
14401 ACCTCGTCAA GTATGGCCGG TAAGAACCAG AGCCAGAAGA AAAGAAGAAA TGCAGCTCCG  
14461 ATGGGGAAAG GCCAGCCAGT CAATCAACTG TGCCAGTTGC TGGGTACAAT GATAAAGTCC  
14521 CAGCGCCAGC AATCTAGGGG AGGACAGGCC AAAAAGAAGA AGCCTGAGAA GCCACATTTT  
14581 CCCCTAGCTG CTGAAGATGA CATTCCGGCAC CATCTCACCC AGGCCGAACG TTCCCTCTGC  
15 14641 TTGCAATCGA TCCAGACGGC TTTCAATCAA GCGCAGGAA CTGCGTCTGCT TTCATCCAGC  
14701 GGAAGGTCA GTTTCAGGT TGAGTTCATG CTGCCGGTTG CTCATACAGT GCGCCTGATT  
14761 CGCGTGACTT CTACATCCGC CAGTCAGGT GCAAATTAAT TTGACAGTCA GGTGAATGGC  
14821 CGCGATTGAC GTGTGGCCTC TAA

20 SEQ ID NO: 2: ORF 1a DEL MSV 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 178...7227

MMSGMFSRCMCTPAARVFNAGQVYCTRCLRSARLLSPELQDLDLAVGLFHKPKDKLHWKVPPIGIPQVECSPSGCC  
WLSTIFPLARMTSGNHNLQRLVKVADVLYRDGCLTPRHLRELQVYERGCNWWYPITGPVPGMAVYANSMHVSDQPF  
PGATHVLTNSPLPQRACRQFPFCFEEAHSSIRWEKVFIFMDSDDGRSRMMWTPESDDSTALEVLPPELEHQVKVL  
25 VRSFPAHHLVDLADWELTESPDNGFSFSTSHPCGYLVRDPAVSEGKWCWLSFCSQSAEVLRSREAHLATAYGYQTKW  
GVPKYIQRRLQVHGLRAVVDPDGPIHVEALSCPQSWIRHLTLNDDVTPGFVRLMSLRIVPNTPTTHRIFRFGVHKW  
YGAAGKRARGKRAAKSEKDSASTLKVARPTSTSGIVTYSPPADGSCGWHALAILNRMINNDFTSPLPRYNRPEDDW  
ASDGDLAQAIQCLQPLAAIARNRACPNAYLIKLNQVHVEVEVRPGMAPRSLRSRECVVGCSEGCVASPYPEDGLPK  
RALEALASAYRLPSCVCDGIIDFLANPPPQEFWTLDKMLTSPSPEQSGFSSLYKLLLEILPQKCGSTEGEFYITVERM  
LKDCPSSKQAMALLAKIKVPSSKAPSVTLNECFPTDVPVNSSELISWEEPKDPGAAVLCPSDAKESKETAPEEAQARN  
30 RKVLHPVVLTEELSEQQVQVVEGDQDMPDLTLTWPTLTATATPVRGPVDPNLSSGIGAQPATVQELILARPAPRLVERC  
GTESNGSSSFLDLPDVQTSQDPLDLSLAAWPVRATASDPGWIHGRREPVFVKPRGVFSDGESALQFGESEASSV  
DDRTKEAPVVDAPIDLTTSNETLSGSDPFEFKFRPRFSAQALIDRGGPLADVHAKIKSRVYEQCLQACEPGSRATP  
ATKKWLDKMWDRVDMKTWRCTSQFQAGHILESFLPDMIQDTPPPVPRKNRAGDSAGLKQLVAQWDRKSSVTPP  
TKPVGPVLDQAVPLPMDIQQGDASADKPPHSQNPSSQVDVGGGWKSFMLSGTRFAGSVSQRLLTTWVFEVLSHLPA  
35 FMLTLFSPRGSMAPGDWLFAGAVLLALLCRSYPILGCLPLLGVFSGSVRCVRLGVFGSWMAFAVFLFSTPPDPVGS  
SCDHDSPECHAELLALEQRQLWEPVRSLVVGPSGLLCVILGKLLGGSRCCLWFVLLRICMLADLAISLIYVVSQGRCHK  
CWGKCIRTAPAEVALNVFPFRATRSSLVSLCDRFQAPKGVDPVHLATGWRGCWCGESPIHQSHQKPIAYANLDEK  
KISAQTVIAPYDPSQAIKCLKVLQAGGAIVDQPTPEVVRVSEIPFSAPFFPKVPVNPDCRVVVDSDTFVAAVRCGYST  
AQLVLGRGNFAKLNQTPLRNSVPTKTTGGASYTLAVAQVSVWTLVHFILGLWLTSPQVCGRGTSDPWCSNPFYSPTY  
40 GPGVVCSSRLCVSADGVTLPFSAVAHLSGREVGIFILVLAASLALAHRLALKADMSMVLAFCAYAWPMSSWLICFF  
PMLLRWVTLHPLTMLWVHSFLVFLCPAAGVLSLGITGLLWAVGRFTQVAGIITPYDIHQYTSGPRGAAAVATAPEGTY  
MAAVRRAALTGRTLIFTPSAVGSLLGAFRTQKPCLNTVNVGSSLSGGVFTIDGRRVIVTATHVNLNGNTARVTDGS  
YNRMHTFNTNGDYAWSHADDWQGVAPMVKIAKGYRGRAYWQTSTGVEPGIMGEGFAFCFTNCGDSGSPVISEAG  
DLIGVHTGSNKLGSGLVTTPEGETCSIKETRLSDLSRHFAGPSVPLGDIKLSAIPDVTITPSDLASLLASVPMMEGGLS  
45 TVQLLCVFFLLWRMMGHAWTPIVAVGFFLLNEILPAVLVRAVFSFALFVLAWATPWSAQVLMIRLLTAALNRNRLSLAF  
YAFGGVVGLATEIGTFAGGWPELSQALSTYCFRFLAVTSYVPTIIIGLHALGVILWLFKYRCLHNMLVGDGSSFA  
FFLRIFAENLRKGVSSQCGMNNESLTAALACKLSQADLDFLSSLTNFKCFVSASNMKNAAGQYIEAAYARALRQEL  
ASLVQVDKMKGVLAKEAFAETATPSLDTGDVIVLLGQHPHGSILDINVGGERKTVSVQETRCLGGSKFSVCTVVSNT  
PVDTLTGIPLQTPPLFENGPRHRSEDDDLKVERMCKKHCVSLGFHKINGKVYCKIWDKSNGDFTYDSDSRYTQDHAF  
50 QDRSTDYRDRDYEGVQTAPQQGDFPKSEAPVGTVIGGITYNRHLVKGKEVLVLPKPDNACLEARLSLEQALAGMGQ  
TCDLTATEVEKLRKRIISLQQLTTEQALNC



ES 2 692 809 T3

SEQ ID NO:3 ORF 1B DEL MSV 94881 CODIFICADO POR SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 7209...11600

5 TGFKLLAASGLTRCGRGGLVVTETAVKIVKYHSRTFTLGSLLDKVTSEVEVKKSTEQGHAVVANLCSGVVLMRPHPPS  
LVDVLLKPGLDTPGIQPGHGAGNMGVNGSIWDFETAPTKELELSKQIIQACEVRRGDAPNLQLPYKLYPVRGDPER  
RKGRLVNTRFGDLPYKTPQDTKSAIHAACCLHPNGVLVSDGKSTLGTTLQHGFELYVPTVPYSVMEYLDSPDTPFM  
CTKHGTSKAAAEDLQKYDLSTQGFVLPVLRRLVRRFIFSHVGKAPPLFLPSTYPAKNSMAGVNGQRFPTKDVQSIPEI  
DEMCAVAVKENWQTVTPCTLKKQYCSKPKTRTILGTNNFIALAHRALSQVTAQFMKKAWKSPIALGKNKFKELHCTV  
10 AGRCLEADLASC DRSTPAIVRWFVANLLYELAGCEEYLP SYVLNCC HDLVATQDGAFTKRGG LSSGDPVTSVSNTVY  
SLIYAQHMVLSALKMGHEIGLKFLEEQLKFEDLLEIQPMLVYSDDLVLYAERPTFPNYHWWVEHLDLMLGFKTDPKKT  
VITDKPSFLGCRIEAGRQLVPNRDRILAALAYHMKQAQNASEYYASAAAAILMDSACIDHDPEWYEDLICGIARCARQDG  
YRFPGPAFFMSMWEKLSHNEGKCRHCGICDAKADYASACGLDLCLFHSFHQHCPTVLSGHHAGSKECSQCQ  
SPVAGSPLDAVLKIPYKPPRTIIMKVDNKTTTTLDPGRYQSRRGLVAVKRGIAAGNEVDLSGDYQVVP LLPTCKDIN  
MVKVACNVLLSKFIVGPPGSGKTTWLLNQVQDDDDVIYTPHQTMFDIVSALKVCRY SIPGASGLPFP PPARSGPWVRL  
IASGHVPGRVSYLDEAGYCNHLDILRLLSKTPLVCLGDLQQLHPVGFDSYCYVFDQMPQKQLTTIYRFGPNICAAIQPC  
15 YREKLESKARNTRVVFTTRPVAFGQVLPYHKDRGTGSAITDSSQGATFDIVTLHLPSPKSLNKSALVAITRARHGLFI  
YDPHDQLQEFFNLTPERTDCNLAFSRGDELVLNVDNAVTTVAKALETGSPRFRVSDPRCKSLLAACSASLEGSCMP  
LPQVAHNLGIFYFSPDPAFAPLPKELAPHWPVVTHQNNRAWPDRLVASM RPIDARYSKPMV GAGYVVGPSIFLGT  
GVVSYLLTYIGGEPQALPETLVSTGRIATDCREYLDAAEEEAARELPHAFIGDVKGTTIGGCHHITSKYLP RSLPKDSV  
AVVGSSPGRAAKAVCTLDVYLP ELPYLPETASKCWKLKDFRDVRLMVWKGATAYFQLEGLTWSALPDYARFI  
20 QLPKDAVVYIDPCIGPATANRKVVRTTDWRADLAVTPYDYGAQVILTTAWFEDLGPQWKILGLQPFRTFGFENTED  
WAILARRMNDGKDYTDYNWHCVRERPHAIYGRARDHTYHFALGTELQVELGRPRLPPEQVP

SEQ ID NO:4 ORF 2 DEL MSV 94881 CODIFICADO POR SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 11611...12360

25 MQWVYCGVKS SVCSWMPSSLSSLLVWLT LSSFSYPYCLG SLLQAGYWSS FSEWFAPRFSVRALPFTLPNYRRSYEGLL  
PNCRPDVPQFAVKHPLGILWHMRVSHLIDEMVSRRIYRTMEHSGQA AWKQV VSEATLTKLSRLD VVTHFQH LA AVEA  
DSCRFLSSRLAMLKNLAVGNVSLEYNTTLD RVELIFPTPGTRPKLTD FRQWLISVHASIFSSVASSVTLFTVLWLRIPAL  
RYVFGFHWP TATHHSN

SEQ ID NO:5 ORF 3 DEL MSV 94881 CODIFICADO POR SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 12219...13016

30 MAYQRRARFHLLLCGFVCYLVHSALASNSSSTLCFWFPLAHGNTSFELTINYTICKPCPTSQAAQQRLEPGRNVWCKIG  
HDRCEERDHDLSMSIPSGYDNLKLEGYYAWLAFLSFSYAAQFHP ELPFGIGNVSRV FVDKRHQFICAEHDGQNSTISA  
RHNISASYAVYYHHQIDGGNWFHLEWLRPFSSWLVLNISWFLRRSPASPARRIYQILRPTRPRLPVSWSFRTSIVS  
NLTGPQQRKVPLPSGGRPNVVKPSAFPSTSR

SEQ ID NO:6 ORF 4 DEL MSV 94881 CODIFICADO POR SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 12761...13312

35 MAATILFLLAGAHLMVSEAFACKPCFSTHLSDIKNTTAAAGFMVLQ NINCFQSHRASTAQGTTP LRRSSQCREAVGI  
PQYITITANVTDES YLYNADLLMLSACLFYASEMSEKGFVIFGNISGVVSACVNF TDYVAHV TQHTQQHHLVIDHIRLL  
HFLTPSTMRWATTIACLLAILLAV

SEQ ID NO:7 ORF 5 DEL MSV 94881 CODIFICADO POR SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 13309...13914

40 MKCSCKLGHFLTPHSCFWWLFLLCTGLSWSFVDGNDDSSSTSQYIYNLTICELNGTEWLSGHFDWAVETFVLYPVATH  
IISLGFLTTS HFLDALGLGAVSATGFIGERYV LSSMYGVCFAAFVCFVIRA AKNCMACRYARTRFTNFIVDDRGRRIHR  
WKSSIVVEKLGKAEVGGDLVNIKHVVLEGVKAQPLTRTSAEQWEA

SEQ ID NO:8 ORF 6 DEL MSV 94881 CODIFICADO POR SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 13902...14423

45 MGSLLDDFCNDPTAAQKLVLAFSITYTPIMIYALKVSRGRLLG LLHILIFLNC SFTFGYMTYVHFQSTNRVAFTLGAVVALL  
WGVYSLTESWKFITSRCLCCLGRRYILAPAHHVESAAGLHSIPASGNRAYAVRKPGLT SVNGTLVPGLRSLVLGGKR  
AVKRGVVNLVYKGR

SEQ ID NO:9 ORF 7 DEL MSV 94881 CODIFICADO POR SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 14413...14799

50 MAGKNQSQKKRRNAAPMGKQPVNQLCQLLGTMIKSQRQQSRGGQAKKKKPEKPHFLAAEDDIRHHLTQAERSL  
CLQSIQTAFNQGAGTASLSSSGKVSFQVEFMLPVAHTVRLIRVTSTASQGAN

SEQ ID NO:10 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE LA CEPA DEL PRRS PARENTAL 94881

ES 2 692 809 T3

1 TTTGTGTACC TTGGAGGCGT GGGTACAGCC CTGCCCCACC CCTTGGCCCC TGTTCTAGCC  
 61 CGACAGGTAC CCTTCTCTCT CGGGGCGAGC GCGCCGCCTG CTGCTCCCTT GCGGCGGGAA  
 121 GGACCTCCCG AGTATTTCCG GAGAGCACCT GCTTTACGGG ATCTCCGCC TTTAACCATG  
 181 TCTGGGATGT TCTCCCGGTG CATGTGCACC CCGGCTGCCC GGGTATTTTG GAACGCCGGC  
**5** 241 CAAGTCTATT GCACACGGTG TCTCAGTGCA CGGTCTCTTC TCTCTCCAGA ACTTCAGGAC  
 301 ACGGACCTCG GTGCAGTTGG CTTGTTTCAC AAGCCTAAAG ACAAGCTCCA TTGGAAAGTT  
 361 CCCATTGGTA TCCCCAGGT GGAATGTCTT CCATCTGGGT GTTGCTGGCT GTCAACCATT  
 421 TTTCTTTTAG CGCGCATGAC CTCCGGCAAT CACAACCTCC TTCAACGACT CGTGAAGGTT  
 481 GCTGACGTAT TGTACCGTGA CGGTTGCTTA ACCCCTAGAC ACCTCCGTGA ACTCCAAGTT  
**10** 541 TACGAGCGTG GTTGCAATTG GTATCCGATT ACGGGGCCTG TGCCTGGGAT GGCTGTGTAC  
 601 GCGAACTCCA TGCACGTGTC CGACCAACCG TTCCCTGGTG CCACTCATGT GTTAACAAAT  
 661 TCCCCTTTGC CTCAACGGGC TTGTCGGCAG CCGTTCTGTC CGTTCGAAGA GGCCCATTCT  
 721 AGCATATACA GGTGGGAAAA ATTTGTAATT TTTATGGATT CCTCCTCCGA CGGTGATCT  
 781 CGCATGATGT GGA CTCCGGA ATCCGATGAC TCCACGGCTT TGGAAGTTCT GCCGCCGAG  
**15** 841 CTAGAACC AGGTCAAGGT CCTTGTTCCG AGCTTTCCCG CCCATCACCT TGTCGACCTT  
 901 GCCGATTGGG AGCTCACTGA GTCCCCGAG AACGGTTTTT CCTTCAGCAC GTCACATCCT  
 961 TGCGGCTACC TTGTTCCGGA CCCGGCTGTA TCCGAAGGCA AGTGTTGGCT TTCCTGCTTT  
 1021 TTGAGCCAGT CAGCCGAAGT GCTCAGTCGC GAGGCGCATC TGGCTACCGC CTATGGTTAC  
 1081 CAAACCAAGT GGGGTGTGCC TGGCAAGTAC ATCCAGCGCA GACTTCAAGT TCACGGTCTC  
**20** 1141 CGTGCTGTGG TCGACCCTGA TGGTCCCATT CACGTTGAAG CATTGTCTTG CCCCAGTCT  
 1201 TGGATCAGGC ACTTGACCCT GAATGATGAT GTCACCCCGG GATTTCGTTG CCTAATGTCT  
 1261 CTTGCGATTG TGCCGAACAC AGAGCCTACC ACACACCGGA TCTTTCGTTT TGGAGTGCAC  
 1321 AAGTGGTATG GTGCCGCCGG CAAACGGGCC CGTGGCAAGC GTGCCGCCAA AAGTGAGAAA  
 1381 GACTCGGCTT CCACCCTCAA GGTTGCCCGA CCGACTTCCA CCAGTGAAT CGTCACCTAC  
**25** 1441 TCCCCACCTG CGGACGGGTC TTGTGGTTGG CATGCCCTTG CCGCCATACT GAACCGGATG  
 1501 ATTAATAATG ACTTCACGTC CCCTCTGCCT CCGTACAACA GGCCGGAGGA CGATTGGGCT  
 1561 TCTGATGGTG ACCTTGCTCA GGCCATTCAA TGTTTGCAAC TACCTGCCGC CATAGCTCGG  
 1621 AACC GCGCCT GCCCTAACGC CAAATACCTC GTAAACTCA ACGGAGTTCA TTGGGAGGTA  
 1681 GAGGTGAGGC CTGGAATGGC TCCTCGCTCC CTCTCTCGTG AGTGCGTTGT TGGCGTCTGC  
**30** 1741 TCTGAAGGCT GTGTGCGCTC GCCTTACCCG GAGGACGGGT TGCCTAAACG TGCACTTGAG  
 1801 GCCCTGGCGT CTGCTTATAG ACTGCCTTCA GACTGTGTTT GTGATGGTAT TATTGACTTC  
 1861 CTTGCCAATC CACCTCCCCA GGAGTTCTGG ACTCTTGACA AAATGTTGAC TTCCCCGTC  
 1921 CCGGAGCAGT CCGGCTTCTC TAGTCTGTAT AAATTGTTGT TAGAGGTCTT GCCGCAGAAA  
 1981 TGCGGATCCA CAGAAGGGGA ATTCATCTAT ACTGTTGAGA GGATGTTGAA GGATTGTCCG  
**35** 2041 AGCTCCAAAC AGGCCATGGC CCTCCTTGCA AAAATTAAGG TCCCATCCTC AAAGGCCCCA  
 2101 TCCGTGACTC TGAACGAGTG CTTCCCCACG GATGTTCCAG TCAACTCTGA GTTAATATCT  
 2161 TGGGAAGAGC CCAAAGACCC TGGCGCTGCT GTTGTCCTAT GTCCATCGGA TGCAAAAGAA

ES 2 692 809 T3

2221 TCTAAGGAAA CAGCCCCTGA AGAAGCTCAA GCGAGAAACC GTAAGGTCCT CCACCCTGTG  
 2281 GTCCTTACCG AGGAACTTAG CGAGCAACAG GTGCAGGTGG TTGAGGGTGA TCAGGATATG  
 2341 CCACTGGATT TGACTTGGCC AACCTTAACC GCTACGGCGA CCCCTGTTAG AGGGCCGGTA  
 2401 CCGGACAATT TGAGCTCTGG CATTGGTGCC CAGCCCCTA CCGTTCAAGA ACTCATTTCTG  
**5** 2461 GCGAGGCCTG CACCCCGTCT TGTTGAGCGC TGTGGCACGG AGTCGAACGG CAGCAGTTCA  
 2521 TTTCTGGATT TGCCTGACGT GCAGACCTCG GACCAGCCTT TAGACCTGTC CCTGGCCGCG  
 2581 TGGCCTGTAA GGGCTACCGC GTCTGACCCC GGTGGATCC ACGGTAGGCG TGAGCCTGTC  
 2641 TTTGTGAAGC CTCGAGGTGT TTTCTCTGAT GCGGAGTCGG CCCTTCAGTT CGGAGAGCTT  
 2701 TCCGAAGCCA GTTCTGTCGT CGATGACCGG ACAAAGAAG CTCCGGTGGT TGACGCCCCC  
**10** 2761 ATCGATTTGA CAACTTCGAA CGAGACGCTC TCTGGGTCTG ACCCCTTTGA ATTCGCCAAA  
 2821 TTCAGGCGCC CGCGTTTCTC CGCGCAAGCT TTAATCGACC GAGGTGGTCC GCTTGCCGAT  
 2881 GTTCATGCAA AGATAAAGAG TCGGGTATAT GAACAATGCC TTCAAGCTTG TGAACCTGGT  
 2941 AGTCGTGCGA CCCCAGCCAC CAAGAAGTGG CTCGACAAAA TGTGGGACAG GGTGGACATG  
 3001 AAAACTTGGC GCTGCACCTC GCAGTTCCAA GCTGGTCACA TTCTTGAGTC CCTCAAATTC  
**15** 3061 CTCCCTGACA TGATTCAAGA CACACCGCCT CCTGTTCCCA GGAAGAACCG AGCTGGTGAC  
 3121 AGTGCCGGCC TGAAGCAACT GGTGGCGCAG TGGGATAGGA AATTGAGTGT GACACCCCCC  
 3181 ACAAACCGG TTGGACCGGT GCTTGACCAG ACCGTCCCTC TGCCTATGGA CATCCAGCAA  
 3241 GAAGATGCCA TCTCCGCTGA CAAGCCACCC CATTGCGAAA ACCCTTCTAG TCAAGTAGAT  
 3301 GTGGGTGGAG GTTGAAAAAG TTTTATGCTC TCCGGCACCC GTTTCGCGGG GTCCGTTAGT  
**20** 3361 CAGCGCCTTA CGACATGGGT TTTTGAGGTT CTCTCCCATC TCCCAGCTTT TATGCTCACA  
 3421 CTTTTCTCGC CACGGGGCTC TATGGCTCCA GGTGATTGGC TGTTTGCAGG TGCTGTTCTA  
 3481 CTTGCTCTCC TGCTCTGCCG TTCTTACCCA ATACTCGGAT GCCTTCCCTT ATTGGGTGTC  
 3541 TTTTCTGGTT CTGTGCGGTG TGTTTCGTTG GGTGTTTTTG GTTCTTGGAT GGCTTTTGCT  
 3601 GTATTTTTAT TCTCGACTCC ACCCGACCCA GTCGGTCTT CTTGTGACCA CGATTGCGCG  
**25** 3661 GAGTGTGATG CTGAGCTTTT GGCTCTTGAG CAGCGCCAAC TTTGGGAACC TGTGCGCAGC  
 3721 CTTGTGGTCG GGCCATCGGG CCTCTTATGC GTCATTCTTG GCAAGTACT CGGTGGGTCA  
 3781 CGTTGTCTCT GGTGTTGTTCT CCTACGTATA TGCATGCTCG CAGATTTGGC AATTTCTCTT  
 3841 ATTTATGTGG TGTCCCAAGG GCGTTGTAC AAGTGTGGG GAAAGTGTAT AAGGACGGCT  
 3901 CCTGCAGAAG TGACCCTTAA TGTGTTTCCT TTTTCGCGCG CCACCCGCTC ATCTCTTGTC  
**30** 3961 TCCTTGTTGTG ATCGGTTCCA AGCGCCAAAA GGAGTTGACC CCGTGCACCTT GGCGACAGGC  
 4021 TGGCGCGGGT GCTGGTGTGG TGAGAGCCCT ATTCATCAAT CACACCAAAA ACCGATAGCT  
 4081 TATGCCAACT TGGATGAAAA GAAGATATCC GCCCAGACGG TGATTGCTGT CCCGTATGAT  
 4141 CCCAGTCAGG CCATTAAATG CCTGAAAGTT TTGCAGGCAG GAGGGGCTAT TGTGGACCAG  
 4201 CCTACGCCCG AGGTGCTCCG TGTGTCTGAG ATTCCCTTCT CGGCCCCATT TTTTCCGAAG  
**35** 4261 GTCCCAGTCA ACCCAGATTG CAGGGTTGTG GTAGATTCGG ACACTTTTGT GGCTGCGGTC  
 4321 CGCTGCGGTT ATTCGACAGC ACAACTGGTC CTTGGTTCGG GCAACTTTGC CAAGCTAAAT  
 4381 CAGACCCCCC TCAGGAATC TGTCCCACC AAAACAACCTG GTGGGGCCTC ATACACCTT

ES 2 692 809 T3

4441 GCCGTGGCCC AGGTATCTGT GTGACTCTT GTTCATTTCA TCCTCGGCCT TTGGTTAACG  
 4501 TCACCTCAAG TGTGTGGTCG AGGGACCTCT GACCCGTGGT GTTCGAACCC TTTTTCGTAT  
 4561 CCTACTTATG GCCCCGGAGT TGTGTGTTCC TCTCGACTCT GCGTGTCTGC CGACGGAGTT  
 4621 ACCCTGCCAT TGTTCTCAGC CGTTGCCCAT CTTTCCGGTA GAGAGGTGGG GATTTTTATT  
**5** 4681 TTGGTGCTTG CCTCCTTGGG CGCTTTAGCC CACCGCTTGG CTCTTAAGGC AGACATGTCA  
 4741 ATGGTCTTTT TGGCGTTTTG TGCTTACGCC TGGCCCATGA GCTCCTGGTT AATTTGCTTC  
 4801 TTTCTATATG TCTTGAGGTG GGTAACCCTT CATCCTCTCA CTATGCTTTG GGTGCACTCA  
 4861 TTTTGGTGT TTTGCCTACC AGCTGCCGGC GTTCTCTCGC TGGGAATAAC CGGTCTTCTT  
 4921 TGGGCAGTTG GCCGTTTCAC CCAGGTTGCC GGAATTATCA CACCTTATGA CATCCACCAG  
**10** 4981 TATACCTCCG GACCACGTGG TGCAGCTGCT GTAGCAACGG CTCCAGAAGG TACTTACATG  
 5041 GCGGCCGTTT GGAGAGCCGC TTTGACTGGA CGGACTTTGA TCTTCACACC ATCTGCAGTC  
 5101 GGATCCCTTC TTGAAGGTGC TTTTCAAGCT CAAAAGCCCT GCCTTAACAC CGTGAATGTC  
 5161 GTAGGCTCTT CCCTTGGTTC TGGAGGAGTT TTCACCATTG ATGGCAGAAG AGTCATCGTC  
 5221 ACTGCCACCC ATGTGTTGAA TGGTAACACA GCCAGGGTCA CTGGTGATTC CTACAACCGC  
**15** 5281 ATGCACACGT TCAATACTAA TGGTGATTAT GCCTGGTCCC ATGCTGATGA CTGGCAAGGC  
 5341 GTTGCCCTTA TGGTTAAGAT CGCTAAGGGG TATCGCGGTC GTGCCTACTG GCAAACGTCA  
 5401 ACCGGAGTCG AACCTGGCAT CATGGGGGAA GGATTCGCCT TCTGTTTCAC TAACTGTGGC  
 5461 GACTCAGGGT CACCTGTCAAT TTCAGAAGCT GGTGACCTTA TTGGAGTCCA TACCGGTTCA  
 5521 AACAACTCG GTTCTGGTCT TGTGACAACC CCTGAAGGGG AGACCTGCTC CATCAAGGAA  
**20** 5581 ACTAGGCTCT CTGACCTTTC TAGACATTTT GCAGGTCCAA GCGTCCCTCT TGGGGACATT  
 5641 AAGTTGAGCC CAGCCATCAT CCCTGATGTG ACAACTATTC CGAGTGACTT GGCATCGCTC  
 5701 CTTGCTTCTG TCCCCGTGAT GGAAGGTGGC CTCTCAACTG TCCAGCTTTT GTGCGTCTTT  
 5761 TTCCTTCTCT GGCATGATG GGGCCATGCC TGGACACCCA TTGTTGCCGT AGGCTTCTTT  
 5821 TTGCTGAATG AAATTCTCCC AGCAGTCTTG GTCCGAGCTG TGTTCTCTTT TGCCTCTTT  
**25** 5881 GTACTTGCAAT GGGCCACCCC CTGGTCGGCA CAAGTGTGTA TGATTAGACT CCTCACGGCG  
 5941 GCTCTCAACC GCAACAGGTT GTCCCTGGCG TTCTACGCAC TCGGAGGTGT CGTTGGCCTG  
 6001 GCCACAGAAA TCGGGACTTT TGCTGGTGGT TGGCCTGAAC TGTCCCAAGC CCTCTCGACA  
 6061 TACTGCTTCC TGCCCAGGTT CTTGCTGTG ACTAGTTATG TCCCCACCAT CATCATCGGT  
 6121 GGGCTCCATG CCCTCGGCGT AATTTTGTGG TTATTCAAAT ACCGATGCCT CCACAACATG  
**30** 6181 CTGGTTGGTG ATGGGAGTTT CTCAAGCGCT TTCTTCCTAC GGTATTTTGC TGAGGGTAAT  
 6241 CTTAGGAAAG GCGTGTGCGA GTCCTGTGGC ATGAATAACG AATCCCTGAC AGCTGCTTTG  
 6301 GCTTGCAAGT TGTCGCAAGC TGACCTTGAT TTTTTGTCCA GTTTAACGAA CTTCAAGTGC  
 6361 TTTGTGTCCG CTTCAAACAT GAAAAATGCA GCTGGCCAAT ACATCGAGGC GGCATATGCT  
 6421 AGAGCTCTGC GTCAGGAGCT GGCCTCCTTG GTTCAGGTTG ACAAGATGAA AGGAGTATTG  
**35** 6481 GCCAAGCTCG AGGCTTTCGC TGAGACGGCC ACTCCGTCAC TTGACACAGG TGACGTGATT  
 6541 GTTCTGCTTG GGCAACACCC CCATGGATCC ATCCTCGACA TTAATGTGGG GGGTGAAAGG  
 6601 AAAACTGTGT CTGTGCAAGA AACACGATGC CTGGGTGGTT CCAAATTCAG TGTCTGCACT

ES 2 692 809 T3

6661 GTCGTGTCCA ACACGCCCGT GGATACCTTG ACCGGCATCC CACTTCAGAC GCCAACCCCA  
6721 CTTTTTAAAA ATGGCCCGCG CCATCGCAGC GAGGACGACG ACCTTAAAGT TGAGAGAATG  
6781 AAAAAACACT GTGTATCCCT CGGCTTCCAC AAAATCAATG GTAAAGTTTA CTGCAAAATF  
6841 TGGGACAAGT CTAACGGCGA CACCTTTTAC ACGGATGATT CCCGATACAC TCAAGACCAT  
**5** 6901 GCTTTTCAGG ACAGGTCAAC CGACTATAGA GACAGGGATT ATGAAGGTGT ACAGACCGCC  
6961 CCCCACAGG GATTTCATCC AAAGTCCGAA GCCCCTGTTG GCACTGTTGT AATCGGTGGC  
7021 ATTACGTATA ACAGGCATCT GGTCAAAGGT AAGGAGGTCC TAGTTCCCAA ACCTGACAAC  
7081 TGCCTTGAAG CTGCCAGACT GTCCCTTGAG CAAGCTCTTG CTGGGATGGG CCAAACCTGT  
7141 GACCTTACAG CTACCGAAGT GGAGAAACTA AAGCGCATCA TTAGTCAACT CCAAGGTCTG  
**10** 7201 ACCACTGAAC AGGCTTTAAA CTGCTAGCCG CCAGCGGCTT GACCCGCTGT GGCCGCGGCG  
7261 GCCTAGTTGT AACTGAAACG GCGGTAAAAA TCGTAAAATA CCACAGCAGA ACTTTCACCT  
7321 TAGGCTCTTT AGACCTAAAA GTCACCTCCG AGGTGGAGGT GAAGAAATCA ACTGAGCAGG  
7381 GGCACGCTGT CGTGGCGAAC TTATGTTCCG GTGTCGTCTT GATGAGGCCT CACCCACCGT  
7441 CCCTTGTTGA CGTTCTCCTC AAACCCGGAC TTGACACAAC ACCCGGCATT CAACCAGGGC  
**15** 7501 ATGGGGCCCG GAATATGGGC GTGAACGGTT CTATTTGGGA TTTTGAAACT GCACCCACAA  
7561 AGGTAGAACT AGAGTTGTCC AAGCAAATAA TCCAAGCATG TGAAGTCAGG CGCGGGGACG  
7621 CCCCTAACCT CCAACTCCCC TACAAGCTTT ATCCTGTCAG GGGGGACCCC GAGCGGCGTA  
7681 AAGGTCGCCT TGTCAACACT AGGTTTGGAG ATTTACCTTA CAAAACCTCC CAAGACACCA  
7741 AGTCCGCAAT TCATGCGGCT TGTTGCCTGC ATCCCAATGG GGTCCCTCGT TCTGATGGTA  
**20** 7801 AATCCACGCT GGGTACCACT CTTCAACATG GTTTCGAGCT TTATGTCCCC ACTGTACCTT  
7861 ATAGTGTGAT GGAATACCTT GATTACGCC CTGACACCCC TTTTATGTGT ACTAAACATG  
7921 GCACTTCCAA GGCTGCTGCA GAGGACCTCC AAAAAATATGA CCTATCCACT CAAGGGTTTG  
7981 TCTTGCCCTG GGTCCACGCT CTAGTGCAGC GGTTTCATCTT TAGCCATGTT GGTAAGGCGC  
8041 CACCACTGTT CTTCCATCA ACCTACCCTG CCAAGAATC CATGGCAGG GTCAATGGCC  
**25** 8101 AGAGGTTCCC AACAAAGGAT GTCCAGAGCA TACCTGAAAT TGATGAAATG TGCGCCCGTG  
8161 CCGTCAAGGA AAATTGGCAG ACTGTGACAC CTTGCACCCT CAAAAACAG TACTGTTCCA  
8221 AACCTAAAAC TAGAACCATC CTAGGTACCA ACAACTTCAT AGCCTTGCT CACAGGTCAG  
8281 CACTCAGTGG TGTCACCCAG GCGTTCATGA AGAAGGCCTG GAAGTCCCA ATTGCCTTGG  
8341 GGAAAAACAA GTTTAAGGAA TTGCATTGCA CTGTGCGCCG CAGATGCCTT GAGGCTGACC  
**30** 8401 TGGCTTCCTG CGATCGCAGC ACCCCCGCCA TTGTGAGGTG GTTTGTTGCC AACCTCCTGT  
8461 ATGAACTTGC AGGATGTGAA GAGTACTTGC CTAGCTACGT GCTCAACTGT TGCCATGACC  
8521 TTGTGGCAAC GCAGGATGGC GCTTTCACAA AACGCGGTGG CCTGTCTGTC GGGGACCCCG  
8581 TCACCAGTGT GTCCAACACC GTCTACTCAC TGATAATTTA CGCCCAGCAC ATGGTGCTTT  
8641 CGGCCTTGAA GATGGGTCAT GAAATTGGTC TCAAGTTCCT TGAGGAACAG CTCAAATTTG  
**35** 8701 AGGACCTTCT TGAAATCCAG CCCATGTTAG TGTATTCTGA TGACCTCGTC TTGTATGCGG  
8761 AAAGACCCAC TTTTCCCAAC TACCATTGGT GGGTCGAGCA TCTTGACCTG ATGTTGGGCT  
8821 TTAAAACGGA CCCAAAGAAA ACTGTCATAA CTGATAAACC CAGTTTTTCTC GGCTGCAGAA

ES 2 692 809 T3

8881 TTGAAGCAGG ACGGCAGTTA GTCCCAATC GCGACCGTAT TCTGGCTGCT CTTGCATATC  
8941 ATATGAAGGC GCAGAACGCC TCAGAGTATT ATGCGTCCGC TGCCGCAATT CTGATGGATT  
9001 CGTGTGCTTG CATTGACCAT GACCCCGAGT GGTATGAGGA CCTTATCTGC GGCATCGCCC  
9061 GGTGTGCTCG CCAGGACGGT TACCGTTTTC CAGGCCCGGC ATTTTTTCATG TCCATGTGGG  
**5** 9121 AGAAGCTGAA AAGTCATAAC GAAGGGAAGA AATGCCGTCA CTGCGGCATC TGCGACGCCA  
9181 AAGCCGACTA TGCCTCCGCC TGTGGACTTG ATTTGTGTTT GTTCCATTCA CACTTTCATC  
9241 AACACTGCCC AGTCACTCTG AGCTGTGGCC ACCATGCCGG TTCAAAGGAA TGTTTCGAGT  
9301 GTCAGTCACC TGTGCGGGCT GGCAAATCCC CCCTTGACGC TGTGCTGAAA CAAATCCCGT  
9361 ACAAACCTCC TCGTACCATT ATCATGAAGG TGGACAACAA AACAACGACC CTTGACCCGG  
**10** 9421 GAAGATATCA GTCCCGTCGA GGTCTTGTG CAGTCAAAAG AGGTATTGCA GGTAATGAGG  
9481 TTGATCTTTC TGATGGAGAC TACCAAGTGG TGCCTCTTTT GCCGACTTGC AAAGACATAA  
9541 ACATGGTGAA GGTGGCTTGC AACGTACTAC TCAGCAAGTT TATAGTAGGG CCGCCAGGTT  
9601 CCGGAAAAAC CACCTGGCTA CTGAACCAAG TCCAGGACGA TGATGTCATT TACACACCTA  
9661 CTCATCAGAC AATGTTTGAC ATAGTCAGTG CTCTTAAAGT TTGCAGGTAT TCCATCCCAG  
**15** 9721 GAGCCTCAGG ACTCCCTTTT CCACCACCTG CCAGGTCCGG GCCGTGGGTT AGGCTCATCG  
9781 CCAGCGGACA TGTCCCTGGC CGAGTGTCAAT ATCTCGATGA GGCAGGATAT TGCAATCATC  
9841 TAGACATTCT AAGGCTGCTT TCCAAAACAC CCCTTGTGTG TTTGGGTGAC CTTTACGCAAC  
9901 TTCACCCGGT CGGCTTTGAT TCCTATTGTT ATGTGTTTCA TCAGATGCCT CAGAAGCAGC  
9961 TGACCACCAT TTATAGATTT GGCCCTAACA TCTGTGCAGC CATCCAGCCT TGTTACAGGG  
**20** 10021 AGAAACTTGA ATCCAAGGCC AGGAACACCA GAGTGGTTTT CACCACCCGG CCTGTGGCCT  
10081 TTGGTCAGGT CCTGACACCG TACCACAAAG ATCGTACCCG CTCTGCAATA ACTATAGATT  
10141 CATCCCAGGG GGCACCTTC GACATTGTGA CATTGCATCT ACCATCGCCA AAGTCCCTAA  
10201 ACAAATCCCG AGCACTTGTA GCCATCACTC GGGCAAGACA TGGGTTGTTC ATTTATGACC  
10261 CTCATGACCA ACTCCAGGAG TTTTTCAACT TAACCCCGA GCGCACTGAT TGTAACCTTG  
**25** 10321 CGTTCAGCCG TGGGGATGAG CTGGTTGTTT TGAATGTGGA TAATGCGGTC ACAACTGTAG  
10381 CGAAGGCCCT AGAGACAGGT TCACCCCGAT TTCGAGTATC GGACCCGAGG TGCAAGTCTC  
10441 TCTTAGCCGC TTGTTCCGCC AGTCTAGAAG GGAGCTGCAT GCCACTACCA CAAGTAGCAC  
10501 ATAACCTGGG GTTTTACTTT TCCCCGGACA GCCCAGCTTT TGCACCCCTG CAAAAGAGC  
10561 TGGCGCCACA TTGGCCAGTG GTCACCACC AGAATAATCG AGCGTGGCCT GATCGACTTG  
**30** 10621 TCGCTAGTAT GCGCCAATT GATGCCCGCT ACAGCAAGCC AATGGTCCGT GCAGGGTATG  
10681 TGGTCGGGCC ATCCATTTTT CTTGGCACTC CTGGTGTGGT GTCATACTAT CTCACATTAT  
10741 ACATCGGGGG CGAGCCTCAG GCCCTGCCAG AAACACTCGT TTCAACAGGA CGTATAGCCA  
10801 CAGATTGTCTG GGAATATCTC GACGCGGCTG AGGAAGAGGC AGCGAGAGAA CTTCCCCACG  
10861 CATTTATTTG CGATGTCAAA GGCCTACCG TCGGGGGGTG TCACCACATT ACATCGAAAT  
**35** 10921 ACCTACCTAG GTCCCTGCCT AAAGACTCTG TTGCTGTGGT TGGGGTGAGT TCGCCCGGTA  
10981 GGGCTGCTAA AGCCGTGTGC ACTCTACCG ATGTGTACCT CCCCGAACCT CGACCATATT  
11041 TGCAACCGGA GACGGCATCA AAATGCTGGA AACTTAAACT GGATTTTCAGG GATGTTTCGAC

ES 2 692 809 T3

11101 TGATGGTCTG GAAAGGCGCC ACAGCCTATT TCCAGTTGGA AGGGCTGACA TGGTCAGCGC  
 11161 TGCCCCATTA TGCTAGGTTT ATTCAGCTAC CCAAGGATGC CGTTGTGTAC ATCGATCCGT  
 11221 GTATAGGGCC GGCAACAGCC AATCGCAAGG TTGTGCGAAC CACAGACTGG CGGGCCGACC  
 11281 TGGCAGTGAC ACCGTATGAT TACGGTGTCT AGGTCAATTTT GACAACAGCC TGGTTCGAGG  
**5** 11341 ACCTTGGGCC GCAGTGAAG ATTTTGGGGT TGCAGCCTTT CAGACGAACA TTTGGCTTTG  
 11401 AGAACACTGA AGATTGGGCA ATTCTCGCAC GCCGTATGAA TGACGGCAAA GATTACACTG  
 11461 ACTATAATTG GCATTGTGTA CGAGAACGCC CACACGCAAT TTACGGGCGC GCCCGTGACC  
 11521 ATACGTATCA TTTTGGCCCTT GGCCTGAAC TGCAAGTAGA GCTGGGCAGA CCCCAGCTGC  
 11581 CTCCTGAGCA AGTGCCGTGA ACGCGGAGTG ATGCAATGGG TTCCTGTGG AGTAAAATCA  
**10** 11641 GTCAGTTGTT CGTGGATGCC TTCCTGAGT TCCTTGTAG TGTGGTTGAC ATTGTCTATCT  
 11701 TTCTCGCCAT ATTGTTTGGG TTCCTGTTG CAGGCTGGTT ATTGGTCTTC CTTCTCAGAG  
 11761 TGGTTTGTCT CGCGTTTCTC CGTTCGCGCT CTGCCATTCA CTCTCCCGAA CTATCGAAGG  
 11821 TCCTATGAGG GCTTGCTACC CAACTGCAGA CCGGATGTCC CACAATTCGC AGTTAAGCAC  
 11881 CCGTTGGGTA TACTTTGGCA TATGCGAGTC TCCCACCTAA TTGACGAAAT GGTCTCTCGC  
**15** 11941 CGCATTAC GACCATGGA ACATTCGGGT CAAGCGGCCT GGAAGCAGGT TGTTAGTGAA  
 12001 GCCACTCTCA CAAAACGTG AAGGCTTGAC GTAGTCACTC ATTTCCAACA CCTGGCCGCA  
 12061 GTGGAGGCTG ATTCTTGCCG CTTCTTAGC TCACGACTCG CGATGCTGAA AAACCTTGCC  
 12121 GTTGGCAATG TGAGCCTGGA GTACAACACT ACTTTGGACC GCGTTGAGCT CATCTTTCCC  
 12181 ACACCAGGTA CGAGGCCCAA GTTGACCGAT TTTAGGCAAT GGCTTATCAG CGTGCACGCT  
**20** 12241 TCCATCTTCT CCTCTGTGGC TTCGTCTGTT ACCTTGTTC CAGTGCTTTG GCTTCGAATT  
 12301 CCAGCTCTAC GCTATGTTTT TGGTTTCCAT TGGCCACGG CAACACATCA TTCGAATAA  
 12361 CTATCAATTA CACTATATGT AAGCCATGCC CTACCAGTCA AGCTGCCCAA CAAAGACTCG  
 12421 AGCCTGGCCG TAACGTGTGG TGCAAAATAG GGCACGACAG GTGTGAGGAA CGTGACCATG  
 12481 ATGAGTTGTC AATGTCCATT CCGTCCGGGT ACGACAACCT CAAACTTGAG GGTATTATG  
**25** 12541 CTTGGCTGGC TTTTTTGTCC TTTTCTACG CGGCCCAATT CCATCCGGAG CTGTTGCGAA  
 12601 TAGGAAACGT GTCGCGGCTC TTTGTGGATA AGCGACACCA GTTCATTTGC GCCGAGCATG  
 12661 ATGGACAAAA TTCAACCATA TCTGCCAGAC ACAACATCTC CGCGTCGTAT GCGGTGTATT  
 12721 ACCATCATCA AATAGACGGG GGCAATTGGT TTCATTTGGA ATGGCTGCGA CCATCTTTTT  
 12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT  
**30** 12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCTT  
 12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT  
 12961 CAGGAGGTCG TCCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTTCC CAGTACATCA CGATAACGGC  
 13021 TAATGTGACC GATGAATCGT ATTTGTACAA CGCGGACTTG CTGATGCTTT CCGCGTGCCT  
 13081 TTTCTACGCC TCGGAAATGA GCGAGAAAGG CTTCAAAGTC ATCTTTGGGA ATATTTCTGG  
**35** 13141 CGTTGTTTCC GCTTGTGTTA ATTTACAGA TTATGTGGCC CATGTGACCC AACACACTCA  
 13201 GCAGCACCAT TTGGTAATTG ATCACATTGC GTTACTACAC TTCTTGACAC CGTCTACGAT  
 13261 GAGGTGGGCT ACAACCATTG CTTGTTTGTG TGCCATTCTT TTGGCGGTAT GAAATGTTCT

ES 2 692 809 T3

13321 TGCAAGTTGG GGCATTTCTT GACTCCTCAC TCTTGCTTCT GGTGGCTTTT TTTGCTGTGT  
 13381 ACCGGCTTGT CTTGGTCCTT TGTCGATGGC AACGACAACA GCTCGACATC CCAATACATA  
 13441 TATAATTTGA CGATATGCGA GCTGAATGGG ACCGAATGGT TGTCCGGTCA TTTTGATTGG  
 13501 GCAGTCGAAA CCTTTGTGCT TTACCCAGTT GCCACTCATA TCATTTCACT GGGTTTTCTC  
 5 13561 ACAACAAGCC ATTTCCCTGA TGCCTCGGT CTCGGCGCTG TGTCCGCCAC AGGATTCATT  
 13621 GCGGAGCGGT ATGTACTTAG CAGCATGTAC GGCCTTTGCG CCTTCGCGGC GCTCGTATGT  
 13681 TTTGTCTATCC GTGCTGCTAA AAATTGCATG GCTTGCCGCT ATGCCCCGAC CCGGTTTACC  
 13741 AACTTCATCG TGGACGACCG GGAAGAATC CATCGATGGA AGTCTTCAAT AGTGGTGGAG  
 13801 AAATTGGGCA AAGCTGAAGT CCGTGGTGAC CTTGTCAACA TTAAGCATGT TGTCTCTGAA  
 10 13861 GGGGTTAAAG CTCAACCCCT GACGAGGACT TCGGCTGAGC AATGGGAAGC CTAGACGACT  
 13921 TTTGCAACGA TCCCACCGCC GCACAAAAAC TCGTGCTGGC CTTTAGCATC ACATATACAC  
 13981 CCATAATGAT ATACGCCCTT AAGGTGTAC GCGGCCGACT CCTGGGGCTG TTGCACATCT  
 14041 TGATATTTCT GAATTGTTCC TTTACTTTTG GGTACATGAC ATATGTGCAT TTTCAATCCA  
 14101 CCAACCGTGT CGCACTCACT CTGGGGGCTG TAGTCGCCCT TTTGTGGGGT GTTTACAGCC  
 15 14161 TCACAGAGTC ATGGAAGTTC ATCACTTCCA GATGCAGATT GTGTTGCCTA GGCCGGCGAT  
 14221 ACATTCTGGC CCCTGCCCAT CACGTAGAAA GTGCTGCAGG CCTCCATTCA ATCCCAGCGT  
 14281 CTGGTAACCG AGCATAAGCT GTGAGAAAGC CCGGACTAAC ATCAGTGAAC GGCCTCTAG  
 14341 TACCTGGGCT TCGGAGCCTC GTGCTGGGCG GCAAACGAGC TGTTAAACGA GGAGTGGTTA  
 14401 ACCTCGTCAA GTATGGCCGG TAAGAACCAG AGCCAGAAGA AAAGAAGAAA TGCAGCTCCG  
 20 14461 ATGGGGAAAG GCCAGCCAGT CAATCAACTG TGCCAGTTGC TGGGTACAAT GATAAAGTCC  
 14521 CAGCGCCAGC AATCTAGGGG AGGACAGGCC AAAAAGAAGA AGCCTGAGAA GCCACATTTT  
 14581 CCCCTAGCTG CTGAAGATGA CATTCCGGCAC CATCTCACCC AGGCCGAACG TTCCCTCTGC  
 14641 TTGCAATCGA TCCAGACGGC TTTCAATCAA GCGCAGGAA CTGCGTTCGCT TTCATCCAGC  
 14701 GGAAGGTCA GTTTCCAGGT TGAGTTCATG CTGCCGGTTG CTCATACAGT GCGCCTGATT  
 25 14761 CGCGTGACTT CTACATCCGC CAGTCAGGGT GCAAATTAAT TTGACAGTCA GGTGAATGGC  
 14821 CGCGATTGAC GTGTGGCCTC TAA

SEQ ID NO:11 ORF 1a DE LA CEPA DEL PRRSV PARENTAL 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 178...727

30 MSGMFSRCMCTPAARVFNAGQVYCTRCLRSARSLSPQLDLDLAVGLFHKPKDKLHWKVPKIPQVECPSPGCC  
 WLSTIFPLARMTSGNHNLQRLVKVADVLYRDGCLTPRHLRELQVYERGCNWWYPITGPVPGMAVYANSMHVSDQPF  
 PGATHVLTNSPLPQRACRQPFCEEEAHSSIRWEKVFIFMDSSSDGRSRMMWTPESDDSTALEVLPPELEHQVKVL  
 VRSFPAHHLVDLADWELTESPENGFSTSHPCGYLVRDPAVSEGKWLSCFLSQAIEVLSREAHLATAYGYQTKW  
 GVPKYIQRRLQVHGLRAVDPDGPVHVEALSCPQSWIRHLTLNDDVTPGFVRLMSLRVNPTEPTTHRIFRFGVHKW  
 YGAAGKRARGKRAAKSEKDSASTLKVARTSTSGIVTYSPPADGSCGWHALAILNRMINDFTSPLPRYNRPEDDW  
 35 ASDGDLAQAIQCLQPLAAIARNRACPNAYLVKLVHVEVEVRPGMAPRSLSRECVVGVCSGCVASPYPEDGLP  
 KRALALASAYRLPSCDCVCDGIIDFLANPPPQEFWTLDKMLTSPSPEQSGFSSLYKLLLEVLPQKCGSTEGEPIYTVR  
 MLKDCPSSKQAMALLAKIKVPSSKAPSVTLNECFPTDVPVNSELISWEEPDPGAAVVLCPSDAKESKETAPEEAQAR  
 NRKVLHPVVLTEELSEQVQVVEGDQDMPLDLTWPTLTATATPVRGPVPDNLSSGIGAQPATVQELILARPAPRLVER  
 CGTESNGSSFLDLPDVTSDQPLDLSLAAWPVVATASDPGWIHGRREPVFVKPRGVFSDGESALQFGESEASSV  
 40 VDDRTKEAPVVDAPIDLTTSNETLSGSDPFVFAKFRPRFSAQALIDRGGPLADVHAKIKSRVYEQCLQACEPGSRAT  
 PATKKWLDKMWDVDMKTWRCTSQFQAGHILESLKFLPDMIQDTPPPVPRKNRAGDSAGLKQLVAQWDRKLSVTP  
 PTKPVPVLDQTVPLPMDIQVEDAISADKPPHSQNPSSQVDVGGGWKSFMLSGTRFAGSVSQRLTTWVFEVLSHLP  
 AFMLTLFSPRGSMA PGDWLWLFAGAVLLALLCRSYPILGCLPLLGVFSGSVRCVRLGVFGSWMAFAVFLSTPPDPVG  
 SSCDHDSPPECHAEALLAQRQLWEPVRSVVGPSGLLCVILGKLLGSRCLWFVLLRICMLADLAISLIYVVSQGRCHK



CWGKCI RTAPAEVTLNVFPFSRATRSSLVSLCDRFQAPKGVDPVHLATGWRGCWCGESPIHQSHQKPIAYANLDEKK  
 ISAQTVIAVPYDPSQAIKCLKVLQAGGAIVDQPTPEVVRVSEIPFSAPFFPKVPVNPDCRVVVDSDTFVAAVRCGYSTA  
 QLVLRGRNF AKLNQTPLRNSVPTKTTGGASYTLAVAQVSVWTLVHFILGLWLTSPQVCGRGTSDPWCSPNPFYSPTY  
 5 GPGVVCSSRLCVSADGVTLPLFSVAVAHLSGREVGIFILVLAASLGALAHRLALKADMSMVFLAFCAWAYPMSWLI  
 PMLLRWVTLHPLTMLWVHSFLVFCPLAAGVLSLGITGLLWAVGRFTQVAGIITPYDIHQYTSGPRGAAAATAPEGT  
 MAAVRRAALTGRTLIFTPSAVGSLLLEGAFRTQKPCLNTVNVVSSLSGSGGVFTIDGRRVIVTATHVLNGNTARVTGDS  
 YNRMHTFNTNGDYAWSHADDWQGVAPMVKIAKGYRGRAYWQTSTGVEPGIMGEGFAFCFTNCGDSGSPVISEAG  
 DLIGVHTGSNKLGSGLVTTPEGETCSIKETRLSDLSRHFAGPSVPLGDIKLSAIPDVTIIPSDLASLLASVPMVEGGLS  
 10 TVQLLCVFFLLWRMMGHAWTPIVAVGFFLLNEILPAVLVRAVFSFALFVLAWATPWSAQVLMIRLLTAALNRNRLSLAF  
 YALGGVVGLATEIGTFAGGWPELSQALSTYCFPRFLAVTSYVPTIIIGLHALGVILWLFKYRCLHNMLVGDGSSAF  
 FLRYFAEENLRKGVSQSCGMNNESTLAALACKLSQADLDFLSSLTNFKCFVSASNMKNAAGQYIEAAYARALRQELA  
 SLVQVDKMKGV LAKLEAFAETATPSLDTGDVIVLLGQHPHGSILDINVGGERKTVSVQETRCLGGSKFSVCTVVSNT  
 VDTLTGIPLQTPPLFENGPRHRSEDDDLKVERMKKHCVSLGFHKINGKVYCKIWDKSNNGDTFYTDDSRYTQDHAFQ  
 15 DRSTDYRDRDYEGVQTAPQQGFDPKSEAPVGTVIGGITYNRHLVKGKEVLVPKPDNACLEAARLSLEQALAGMGQT  
 CDLTATEVEKLRISQLQGLTTEQALNC

SEQ ID NO:12 ORF 1B DE LA CEPA DEL PRRSV PARENTAL 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 7209...11600

TGFKLLAASGLTRCGRGLVVTETAVKIVKYHSRTFTLGSLDLKV TSEVEVKKSTEQGHAVVANLCSGVVLMRPHPPS  
 LVDVLLKPLGDDTPGIQPGHGAGNMVNGSIWDFETAPTKVELELSKQIIQACEVRRGDAPNLQLPYKLYPVRGDPER  
 20 RKGRLVNTRFGDLPYKTPQDTSKSAIHAACCLHPNGVLVSDGKSTLGTTLQHGFELYVPTVPYSVMEYLDSPDTPFM  
 CTKHGTSKAAAEDLQKYDLSTQGFVLPGLRRLVRRFIFSHVKGAPPLFLPSTYPAKNSMAGVNGQRFPTKDVQSIPEI  
 DEMCARAVKENWQTVTPCTLKKQYCSKPKTRTILGTNNFIALAHRALS SVTQAFMKKAWKSPIALGKNKFKELHCTV  
 AGRICLEADLASCDRSTPAIVRWFVANLLYELAGCEEYLP SYVLNCCHDLVATQDGAFTKRGLSSGDPVTSVSNVY  
 25 LIHYAQHMVLSALKMGHEIGLKFLEEQLKFEDLLEIQPMLVYSDDLVLYAERPTFPNYHWWVEHLDLMLGFKTDPKKT  
 VITDKPSFLGCRIEAGRQLVPNRDRILAAALAYHMKAKNASEYYASAAAILMDSACIDHDPEWYEDLICGIARCARQDG  
 YRFPGPFAFFMSMWEKLSHNEGKCRHCGICDAKADYASACGLDLCLFHSFHQHCPTVTLSCGHHAGSKECSQCQ  
 SPVGAGKSPLDAVLKQIPYKPPRTIIMKVDNKTTLDPGRYQSRRLVAVKRGIAAGNEVDLSDGDYQVWVLLPTCKDIN  
 MVKVACNVLLSKFIVGPPGSGKTTWLLNQVQDDVYTPHTQTMFDIVSALKVCRY SIPGASGLPFPFPPARS GPWVRL  
 30 IASGHVPGRVSYLDEAGYCNHLDILRLLSKTPLVCLGDLQQLHPVGFDSYCYVFDQMPQKQLTTIYRFGPNICAAIQPC  
 YREKLESKARNTRVVFTRPVAFGQVLTYPYHKDRTGSAITDSSQGATFDIVTLHLPSPKSLNKSRLVAITRARHGLFI  
 YDPHDQLQEFFNLTPERTDCNLAFSRGDELVLNVDNAVTTVAKALETGSPRFRVSDPRCKSLLAACSASLEGSCMP  
 LPQVAHNLGIFYFSPDSPAFAPLPKELAPHWPVVT HQNNRAWPDRLVASM RPIDARYSKPMV GAGYVVGPSIFLGT  
 35 GVVSYYLTLYIGGEPQALPETLVSTGRIATDCREYLDAAEEEAARELPHAFIGDVKGTTVGGCHHITSKYLPRSLPKDS  
 VAVVGVSSPGRAAKAVCTLDVYLPPELRYLPETASKCWKLKDFRDVRLMVWKGATAYFQLEGLTWSALPDYAR  
 FIQLPKDAVVYIDPCIGPATANRKKVVRTTDWRADLAVTPYDYGAVILTTAWFEDLGPQWKILGLQPFRRFTFGFENTE  
 DWAILARRMNDGKDYTDYNWHCVRERPHAIYGRARDHTYHFALGTQLVQLGRPRLPPEQVP

SEQ ID NO:13 ORF 2 DE LA CEPA DEL PRRSV PARENTAL 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 11611...12360

MQWVHCGVKSVC SWMPSSLVWLTLSSFSFYCLGSL LQAGYWSSFSEWFAPRFSVRALPFTLPNYRRSYEGLL  
 40 PNCRPDVPQFAVKHPLGILWHMRVSHLIDEMVSRRIYRTMEHSGQAAWKQVSEATLTKLSRLDVTTHFQHLAAVEA  
 DSCRFLSSRLAMLKNLAVGNVSLEYNTTLDRVELIFPTGTRPKLTD FRQWLISVHASIFSSVASSVTLFTVLWLRIPAL  
 RYVFGFHWPTATHHSN

SEQ ID NO:14 ORF 3 DE LA CEPA DEL PRRSV PARENTAL 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 12219...13016

45 MAYQRARFHLLLCGFVCYLVHSALASNSSSTLCFWFPLAHGNTSFELTINYTICKPCPTSQAAQQRLEPGRNVWCKIG  
 HDRCEERDHDLSMSIPSGYDNLKLEGYYAWLAFLSFSYAAQFHPELFGIGNVSRVFDKRRHQFICAEHDGQNSTISA  
 RHNISASYAVYYHHQIDGGNWFHLEWLRPFFSSWLVLNISWFLRRSPASPASRRYQILRPTRPRLPVSWSFRTSIVS  
 NLTGPQQRKVPLPSGGRPNVVKPSAFPSTSR

SEQ ID NO:15 ORF 4 DE LA CEPA DEL PRRSV PARENTAL 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 12761...13312

50 MAATILFLLAGAHLMVSEAFACKPCFSTHLSDIKNTTAAAGFMVLQINCFQSHRASTAQGTTPLRSSQCREAVGI  
 PQYITITANVTDESILYNADLLMLSACLFYASEMSEKGFVIFGNISGVVSACVNFDTYVAHV TQHTQQHHLVIDHIRLL  
 HFLTPSTMRWATTIACLFALLAV

SEQ ID NO:16 ORF 5 DE LA CEPA DEL PRRSV PARENTAL 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 13309...13914

55 MKCSCKLGHFLTPHSCFWWFLCTGLSWSFVDGNDNSSTSQYIYNLTICELNGTEWLSGHFDWAVETFLVYPVATH  
 IISLGFLLTSHFLDALGLGAVSATGFIGERYVLSMYGVCFAALVCFVIRA AKNCMACRYARTRFTNFIVDDRGRRIHR  
 WKSSIVVEKLGAEVGGDLVNIKHVVLEGVKAQPLTRTSAEQWEA

## ES 2 692 809 T3

SEQ ID NO:17 ORF 6 DE LA CEPA DEL PRRSV PARENTAL 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 13902...14423

MGSLDDDFCNDPTAAQKLVLAFSITYTPIMIYALKVSRGRLLGLLHILIFLNCSFTFGYMTYVHFQSTNRVALTLGAVVALL  
 5 WGVYSLTESWKFITSRCRLCCLGRRYILAPAHHVESAAGLHSIPASGNRAYAVRKPGLTSVNGTLVPGLRSLVLGGKR  
 AVKRGVVNLVKYGR

SEQ ID NO:18 ORF 7 DE LA CEPA DEL PRRSV PARENTAL 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 14413...14799

MAGKNQSQKRRRNAAPMGKGQPVNQLCQLLGTMIKSQRQQSRGGQAKKKKPEKPHFPLAAEDDIRHHLTQAERSL  
 CLQSIQTAFNQAGTASLSSSGKVSFQVEFMLPVAHTVRLIRVTSTSASQGAN

10 SEQ ID NO:19 Nucleótido que codifica ORF1A del PRRSV atenuado 94881

178 ATG

181 TCTGGGATGT TCTCCCGGTG CATGTGCACC CCGGCTGCCC GGGTATTTTG GAACGCCGGC

241 CAAGTCTATT GCACACGGTG TCTCAGTGCA CGGTCTCTTC TCTCTCCAGA ACTTCAGGAC

301 ACGGACCTCG GTGCAGTTGG CTTGTTTCAC AAGCCTAAAG ACAAGCTCCA TTGGAAAGTT

15 361 CCCATTGGTA TCCCCCAGGT GGAATGTTCT CCATCTGGGT GTTGCTGGCT GTCAACCATT

421 TTTCTTTTAG CGCGCATGAC CTCCGGCAAT CACAACCTCC TTCAACGACT CGTGAAGGTT

481 GCTGATGTAT TGTACCGTGA CGGTTGCTTA ACCCCTAGAC ACCTCCGTGA ACTCCAAGTT

541 TACGAGCGTG GTTGCAATTG GTATCCGATT ACGGGGCCTG TGCCTGGGAT GGCTGTGTAC

601 GCGAACTCCA TGCACGTGTC CGACCAACCG TTCCCTGGTG CCACTCATGT GTTAACAAAT

20 661 TCCCCTTTGC CTCAACGGGC TTGTGCGGAG CCGTTCTGTC CGTTCAAGA GGCCCATCTCT

721 AGCATATACA GGTGGGAAAA ATTTGTAATT TTTATGGATT CCTCCTCCGA CGGTGATCT

781 CGCATGATGT GGACTIONGGA ATCCGATGAC TCCACGGCTT TGGAAGTTCT GCCGCCGAG

841 CTAGAACCAGG AGGTCAAGGT CTTGTTTCG AGCTTTCCCG CCCATCACCT TGTCGACCTT

901 GCCGATTGGG AGCTCACTGA GTCCCCGAT AACGGTTTTT CCTTCAGCAC GTCACATCCT

25 961 TGCGGCTACC TTGTTCCGGA CCCGGCTGTA TCCGAAGGCA AGTGTGGCT TTCCTGCTTT

1021 TTGAGCCAGT CAGCCGAAGT GCTCAGTCGC GAGGCGCATC TGGCTACCGC CTATGGTTAC

1081 CAAACCAAGT GGGGTGTGCC TGGCAAGTAC ATCCAGCGCA GACTTCAAGT TCACGGTCTC

1141 CGTGCTGTGG TCGACCCTGA TGGTCCCATT CACGTTGAAG CATTGTCTTG CCCCAGTCT

1201 TGGATCAGGC ACTTGACCCT GAATGATGAT GTCACCCCGG GATTTCGTTG CCTAATGTCT

30 1261 CTTGCGATTG TGCCGAACAC AGAGCCTACC ACACACCGGA TCTTTCGTTT TGGAGTGCAC

1321 AAGTGGTATG GTGCCGCCGG CAAACGGGCC CGTGGCAAGC GTGCCGCCAA AAGTGAGAAA

1381 GACTCGGCTT CCACCCTCAA GGTTGCCCGA CCGACTTCCA CCAGTGAAT CGTCACCTAC

1441 TCCCACCTG CGGACGGGTC TTGTGGTTGG CATGCCCTTG CCGCCATACT GAACCGGATG

1501 ATTAATAATG ACTTCACGTC CCCTCTGCCT CCGTACAACA GGCCGGAGGA CGATTGGGCT

35 1561 TCTGATGGTG ACCTTGCTCA GGCCATTCAA TGTTTGCAAC TACCTGCCGC CATAGCTCGG

1621 AACCGCGCCT GCCCTAACGC CAAATACCTC ATAAACTCA ACGGAGTCA TTGGGAGGTA

1681 GAGGTGAGGC CTGGAATGGC TCCTCGCTCC CTCTCTCGTG AGTGCGTTGT TGGCGTCTGC

1741 TCTGAAGGCT GTGTGCGCTC GCCTTACCCG GAGGACGGGT TGCCTAAACG TGCACTTGAG

1801 GCCCTGGCGT CTGCTTATAG ACTGCCTTCA GACTGTGTTT GTGATGGTAT TATTGACTTC

ES 2 692 809 T3

1861 CTTGCCAATC CACCTCCCCA GGAGTTCTGG ACTCTTGACA AAATGTTGAC TTCCCCGTCA  
 1921 CCGGAGCAGT CCGGCTTCTC TAGTCTGTAT AAATTGTTGT TAGAGATCTT GCCGCAGAAA  
 1981 TGCGGATCCA CAGAAGGGGA ATTCATCTAT ACTGTTGAGA GGATGTTGAA GGATTGTCCG  
 2041 AGCTCCAAAC AGGCCATGGC CCTCCTTGCA AAAATTAAGG TCCCATCCTC AAAGGCCCCA  
**5** 2101 TCCGTGACTC TGAACGAGTG CTTCCCCACG GATGTTCCAG TCAACTCTGA GTTAATATCT  
 2161 TGGGAAGAGC CCAAAGACCC TGGCGCTGCT GTTGTCTTAT GTCCATCGGA TGCAAAAGAA  
 2221 TCTAAGGAAA CAGCCCCTGA AGAAGCTCAA GCGAGAAACC GTAAGGTCCT TCACCCTGTG  
 2281 GTCCTTACCG AGGAACTTAG CGAGCAACAG GTGCAGGTGG TTGAGGGTGA TCAGGATATG  
 2341 CCACTGGATT TGACTTGGCC AACCTTAACC GCTACGGCGA CCCCTGTTAG AGGGCCGGTA  
**10** 2401 CCGGACAATT TGAGCTCTGG CATTGGTGCC CAGCCCGCTA CCGTTCAAGA ACTCATTTCTG  
 2461 GCGAGGCCTG CACCCCGTCT TGTTGAGCGC TGTGGCACGG AGTCGAACGG CAGCAGTTCA  
 2521 TTTCTGGATT TGCCTGACGT GCAGACCTCG GACCAGCCTT TAGACCTGTC CCTGGCCGCG  
 2581 TGGCCTGTAA GGGCTACCGC GTCTGACCCC GGTGGATCC ACGGTAGGCG TGAGCCTGTC  
 2641 TTTGTGAAGC CTCGAGGTGT TTTCTCTGAT GGCGAGTCGG CCCTTCAGTT CGGAGAGCTT  
**15** 2701 TCCGAAGCCA GTTCTGTCTG CGATGACCGG ACAAAGAAG CTCCGGTGGT TGACGCCCCC  
 2761 ATCGATTTGA CAACTTCGAA CGAGACGCTC TCTGGGTCTG ACCCCTTTGA ATTCGCCAAA  
 2821 TTCAGGCGCC CGCGTTTCTC CGCGCAAGCT TTAATCGACC GAGGTGGTCC GCTTGCCGAT  
 2881 GTTCATGCAA AGATAAAGAG TCGGGTATAT GAACAATGCC TTCAAGCTTG TGAACCTGGT  
 2941 AGTCGTGCGA CCCCAGCCAC CAAGAAGTGG CTCGACAAAA TGTGGGACAG GGTGGACATG  
**20** 3001 AAAACTTGGC GCTGCACCTC GCAGTTCCAA GCTGGTCACA TTCTTGAGTC CCTCAAATTC  
 3061 CTCCCTGACA TGATTCAAGA CACACCGCCT CCTGTTCCCA GGAAGAACCG AGCTGGTGAC  
 3121 AGTGCCGGCC TGAAGCAACT GGTGGCGCAG TGGGATAGGA AATCGAGTGT GACACCCCCC  
 3181 ACAAACCGG TTGGACCGGT GCTTGACCAG GCCGTCCCTC TGCCTATGGA CATCCAGCAA  
 3241 GGAGATGCCA TCTCCGCTGA CAAGCCACCC CATTTCGAAA ACCCTTCTAG TCAAGTAGAT  
**25** 3301 GTGGGTGGAG GTTGAAAAG TTTTATGCTC TCCGGCACCC GTTTCGCGGG GTCCGTTAGT  
 3361 CAGCGCCTTA CGACATGGGT TTTTGAGGTT CTCTCCCATC TCCCAGCTTT TATGCTCACA  
 3421 CTTTTCTCGC CACGGGGCTC TATGGCTCCA GGTGATTGGC TGTTTGCAGG TGCTGTTCTA  
 3481 CTTGCTCTCC TGCTCTGCCG TTCTTACCCA ATACTCGGAT GCCTTCCCTT ATTGGGTGTC  
 3541 TTTTCTGGTT CTGTGCGGTG TGTTCGTTTG GGTGTTTTTG GTTCTTGAT GGCTTTTGCT  
**30** 3601 GTATTTTTTAT TCTCGACTCC ACCCGACCCA GTCGGTTCTT CTTGTGACCA CGATTCGCCG  
 3661 GAGTGTGATG CTGAGCTTTT GGCTCTTGAG CAGCGCCAAC TTTGGGAACC TGTGCGCAGC  
 3721 CTTGTGGTCG GGCCATCGGG CCTCTTATGC GTCATTCTTG GCAAGTACT CGGTGGGTCA  
 3781 CGTTGTCTCT GGTGTTGTTCT CCTACGTATA TGCATGCTCG CAGATTTGGC AATTTCTCTT  
 3841 ATTTATGTGG TGTCCAAGG GCGTTGTGAC AAGTGTGGG GAAAGTGTAT AAGGACGGCT  
**35** 3901 CCTGCAGAAG TGGCCCTTAA TGTGTTTCTT TTTTCGCGCG CCACCCGCTC ATCTCTTGTC  
 3961 TCCTTGTGTG ATCGGTTCCA AGCGCCAAAA GGAGTTGACC CCGTGCACTT GGCGACAGGC  
 4021 TGGCGCGGGT GCTGGTGTGG TGAGAGCCCT ATTCATCAAT CACACCAAAA ACCGATAGCT

ES 2 692 809 T3

4081 TATGCCAACT TGGATGAAAA GAAGATATCC GCCCAGACGG TGATTGCTGT CCCGTATGAT  
4141 CCTAGTCAGG CCATTAATG CCTGAAAGTT TTGCAGGCAG GAGGGGCTAT TGTGGACCAG  
4201 CCTACGCCCG AGGTCGTCCG TGTGTCTGAG ATTCCCTTCT CGGCCCCATT TTTTCCGAAG  
4261 GTCCCAGTCA ACCCAGACTG CAGGGTTGTG GTAGATTTCG ACACTTTTGT GGCTGCGGTC  
**5** 4321 CGCTGCGGTT ATTCGACAGC ACAACTGGTC CTTGGTCGGG GCAACTTTGC CAAGCTAAAT  
4381 CAGACCCCC TCAGGAATC TGTCCCCACC AAAACAACG GTGGGGCCTC ATACACCCTT  
4441 GCCGTGGCCC AGGTATCTGT GTGGACTCTT GTTCATTTCA TCCTCGGCCT TTGGTTAACG  
4501 TCACCTCAAG TGTGTGGTCG AGGGACCTCT GACCCGTGGT GTTCGAACCC TTTTTCGTAT  
4561 CCTACTTATG GCCCCGGAGT TGTGTGTTC TCTCGACTCT GCGTGTCTGC CGACGGAGTT  
**10** 4621 ACCCTGCCAT TGTTCTCAGC CGTTGCCCAT CTTTCCGGTA GAGAGGTGGG GATTTTTTAT  
4681 TTGGTGCTTG CCTCCTTGGG CGCTTTAGCC CACCGCTTGG CTCTTAAGGC AGACATGTCA  
4741 ATGGTCTTTT TGGCGTTTTG TGCTTACGCC TGGCCCATGA GCTCCTGGTT AATTTGCTTC  
4801 TTTCTATGC TCTTGAGGTG GGTAACCCTT CATCCTCTCA CTATGCTTTG GGTGCACTCA  
4861 TTTTGGTGT TTTGCCTACC AGCTGCCGGC GTTCTCTCGC TGGGAATAAC CGGTCTTCTT  
**15** 4921 TGGGCAGTTG GCCGTTTCAC CCAGGTTGCC GGAATTATCA CACCTTATGA CATCCACCAG  
4981 TATACCTCCG GACCACGTGG TGCAGCTGCT GTAGCAACGG CTCCAGAAGG TACTTACATG  
5041 GCGGCCGTTT GGAGAGCCGC TTTGACTGGA CGGACTTTGA TCTTCACACC ATCTGCAGTC  
5101 GGATCCCTTC TTGAAGGTGC TTTCAGAACT CAAAAGCCCT GCCTAACAC CGTGAATGTC  
5161 GTAGGCTCTT CCCTTGGTTC TGGAGGAGTT TTCACCATTG ATGGCAGAAG AGTCATCGTC  
**20** 5221 ACTGCCACCC ATGTGTTGAA TGGTAACACA GCCAGGGTCA CTGGTGATTC CTACAACCGC  
5281 ATGCACACGT TCAATACTAA TGGTGATTAT GCCTGGTCCC ATGCTGATGA CTGGCAAGGC  
5341 GTTGCCCCTA TGGTTAAGAT CGCTAAGGGG TATCGCGGTC GTGCCTACTG GCAAACGTCA  
5401 ACCGGAGTCG AACCTGGCAT CATGGGGGAA GGATTCGCCT TCTGTTTCAC TAACTGTGGC  
5461 GACTCAGGGT CACCTGTCAT TTCAGAAGCT GGTGACCTTA TTGGAGTCCA TACCGGTTCA  
**25** 5521 AACAACTCG GTTCTGGTCT TGTGACAACC CCTGAAGGGG AGACCTGCTC CATCAAGGAA  
5581 ACTAGGCTCT CTGACCTTTC TAGACATTTT GCAGGTCCAA GCGTCCCTCT TGGGGACATT  
5641 AAGTTGAGCC CAGCCATCAT CCCTGATGTG ACAACTATTC CGAGTGAATT GGCATCGCTC  
5701 CTTGCTTCTG TCCCCGTGAT GGAAGGTGGC CTCTCAACTG TCCAGCTTTT GTGCGTCTTT  
5761 TTCCTTCTCT GCGCATGAT GGGCCATGCC TGGACACCCA TTGTTGCCGT AGGCTTCTTT  
**30** 5821 TTGCTGAATG AAATTCCTCC AGCAGTCTTG GTCCGAGCTG TGTTCTCTTT TGCCTCTTT  
5881 GTACTIONCAT GGGCCACCCC CTGGTCGGCA CAAGTGTGTA TGATTAGACT CCTCACGGCG  
5941 GCTCTCAACC GCAACAGGTT GTCCCTGGCG TTCTACGCAT TCGGAGGTGT CGTTGGCCTG  
6001 GCCACAGAAA TCGGGACTTT TGCTGGTGGG TGGCCTGAAC TGTCCCAAGC CCTCTCGACA  
6061 TACTGCTTCC TGCCAGGTT CCTTGCTGTG ACTAGTTATG TCCCACCAT CATCATCGGT  
**35** 6121 GGGCTCCATG CCCTCGGCGT AATTTTGTGG TTATTCAAAT ACCGATGCCT CCACAACATG  
6181 CTGGTTGGTG ATGGGAGTTT CTCAAGCGCT TTCTTCTTAC GGTATTTTGC TGAGGGTAAT  
6241 CTTAGGAAAG GCGTGTGCGA GTCCTGTGGC ATGAATAACG AATCCCTGAC AGCTGCTTTG

## ES 2 692 809 T3

6301 GCTTGCAAGT TGTCGCAAGC TGACCTTGAT TTTTGTGCCA GTTTAACGAA CTTCAAGTGC  
 6361 TTTGTGTCCG CTTCAAACAT GAAAAATGCA GCTGGCCAAT ACATCGAGGC GGCATATGCT  
 6421 AGAGCTCTGC GTCAGGAGCT GGCCTCCTTG GTTCAGGTTG ACAAGATGAA AGGAGTATTG  
 6481 GCCAAGCTCG AGGCTTTTCGC TGAGACGGCC ACTCCGTAC TTTGACACAGG GGACGTGATT  
**5** 6541 GTTCTGCTTG GGCAACACCC CCATGGATCC ATCCTCGACA TTAATGTGGG GGGTCAAAGG  
 6601 AAAACTGTGT CTGTGCAAGA AACACGATGC CTGGGTGGTT CCAAATTCAG TGTCTGCACT  
 6661 GTCGTGTCCA ACACGCCCGT GGATACCTTG ACCGGTATCC CACTTCAGAC GCCAACCCCA  
 6721 CTTTTTAAAA ATGGCCCCGC CCATCGCAGC GAGGACGACG ACCTCAAAGT TGAGAGAATG  
 6781 AAAAAACACT GTGTATCCCT CGGCTTCCAC AAAATCAATG GTAAAGTTTA CTGCAAAATT  
**10** 6841 TGGGACAAGT CTAACGGCGA CACCTTTTAC ACGGATGATT CCCGATACAC TCAAGACCAT  
 6901 GCTTTTCAGG ACAGGTCAAC CGACTATAGA GACAGGGATT ATGAAGGTGT ACAGACCGCC  
 6961 CCCAACAGG GATTTCGATCC AAAGTCCGAA GCCCCTGTTG GCACTGTTGT AATCGGTGGC  
 7021 ATTACGTATA ACAGGCATCT GGTCAAAGGT AAGGAGGTCC TAGTTCCCAA ACCTGACAAC  
 7081 TGCCTTGAAG CTGCCAGACT GTCCCTTGAG CAAGCTCTTG CTGGGATGGG CCAAACCTGT  
**15** 7141 GACCTTACAG CTACCGAAGT GGAGAAACTA AAGCGCATCA TTAGTCAACT CCAAGGTCTG  
 7201 ACCACTGAAC AGGCTTTAAA CTGCTAG

### SEQ ID NO:20 Nucleótido que codifica ORF1B del PRRSV atenuado 94881

7209 AC AGGCTTTAAA CTGCTAGCCG CCAGCGGCTT GACCCGCTGT GGCCGCGGCG  
 7261 GCCTAGTTGT AACTGAAACG GCGGTAAAAA TCGTAAAATA CCACAGCAGA ACTTTACCT  
**20** 7321 TAGGCTCTTT AGACCTAAAA GTCACCTCCG AGGTGGAGGT GAAGAAATCA ACTGAGCAGG  
 7381 GGCACGCTGT CGTGGCGAAC TTATGTTCCG GTGTCGTCTT GATGAGGCCT CACCCACCGT  
 7441 CCCTTGTGTA CGTTCTCCTC AAACCCGGAC TTGACACAAC ACCCGGCATT CAACCAGGGC  
 7501 ATGGGGCCGG GAATATGGGC GTGAACGGTT CTATTTGGGA TTTTGAAACT GCACCCACAA  
 7561 AGGTAGAACT AGAGTTGTCC AAGCAAATAA TCCAAGCATG TGAAGTCAGG CGCGGGGACG  
**25** 7621 CCCCTAACCT CCAACTCCCC TACAAGCTTT ATCCTGTCAG GGGGACCCC GAGCGGCGTA  
 7681 AAGGTCGCCT TGTCAACACT AGGTTTGGAG ATTTACCTTA CAAAAC'TCCC CAAGACACCA  
 7741 AGTCCGCAAT TCATGCGGCT TGTTGCCTGC ATCCCAATGG GGTCCTCGTG TCTGATGGCA  
 7801 AATCCACGCT GGGTACCACT CTTCAACATG GTTTCGAGCT TTATGTCCC ACTGTACCTT  
 7861 ATAGTGTGAT GGAATACCTT GATTCACGCC CTGACACCCC TTTTATGTGT ACTAAACATG  
**30** 7921 GCACTTCCAA GGCTGCTGCA GAGGACCTCC AAAAAATATGA CCTATCCACT CAAGGGTTTG  
 7981 TCTTGCCTGG GGTCTACGC CTAGTGCGCA GGTTTATCTT TAGCCATGTT GGTAAGGCGC  
 8041 CACCACTGTT CCTTCCATCA ACCTACCCTG CCAAGAATC CATGGCAGGG GTCAATGGCC  
 8101 AGAGGTTCCC AACAAAGGAT GTCCAGAGCA TACCTGAAAT TGATGAAATG TGCGCCCGTG  
 8161 CCGTCAAGGA AAATTGGCAG ACTGTGACAC CTTGCACCCT CAAAAACAG TACTGTTCCA  
**35** 8221 AACCTAAAAC TAGAACCATC CTAGGTACCA ACAACTTCAT AGCCTTGGCT CACAGGTCAG  
 8281 CACTCAGTGG TGTCAACCCAG GCGTTCATGA AGAAGGCCTG GAAGTCCCCA ATTGCCTTGG  
 8341 GGAAAAACAA GTTTAAGGAA TTGCATTGCA CTGTCGCCGG CAGATGCCTT GAGGCTGACC

ES 2 692 809 T3

8401 TGGCTTCCTG CGATCGCAGC ACCCCCGCCA TTGTGAGGTG GTTTGTGTGCC AACCTCCTGT  
 8461 ATGAACTTGC AGGATGTGAA GAGTACTTGC CTAGCTACGT GCTCAACTGT TGCCATGACC  
 8521 TTGTGGCAAC GCAGGATGGC GCTTTTACAA AACGCGGTGG CCTGTCTGTC GGGGACCCCG  
 8581 TCACCAGTGT GTCCAACACC GTCTACTCAC TGATAATTTA CGCCCAGCAC ATGGTGCTTT  
**5** 8641 CGGCCTTGAA GATGGGTCAT GAAATTGGTC TCAAGTTCCT TGAGGAACAG CTCAAATTTG  
 8701 AGGACCTTCT TGAAATCCAG CCCATGTTAG TGTATTCTGA TGACCTCGTC TTGTATGCGG  
 8761 AAAGACCCAC TTTTCCCAAC TACCATTGGT GGGTCGAGCA TCTTGACCTG ATGTTGGGCT  
 8821 TTAAAACGGA CCCAAAGAAA ACTGTCATAA CTGATAAACC CAGTTTTTCTC GGCTGCAGAA  
 8881 TTGAAGCAGG ACGGCAGTTA GTCCCAATC GCGACCGTAT TCTGGCTGCT CTTGCATATC  
**10** 8941 ATATGAAGGC GCAGAACGCC TCAGAGTATT ATGCGTCCGC TGCCGCAATT CTGATGGATT  
 9001 CGTGTGCTTG CATTGACCAT GACCCCGAGT GGTATGAGGA TCTTATCTGC GGCATCGCCC  
 9061 GGTGTGCTCG CCAGGACGGT TACCGTTTTT CAGGCCCGGC ATTTTTTCATG TCCATGTGGG  
 9121 AGAAGCTGAA AAGTCATAAT GAAGGGAAGA AATGCCGTCA CTGCGGCATC TGCGACGCCA  
 9181 AAGCCGACTA TCGTCCGCC TGTGGACTTG ATTTGTGTTT GTTCCATTCA CACTTTCATC  
**15** 9241 AACACTGCCC AGTCACCTCT AGCTGTGGCC ACCATGCCGG TTCAAAGGAA TGTTTCGAGT  
 9301 GTCAGTCACC TGTCGGGGCT GGCAAATCCC CCCTTGACGC TGTGCTGAAA CAAATCCCGT  
 9361 ACAAACCTCC TCGTACCATT ATCATGAAGG TGGACAACAA AACAACGACC CTTGACCCGG  
 9421 GAAGATATCA GTCCCGTCGA GGTCTTGTG CAGTCAAAG AGGTATTGCA GGTAATGAGG  
 9481 TTGATCTTTC TGATGGAGAC TACCAAGTGG TGCCTCTTTT GCCGACTTGC AAAGACATAA  
**20** 9541 ACATGGTGAA GGTGGCTTGC AACGTACTAC TCAGCAAGTT TATAGTAGGG CCGCCAGGTT  
 9601 CCGGAAAAAC CACCTGGCTA CTGAACCAAG TCCAGGACGA TGATGTCATT TACACACCTA  
 9661 CTCATCAGAC AATGTTTGAC ATAGTCAGTG CTCTTAAAGT TTGCAGGTAT TCCATCCCAG  
 9721 GAGCCTCAGG ACTCCCTTTT CCACCACCTG CCAGGTCCGG GCCGTGGGTT AGGCTCATCG  
 9781 CCAGCGGACA TGTCCCTGGC CGAGTGTCAT ATCTCGATGA GGCAGGATAT TGCAATCATC  
**25** 9841 TAGACATTCT AAGGCTGCTT TCCAAAACAC CCCTTGTGTG TTTGGGTGAC CTTTCAGCAAC  
 9901 TTCACCCGGT CGGCTTTGAT TCCTATTGTT ATGTGTTCTGA TCAGATGCCT CAGAAGCAGC  
 9961 TGACCACCAT TTATAGATTT GGCCCTAACA TCTGTGCAGC CATCCAGCCT TGTTACAGGG  
 10021 AGAAACTTGA ATCCAAGGCC AGGAACACCA GAGTGGTTTT CACCACCCGG CCTGTGGCCT  
 10081 TTGGTCAGGT CCTGACACCG TACCACAAAG ATCGTACCGG CTCTGCAATA ACTATAGATT  
**30** 10141 CATCCAGGG GGCACCTTC GACATTGTGA CATTGCATCT ACCATCGCCA AAGTCCCTAA  
 10201 ACAAATCCCG AGCACTTGTA GCCATCACTC GGGCAAGACA TGGGTTGTTC ATTTATGACC  
 10261 CTCATGACCA ACTCCAGGAG TTTTTCAACT TAACCCCGA GCGCACTGAT TGTAACCTTG  
 10321 CGTTCAGCCG TGGGGATGAG CTGGTTGTTT TGAATGTGGA TAATGCGGTC ACAACTGTAG  
 10381 CGAAGGCCCT AGAGACAGGT TCACCCCGAT TTCAGATATC GGACCCGAGG TGCAAGTCTC  
**35** 10441 TCTTAGCCGC TTGTTCCGCC AGTCTAGAAG GGAGCTGCAT GCCACTACCA CAAGTAGCAC  
 10501 ATAACCTGGG GTTTTACTTT TCCCCGGACA GCCCAGCTTT TGCACCCCTG CCAAAGAGC  
 10561 TGGCGCCACA TTGGCCAGTG GTCACCACC AGAATAATCG AGCGTGGCCT GATCGACTTG

## ES 2 692 809 T3

10621 TCGCTAGTAT GCGCCCAATT GATGCCCGCT ACAGCAAGCC AATGGTCGGT GCAGGGTATG  
 10681 TGGTCGGGCC ATCCATTTTT CTTGGCACTC CTGGTGTGGT GTCATACTAT CTCACATTAT  
 10741 ACATCGGGGG CGAGCCTCAG GCCCTGCCAG AAACACTCGT TTCAACAGGA CGTATAGCCA  
 10801 CAGATTGTTC GGAATATCTC GACGCGGCTG AGGAAGAGGC AGCGAGAGAA CTTCCCCACG  
**5** 10861 CATTATTTGG CGATGTCAAA GGCCTACGA TCGGGGGGTG TCACCACATT ACATCGAAAT  
 10921 ACCTACCTAG GTCCCTGCCT AAAGACTCTG TTGCTGTGGT TGGGGTGAGT TCGCCCGGTA  
 10981 GGGCTGCTAA AGCCGTGTGC ACTCTCACCG ATGTGTACCT CCCCGAAGTC CGACCATATT  
 11041 TGCAACCGGA GACGGCATCA AAATGCTGGA AACTTAAACT GGATTTTCAGG GATGTTTCGAC  
 11101 TGATGGTCTG GAAAGGCGCC ACAGCCTATT TCCAGTTGGA AGGGCTGACA TGGTCAGCGC  
**10** 11161 TGCCCCGATTA TGCTAGGTTT ATTCAGCTAC CCAAGGATGC CGTTGTGTAC ATCGATCCGT  
 11221 GTATAGGGCC GGCAACAGCC AATCGCAAGG TTGTGCGAAC CACAGACTGG CGGGCCGACC  
 11281 TGGCAGTGAC ACCGTATGAT TACGGTGCTC AGGTCATTTT GACAACAGCC TGGTTCGAGG  
 11341 ACCTTGGGCC GCAGTGGAAG ATTTTGGGGT TGCAGCCTTT CAGACGAACA TTTGGCTTTG  
 11401 AGAACACTGA AGATTGGGCA ATTCTCGCAC GCCGTATGAA TGACGGCAA GATTACACTG  
**15** 11461 ACTATAATTG GCATTGTGTA CGAGAAGCC CACACGCAAT TTACGGGCGC GCCCGTGACC  
 11521 ATACGTATCA TTTTGCCCTT GGCCTGAAC TGCAAGTAGA GCTGGGCAGA CCCC GGCTGC  
 11581 CTCCTGAGCA AGTGCCGTGA

### SEQ ID NO:21 Nucleótido que codifica ORF2 del PRRSV atenuado 94881

11611 ATGCAATGGG TTTACTGTGG AGTAAAATCA  
**20** 11641 GTCAGTTGTT CGTGGATGCC TTCCTGAGT TCCTTGTTAG TGTGGTTGAC ATTGTCATCT  
 11701 TTCTCGCCAT ATTGTTTGGG TTCCTGTTG CAGGCTGGTT ATTGGTCTTC CTTCTCAGAG  
 11761 TGGTTTGCTC CGCGTTTCTC CGTTCGCGCT CTGCCATTCA CTCTTCCGAA CTATCGAAGG  
 11821 TCCTATGAGG GCTTGCTACC CAACTGCAGA CCGGATGTCC CACAATTCGC AGTTAAGCAC  
 11881 CCGTTGGGTA TACTTTGGCA TATGCGAGTC TCCCACCTAA TTGACGAAAT GGTCTCTCGC  
**25** 11941 CGCATTTACC GGACCATGGA ACATTCGGGT CAAGCGGCCT GGAAGCAGGT TGTTAGTGAA  
 12001 GCCACTCTCA CAAAACGTGC AAGGCTTGAC GTAGTCACTC ATTTCCAACA CCTGGCCGCA  
 12061 GTGGAGGCTG ATTCTTGCCG CTTCTTAGC TCACGACTCG CGATGCTGAA AAACCTTGCC  
 12121 GTTGGCAATG TGAGCCTGGA GTACAACACT ACTTTGGACC GCGTTGAGCT CATCTTTCCC  
 12181 ACACCAGGTA CGAGGCCCAA GTTGACCGAT TTTAGGCAAT GGCTTATCAG CGTGCACGCT  
**30** 12241 TCCATCTTCT CCTCTGTGGC TTCGTCTGTT ACCTTGTTCA CAGTGCTTTG GCTTCGAATT  
 12301 CCAGCTCTAC GCTATGTTTT TGGTTTCCAT TGGCCCACGG CAACACATCA TTCGAACTAA

### SEQ ID NO:22 Nucleótido que codifica ORF3 del PRRSV atenuado 94881

12219 AT GGCTTATCAG CGTGCACGCT  
 12241 TCCATCTTCT CCTCTGTGGC TTCGTCTGTT ACCTTGTTCA CAGTGCTTTG GCTTCGAATT  
**35** 12301 CCAGCTCTAC GCTATGTTTT TGGTTTCCAT TGGCCCACGG CAACACATCA TTCGAACTAA  
 12361 CTATCAATTA CACTATATGT AAGCCATGCC CTACCAGTCA AGCTGCCCAA CAAAGACTCG  
 12421 AGCCTGGCCG TAACGTGTGG TGCAAAATAG GGCACGACAG GTGTGAGGAA CGTGACCATG

# ES 2 692 809 T3

12481 ATGAGTTGTC AATGTCCATT CCGTCCGGGT ACGACAACCT CAAACTTGAG GGTTATTATG  
12541 CTTGGCTGGC TTTTTTGTCC TTTTCCTACG CGGCCCAATT CCATCCGGAG CTGTTTCGGAA  
12601 TAGGAAACGT GTCGCGCGTC TTTGTGGATA AGCGACACCA GTTCATTTGC GCCGAGCATG  
12661 ATGGACAAAA TTCAACCATA TCTGCCAGAC ACAACATCTC CGCGTCGTAT GCGGTGTATT  
5 12721 ACCATCATCA AATAGACGGG GGCAATTGGT TTCATTTGGA ATGGCTGCGA CCATTCTTTT  
12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT  
12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCCT  
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT  
12961 CAGGAGGTCG TCCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAA  
10 **SEQ ID NO:23 Nucleótido que codifica ORF4 del PRRSV atenuado 94881**  
12761 ATGGCTGCGA CCATTCTTTT  
12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT  
12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCCT  
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT  
15 12961 CAGGAGGTCG TCCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAACGGC  
13021 TAATGTGACC GATGAATCGT ATTTGTACAA CGCGGACTTG CTGATGCTTT CCGCGTGCCT  
13081 TTTCTACGCC TCGGAAATGA GCGAGAAAGG CTTCAAAGTC ATCTTTGGGA ATATTTCTGG  
13141 CGTTGTTTCC GCTTGTGTTA ATTTACAGTA TTATGTGGCC CATGTGACCC AACACACTCA  
13201 GCAGCACCAT TTGGTAATTG ATCACATTCG GTTACTACAC TTCTTGACAC CGTCTACGAT  
20 13261 GAGGTGGGCT ACAACCATTG CTTGTTTGCT TGCCATTCTT TTGGCGGTAT GA  
**SEQ ID NO:24 Nucleótido que codifica ORF5 del PRRSV atenuado 94881**  
13309 AT GAAATGTTCT  
13321 TGCAAGTTGG GGCATTTCTT GACTCCTCAC TCTTGCTTCT GGTGGCTTTT TTTGCTGTGT  
13381 ACCGGCTTGT CTTGGTCCTT TGTCGATGGC AACGACGACA GCTCGACATC CCAATACATA  
25 13441 TATAATTTGA CGATATGCGA GCTGAATGGG ACCGAATGGT TGTCCGGTCA TTTTGATTGG  
13501 GCAGTCGAAA CCTTTGTGCT TTACCCAGTT GCCACTCATA TCATTTCACT GGGTTTTTCTC  
13561 ACAACAAGCC ATTTCCCTGA TGCCTCGGT CTCGGCGCTG TGTCCGCCAC AGGATTCATT  
13621 GGCGAGCGGT ATGTACTTAG CAGCATGTAC GCGTTTGCG CCTTCGCGGC GTTCGTATGT  
13681 TTTGTATACC GTGCTGCTAA AAATTGCATG GCTTGCCGCT ATGCCCGCAC CCGGTTTACC  
30 13741 AACTTCATCG TGGACGACCG GGAAGAATC CATCGATGGA AGTCTTCAAT AGTGGTGGAG  
13801 AAATTGGGCA AAGCTGAAGT CCGTGGTGAC CTTGTCAACA TTAAGCATGT TGTCCTCGAA  
13861 GGGGTTAAAG CTCAACCTTT GACGAGGACT TCGGCTGAGC AATGGGAAGC CTAG  
**SEQ ID NO:25 Nucleótido que codifica ORF6 del PRRSV atenuado 94881**  
13902 ATGGGAAGC CTAGACGACT  
35 13921 TTTGCAACGA TCCCACCGCC GCACAAAAAC TCGTGCTGGC CTTTAGCATC ACATATACAC  
13981 CCATAATGAT ATACGCCCTT AAGGTGTAC GCGGCCGACT CCTGGGGCTG TTGCACATCT  
14041 TGATATTTCT GAATTGTTCC TTTACTTTTG GGTACATGAC ATATGTGCAT TTTCAATCCA



## ES 2 692 809 T3

14101 CCAACCGTGT CGCATTCACT CTGGGGGCTG TAGTCGCCCT TTTGTGGGGT GTTTACAGCC  
 14161 TCACAGAGTC ATGGAAGTTC ATCACTTCCA GATGCAGATT GTGTTGCCTA GGCCGGCGAT  
 14221 ACATTCTGGC CCCTGCCCCAT CACGTAGAAA GTGCTGCAGG CCTCCATTCA ATCCCAGCGT  
 14281 CTGGTAACCG AGCATACGCT GTGAGAAAAG CCGGACTAAC ATCAGTGAAC GGCACCTAG  
 5 14341 TACCTGGGCT TCGGAGCCTC GTGCTGGGCG GCAAACGAGC TGTTAAACGA GGAGTGGTTA  
 14401 ACCTCGTCAA GTATGGCCGG TAA

### SEQ ID NO:26 Nucleótido que codifica ORF7 del PRRSV atenuado 94881

14413 ATGGCCGG TAAGAACCAG AGCCAGAAGA AAAGAAGAAA TGCAGCTCCG  
 14461 ATGGGGAAAG GCCAGCCAGT CAATCAACTG TGCCAGTTGC TGGGTACAAT GATAAAGTCC  
 10 14521 CAGCGCCAGC AATCTAGGGG AGGACAGGCC AAAAAGAAGA AGCCTGAGAA GCCACATTTT  
 14581 CCCCTAGCTG CTGAAGATGA CATTCCGGCAC CATCTCACCC AGGCCGAACG TTCCCTCTGC  
 14641 TTGCAATCGA TCCAGACGGC TTTCAATCAA GCGCAGGAA CTGCGTCCGCT TTCATCCAGC  
 14701 GGAAGGTCA GTTTCCAGGT TGAGTTCATG CTGCCGGTTG CTCATACAGT GCGCCTGATT  
 14761 CGCGTGACTT CTACATCCGC CAGTCAGGGT GCAAATTAAT TTGACAGTCA GGTGAATGGC  
 15 14821 CGCGATTGAC GTGTGGCCTC TAA

### SEQ ID NO:27 Nucleótido que codifica ORF1a del PRRSV atenuado 94881

178 ATG  
 181 TCTGGGATGT TCTCCCGGTG CATGTGCACC CCGGCTGCCC GGGTATTTTG GAACGCCGGC  
 241 CAAGTCTATT GCACACGGTG TCTCAGTGCA CCGTCTCTTC TCTCTCCAGA ACTTCAGGAC  
 20 301 ACGGACCTCG GTGCAGTTGG CTTGTTTTAC AAGCCTAAAG ACAAGCTCCA TTGAAAGTT  
 361 CCCATTGGTA TCCCCAGGT GGAATGTTCT CCATCTGGGT GTTGCTGGCT GTCAACCATT  
 421 TTTCTTTAG CGCGCATGAC CTCCGGCAAT CACAACCTCC TTCAACGACT CGTGAAGGTT  
 481 GCTGACGTAT TGTACCGTGA CGGTTGCTTA ACCCCTAGAC ACCTCCGTGA ACTCCAAGTT  
 541 TACGAGCGTG GTTGCAATTG GTATCCGATT ACGGGCCTG TGCCTGGGAT GGCTGTGTAC  
 25 601 GCGAACTCCA TGCACGTGTC CGACCAACCG TTCCCTGGTG CCACTCATGT GTTAACAAAT  
 661 TCCCCTTTGC CTCAACGGGC TTGTCCGGCAG CCGTTCGTGC CGTTCGAAGA GGCCCATCTT  
 721 AGCATATACA GGTGGGAAAA ATTTGTAATT TTTATGGATT CCTCTCCGA CGGTCGATCT  
 781 CGCATGATGT GGAATCCGGA ATCCGATGAC TCCACGGCTT TGGAAGTTCT GCCGCCGAG  
 841 CTAGAACACC AGGTCAAGGT CCTTGTTCGG AGCTTTCCCG CCCATCACCT TGTCGACCTT  
 30 901 GCCGATTGGG AGCTCACTGA GTCCCCTGAG AACGGTTTTT CCTTCAGCAC GTCACATCCT  
 961 TGCGGCTACC TTGTTCCGGG CCCGGCTGTA TCCGAAGGCA AGTGTGGGCT TTCCTGCTTT  
 1021 TTGAGCCAGT CAGCCGAAGT GCTCAGTCGC GAGGCGCATC TGGCTACCGC CTATGGTTAC  
 1081 CAAACCAAGT GGGGTGTGCC TGGCAAGTAC ATCCAGCGCA GACTTCAAGT TCACGGTCTC  
 1141 CGTGCTGTGG TCGACCCTGA TGGTCCCATT CACGTTGAAG CATTGTCTTG CCCCCAGTCT  
 35 1201 TGGATCAGGC ACTTGACCTT GAATGATGAT GTCACCCCGG GATTTCGTTG CCTAATGTCT  
 1261 CTTCGCATTG TGCCGAACAC AGAGCCTACC ACACACCGGA TCTTTCGTTT TGGAGTGCAC  
 1321 AAGTGGTATG GTGCCGCCGG CAAACGGGCC CGTGGCAAGC GTGCCGCCAA AAGTGAGAAA

ES 2 692 809 T3

1381 GACTCGGCTT CCACCCTCAA GGTGCCCCGA CCGACTTCCA CCAGTGGAAAT CGTCACCTAC  
 1441 TCCCCACCTG CGGACGGGTC TTGTGGTTGG CATGCCCTTG CCGCCATACT GAACCGGATG  
 1501 ATTAATAATG ACTTCACGTC CCCTCTGCCT CGGTACAACA GGCCGGAGGA CGATTGGGCT  
 1561 TCTGATGGTG ACCTTGCTCA GGCCATTCAA TGTTTGCAAC TACCTGCCGC CATAGCTCGG  
**5** 1621 AACCGCGCCT GCCCTAACGC CAAATACCTC GTAAACTCA ACGGAGTTCA TTGGGAGGTA  
 1681 GAGGTGAGGC CTGGAATGGC TCCTCGCTCC CTCTCTCGTG AGTGC GTTGT TGGCGTCTGC  
 1741 TCTGAAGGCT GTGTCGCGTC GCCTTACCCG GAGGACGGGT TGCCTAAACG TGCACTTGAG  
 1801 GCCCTGGCGT CTGCTTATAG ACTGCCTTCA GACTGTGTTT GTGATGGTAT TATTGACTTC  
 1861 CTTGCCAATC CACCTCCCCA GGAGTTCTGG ACTCTTGACA AAATGTTGAC TTCCCCGTCA  
**10** 1921 CCGGAGCAGT CCGGCTTCTC TAGTCTGTAT AAATTGTTGT TAGAGGTCTT GCCGCAGAAA  
 1981 TGCGGATCCA CAGAAGGGGA ATTCATCTAT ACTGTTGAGA GGATGTTGAA GGATTGTCCG  
 2041 AGCTCCAAAC AGGCCATGGC CCTCCTTGCA AAAATTAAGG TCCCATCCTC AAAGGCCCCA  
 2101 TCCGTGACTC TGAACGAGTG CTTCCCCACG GATGTTCCAG TCAACTCTGA GTTAATATCT  
 2161 TGGGAAGAGC CCAAAGACCC TGGCGCTGCT GTTGTCTTAT GTCCATCGGA TGCAAAAGAA  
**15** 2221 TCTAAGGAAA CAGCCCTGA AGAAGCTCAA GCGAGAAACC GTAAGGTCCT CCACCCTGTG  
 2281 GTCCTTACCG AGGAACCTAG CGAGCAACAG GTGCAGGTGG TTGAGGGTGA TCAGGATATG  
 2341 CCACTGGATT TGACTTGCC AACCTTAACC GCTACGGCGA CCCCTGTTAG AGGGCCGGTA  
 2401 CCGGACAATT TGAGCTCTGG CATTGGTGCC CAGCCCGCTA CCGTTCAAGA ACTCATCTG  
 2461 GCGAGGCCTG CACCCCGTCT TGTTGAGCGC TGTGGCACGG AGTCGAACGG CAGCAGTTCA  
**20** 2521 TTTCTGGATT TGCCTGACGT GCAGACCTCG GACCAGCCTT TAGACCTGTC CCTGGCCGCG  
 2581 TGGCCTGTAA GGGCTACCGC GTCTGACCCC GGTGATCC ACGGTAGGCG TGAGCCTGTC  
 2641 TTTGTGAAGC CTCGAGGTGT TTTCTCTGAT GGCGAGTCGG CCCTTCAGTT CGGAGAGCTT  
 2701 TCCGAAGCCA GTTCTGTGCT CGATGACCGG ACAAAGAAG CTCCGGTGGT TGACGCCCCC  
 2761 ATCGATTTGA CAACTTCGAA CGAGACGCTC TCTGGGTCTG ACCCCTTGA ATTCGCCAAA  
**25** 2821 TTCAGGCGCC CGCGTTTCTC CGCGCAAGCT TTAATCGACC GAGGTGGTCC GCTTGCCGAT  
 2881 GTTCATGCAA AGATAAAGAG TCGGGTATAT GAACAATGCC TTCAAGCTTG TGAACCTGGT  
 2941 AGTCGTGCGA CCCAGCCAC CAAGAAGTGG CTCGACAAA TGTGGGACAG GGTGGACATG  
 3001 AAAACTTGGC GCTGCACCTC GCAGTTCCAA GCTGGTCACA TTCTTGAGTC CCTCAAATTC  
 3061 CTCCCTGACA TGATTCAAGA CACACCGCCT CCTGTTCCA GGAAGAACCG AGCTGGTGAC  
**30** 3121 AGTGCCGGCC TGAAGCAACT GGTGGCGCAG TGGGATAGGA AATTGAGTGT GACACCCCC  
 3181 ACAAACCGG TTGGACCGGT GCTTGACCAG ACCGTCCCTC TGCCTATGGA CATCCAGCAA  
 3241 GAAGATGCCA TCTCCGCTGA CAAGCCACCC CATTGCAAAA ACCCTTCTAG TCAAGTAGAT  
 3301 GTGGGTGGAG GTTGAAAAG TTTTATGCTC TCCGGCACCC GTTTCGCGGG GTCCGTTAGT  
 3361 CAGCGCCTTA CGACATGGGT TTTTGAGGTT CTCTCCCATC TCCCAGCTTT TATGCTCACA  
**35** 3421 CTTTTCTCGC CACGGGGCTC TATGGCTCCA GGTGATTGGC TGTTTGCAGG TGCTGTTCTA  
 3481 CTTGCTCTCC TGCTCTGCCG TTCTTACCCA ATACTCGGAT GCCTTCCCTT ATTGGGTGTC  
 3541 TTTTCTGGTT CTGTGCGGTG TGTTGTTTG GGTGTTTTTG GTTCTTGAT GGCTTTTGCT

ES 2 692 809 T3

3601 GTATTTTTAT TCTCGACTCC ACCCGACCCA GTCGGTTCTT CTTGTGACCA CGATTGCGCCG  
 3661 GAGTGTGATG CTGAGCTTTT GGCTCTTGAG CAGCGCCAAC TTTGGGAACC TGTGCGCAGC  
 3721 CTTGTGGTGC GGCCATCGGG CCTCTTATGC GTCATTCTTG GCAAGTTACT CGGTGGGTCA  
 3781 CGTTGTCTCT GGTTTGTTCT CCTACGTATA TGCATGCTCG CAGATTTGGC AATTTCTCTT  
**5** 3841 ATTTATGTGG TGTCCCAAGG GCGTTGTAC AAGTGTGGG GAAAGTGTAT AAGGACGGCT  
 3901 CCTGCAGAAG TGACCCTTAA TGTGTTTCCT TTTTCGCGCG CCACCCGCTC ATCTCTTGTG  
 3961 TCCTTGTGTG ATCGGTTCCA AGCGCCAAAA GGAGTTGACC CCGTGCACCTT GGCACAGGC  
 4021 TGGCGCGGGT GCTGGTGTGG TGAGAGCCCT ATTCATCAAT CACACCAAAA ACCGATAGCT  
 4081 TATGCCAACT TGGATGAAAA GAAGATATCC GCCCAGACGG TGATTGCTGT CCCGTATGAT  
**10** 4141 CCCAGTCAGG CCATTAATG CCTGAAAGTT TTGCAGGCAG GAGGGGCTAT TGTGGACCAG  
 4201 CCTACGCCCG AGGTGCTCCG TGTGTCTGAG ATTCCCTTCT CGGCCCCATT TTTTCCGAAG  
 4261 GTCCAGTCA ACCCAGATTG CAGGGTTGTG GTAGATTCGG ACACCTTTTGT GGCTGCGGTC  
 4321 CGCTGCGGTT ATTCGACAGC ACAACTGGTC CTTGGTCCGG GCAACTTTGC CAAGCTAAAT  
 4381 CAGACCCCC TCAGGAACTC TGTCCCCACC AAAACAACCTG GTGGGGCCTC ATACACCCTT  
**15** 4441 GCCGTGGCCC AGGTATCTGT GTGGACTCTT GTTCATTTCA TCCTCGGCCT TTGGTTAACG  
 4501 TCACCTCAAG TGTGTGGTGC AGGGACCTCT GACCCGTGGT GTTCGAACCC TTTTTCGTAT  
 4561 CCTACTTATG GCCCCGAGT TGTGTGTTC TCTCGACTCT GCGTGTCTGC CGACGGAGTT  
 4621 ACCCTGCCAT TGTTCTCAGC CGTTGCCCAT CTTTCCGGTA GAGAGGTGGG GATTTTTAT  
 4681 TTGGTGTCTG CCTCCTTGGG CGCTTTAGCC CACCGCTTGG CTCTTAAGGC AGACATGTCA  
**20** 4741 ATGGTCTTTT TGGCGTTTTG TGCTTACGCC TGGCCCATGA GCTCCTGGTT AATTTGCTTC  
 4801 TTTCTATGCT TCTTGAGGTG GGTAACCCTT CATCTCTCA CTATGCTTTG GGTGCACTCA  
 4861 TTTTTGGTGT TTTGCCTACC AGCTGCCGGC GTTCTCTCGC TGGGAATAAC CGGTCTTCTT  
 4921 TGGGCAGTTG GCCGTTTCAC CCAGGTTGCC GGAATTATCA CACCTTATGA CATCCACCAG  
 4981 TATACCTCCG GACCACGTGG TGCAGCTGCT GTAGCAACGG CTCCAGAAGG TACTTACATG  
**25** 5041 GCGGCCGTTT GGAGAGCCGC TTTGACTGGA CGGACTTTGA TCTTCACACC ATCTGCAGTC  
 5101 GGATCCCTTC TTGAAGGTGC TTTCAGAACT CAAAAGCCCT GCCTTAACAC CGTGAATGTC  
 5161 GTAGGCTCTT CCCTTGGTTC TGGAGGAGTT TTCACCATTG ATGGCAGAAG AGTCATCGTC  
 5221 ACTGCCACCC ATGTGTTGAA TGGTAACACA GCCAGGGTCA CTGGTGATTC CTACAACCGC  
 5281 ATGCACACGT TCAATACTAA TGGTGATTAT GCCTGGTCCC ATGCTGATGA CTGGCAAGGC  
**30** 5341 GTTGCCCCTA TGGTTAAGAT CGCTAAGGGG TATCGCGGTC GTGCCTACTG GCAAACGTCA  
 5401 ACCGGAGTCG AACCTGGCAT CATGGGGGAA GGATTCGCCT TCTGTTTCAC TAACTGTGGC  
 5461 GACTCAGGGT CACCTGTGAT TTCAGAAGCT GGTGACCTTA TTGGAGTCCA TACCGGTTCA  
 5521 AACAACTCG GTTCTGGTCT TGTGACAACC CCTGAAGGGG AGACCTGCTC CATCAAGGAA  
 5581 ACTAGGCTCT CTGACCTTTC TAGACATTTT GCAGGTCCAA GCGTCCCTCT TGGGGACATT  
**35** 5641 AAGTTGAGCC CAGCCATCAT CCCTGATGTG ACAACTATTC CGAGTGAATT GGCATCGCTC  
 5701 CTTGCTTCTG TCCCCGTGAT GGAAGGTGGC CTCTCAACTG TCCAGCTTTT GTGCGTCTTT  
 5761 TTCCTTCTCT GCGCATGAT GGGCCATGCC TGGACACCCA TTGTTGCCGT AGGCTTCTTT

ES 2 692 809 T3

5821 TTGCTGAATG AAATTCTCCC AGCAGTCTTG GTCCGAGCTG TGTTCTCTTT TGCACTCTTT  
5881 GTACTIONGCAT GGGCCACCCC CTGGTCGGCA CAAGTGTGA TGATTAGACT CCTCACGGCG  
5941 GCTCTCAACC GCAACAGGTT GTCCCTGGCG TTCTACGCAC TCGGAGGTGT CGTTGGCCTG  
6001 GCCACAGAAA TCGGGACTTT TGCTGGTGA TGGCCTGAAC TGTCCCAAGC CCTCTCGACA  
**5** 6061 TACTGCTTCC TGCCCAGGTT CTTGCTGTG ACTAGTTATG TCCCCACCAT CATCATCGGT  
6121 GGGCTCCATG CCCTCGGCGT AATTTTGTGG TTATTCAAAT ACCGATGCCT CCACAACATG  
6181 CTGGTTGGTG ATGGGAGTTT CTCAAGCGCT TTCTTCCTAC GGTATTTTGC TGAGGGTAAAT  
6241 CTTAGGAAAG GCGTGTGCGA GTCCTGTGGC ATGAATAACG AATCCCTGAC AGCTGCTTTG  
6301 GCTTGCAAGT TGTCGCAAGC TGACCTTGAT TTTTGTCCA GTTTAACGAA CTTCAAGTGC  
**10** 6361 TTTGTGTCCG CTTCAAACAT GAAAAATGCA GCTGGCCAAT ACATCGAGGC GGCATATGCT  
6421 AGAGCTCTGC GTCAGGAGCT GGCCTCCTTG GTTCAGGTTG ACAAGATGAA AGGAGTATTG  
6481 GCCAAGCTCG AGGCTTTTCG TGAGACGGCC ACTCCGTCAC TTGACACAGG TGACGTGATT  
6541 GTTCTGCTTG GGCAACACCC CCATGGATCC ATCCTCGACA TTAATGTGGG GGGTGAAAGG  
6601 AAAACTGTGT CTGTGCAAGA AACACGATGC CTGGGTGGTT CCAAATTCAG TGTCTGCACT  
**15** 6661 GTCGTGTCCA ACACGCCCGT GGATACCTTG ACCGGCATCC CACTTCAGAC GCCAACCCCA  
6721 CTTTTTGAAA ATGGCCCGCG CCATCGCAGC GAGGACGACG ACCTTAAAGT TGAGAGAATG  
6781 AAAAAACACT GTGTATCCCT CGGCTTCCAC AAAATCAATG GTAAAGTTTA CTGCAAAAT  
6841 TGGGACAAGT CTAACGGCGA CACCTTTTAC ACGGATGATT CCCGATACAC TCAAGACCAT  
6901 GCTTTTCAGG ACAGGTCAAC CGACTATAGA GACAGGGATT ATGAAGGTGT ACAGACCGCC  
**20** 6961 CCCAACAGG GATTTCGATCC AAAGTCCGAA GCCCCTGTTG GCACTGTTGT AATCGGTGGC  
7021 ATTACGTATA ACAGGCATCT GGTCAAAGGT AAGGAGGTCC TAGTTCCCAA ACCTGACAAC  
7081 TGCCTTGAAG CTGCCAGACT GTCCCTTGAG CAAGCTCTTG CTGGGATGGG CCAAACCTGT  
7141 GACCTTACAG CTACCGAAGT GGAGAAACTA AAGCGCATCA TTAGTCAACT CCAAGGTCTG  
7201 ACCACTGAAC AGGCTTTAAA CTGCTAGCCG CCAGCGGCTT GACCCGCTGT GGCCGCGGCG  
**25** **SEQ ID NO:28 Nucleótido que codifica ORF1b del PRRSV atenuado 94881**  
7209 AC AGGCTTTAAA CTGCTAGCCG CCAGCGGCTT GACCCGCTGT GGCCGCGGCG  
7261 GCCTAGTTGT AACTGAAACG GCGGTAAAAA TCGTAAAATA CCACAGCAGA ACTTTCACCT  
7321 TAGGCTCTTT AGACCTAAAA GTCACCTCCG AAGTGGAGGT GAAGAAATCA ACTGAGCAGG  
7381 GGCACGCTGT CGTGGCGAAC TTATGTTCCG GTGTCGTCTT GATGAGGCCT CACCCACCGT  
**30** 7441 CCCTTGTTGA CGTTCTCCTC AAACCCGGAC TTGACACAAC ACCCGGCATT CAACCAGGGC  
7501 ATGGGGCCGG GAATATGGGC GTGAACGGTT CTATTTGGGA TTTTGAAACT GCACCCACAA  
7561 AGGTAGAACT AGAGTTGTCC AAGCAAATAA TCCAAGCATG TGAAGTCAGG CGCGGGGACG  
7621 CCCCTAACCT CCAACTCCCC TACAAGCTTT ATCCTGTCAG GGGGGACCCC GAGCGGCGTA  
7681 AAGGTCGCTT TGTCAACACT AGGTTTGGAG ATTTACCTTA CAAACTCCC CAAGACACCA  
**35** 7741 AGTCCGCAAT TCATGCGGCT TGTTGCCTGC ATCCCAATGG GGTCCCTCGTG TCTGATGGTA  
7801 AATCCACGCT GGGTACCACT CTTCAACATG GTTTCGAGCT TTATGTCCCC ACTGTACCTT  
7861 ATAGTGTGAT GGAATACCTT GATTACGCC CTGACACCCC TTTTATGTGT ACTAAACATG

ES 2 692 809 T3

7921 GCACTTCCAA GGCTGCTGCA GAGGACCTCC AAAAATATGA CCTATCCACT CAAGGGTTTG  
7981 TCTTGCCCTGG GGTCCCTACGC CTAGTGCGCA GGTTTCATCTT TAGCCATGTT GGTAAGGCGC  
8041 CACCACGTGT CCTTCCATCA ACCTACCCTG CCAAGAATC CATGGCAGGG GTCAATGGCC  
8101 AGAGGTTCCC AACAAAGGAT GTCCAGAGCA TACCTGAAAT TGATGAAATG TGCGCCCGTG  
**5** 8161 CCGTCAAGGA AAATTGGCAG ACTGTGACAC CTTGCACCCT CAAAAACAG TACTGTTCCA  
8221 AACCTAAAC TAGAACCATC CTAGGTACCA ACAACTTCAT AGCCTTGGCT CACAGGTCAG  
8281 CACTCAGTGG TGTCAACCAG GCGTTCATGA AGAAGGCCTG GAAGTCCCA ATTGCCTTGG  
8341 GGAAAAACAA GTTTAAGGAA TTGCATTGCA CTGTGCGCCG CAGATGCCTT GAGGCTGACC  
8401 TGGCTTCCTG CGATCGCAGC ACCCCCGCCA TTGTGAGGTG GTTTGTTGCC AACCTCCTGT  
**10** 8461 ATGAACTGCA AGGATGTGAA GAGTACTTGC CTAGCTACGT GCTCAACTGT TGCCATGACC  
8521 TTGTGGCAAC GCAGGATGGC GCTTTCACAA AACGCGGTGG CCTGTCTGCC GGGGACCCCG  
8581 TCACCAGTGT GTCCAACACC GTCTACTCAC TGATAATTTA CGCCAGCAC ATGGTGCCTT  
8641 CGGCCTTGAA GATGGGTCAT GAAATTGGTC TCAAGTTCCT TGAGGAACAG CTCAAATTTG  
8701 AGGACCTTCT TGAAATCCAG CCCATGTTAG TGTATTCTGA TGACCTCGTC TTGTATGCGG  
**15** 8761 AAAGACCCAC TTTTCCCAAC TACCATTGGT GGGTCGAGCA TCTTGACCTG ATGTTGGGCT  
8821 TTAAAACGGA CCCAAAGAAA ACTGTCATAA CTGATAAACC CAGTTTTCTC GGCTGCAGAA  
8881 TTGAAGCAGG ACGGCAGTTA GTCCCAATC GCGACCGTAT TCTGGCTGCT CTTGCATATC  
8941 ATATGAAGGC GCAGAACGCC TCAGAGTATT ATGCGTCCGC TGCCGCAATT CTGATGGATT  
9001 CGTGTGCTTG CATTGACCAT GACCCCGAGT GGTATGAGGA CCTTATCTGC GGCATCGCCC  
**20** 9061 GGTGTGCTCG CCAGGACGGT TACCGTTTTT CAGGCCCGGC ATTTTTTCATG TCCATGTGGG  
9121 AGAAGCTGAA AAGTCATAAC GAAGGGAAGA AATGCCGTC CTGCGGCATC TGCGACGCCA  
9181 AAGCCGACTA TGCGTCCGCC TGTGGACTTG ATTTGTGTTT GTTCCATTCA CACTTTCATC  
9241 AACACTGCC AGTCACTCTG AGCTGTGGCC ACCATGCCGG TTCAAAGGAA TGTTCCGAGT  
9301 GTCAGTCACC TGTCGGGGCT GGCAAATCCC CCCTTGACGC TGTGCTGAAA CAAATCCCGT  
**25** 9361 ACAAACCTCC TCGTACCATT ATCATGAAGG TGGACAACAA AACAAACGACC CTTGACCCGG  
9421 GAAGATATCA GTCCCCTCGA GGTCTTGTG CAGTCAAAAG AGGTATTGCA GGTAATGAGG  
9481 TTGATCTTTC TGATGGAGAC TACCAAGTGG TGCCTCTTTT GCCGACTTGC AAAGACATAA  
9541 ACATGGTGAA GGTGGCTTGC AACGTACTAC TCAGCAAGTT TATAGTAGGG CCGCCAGGTT  
9601 CCGGAAAAAC CACCTGGCTA CTGAACCAAG TCCAGGACGA TGATGTCATT TACACACCTA  
**30** 9661 CTCATCAGAC AATGTTTTGAC ATAGTCAGTG CTCTTAAAGT TTGCAGGTAT TCCATCCCAG  
9721 GAGCCTCAGG ACTCCCTTTT CCACCACCTG CCAGGTCCGG GCCGTGGGTT AGGCTCATCG  
9781 CCAGCGGACA TGTCCCTGGC CGAGTGTGAT ATCTCGATGA GGCAGGATAT TGCAATCATC  
9841 TAGACATTCT AAGGCTGCTT TCCAAAACAC CCCTTGTGTG TTTGGGTGAC CTTTCCAGCAAC  
9901 TTCACCCGGT CGGCTTTGAT TCCTATTGTT ATGTGTTTCGA TCAGATGCCT CAGAAGCAGC  
**35** 9961 TGACCACCAT TTATAGATTT GGCCCTAACA TCTGTGCAGC CATCCAGCCT TGTTACAGGG  
10021 AGAAACTTGA ATCCAAGGCC AGGAACACCA GAGTGGTTTT CACCACCCGG CCTGTGGCCT  
10081 TTGGTCAGGT CCTGACACCG TACCACAAAG ATCGTACCG CTCTGCAATA ACTATAGATT

ES 2 692 809 T3

10141 CATCCCAGGG GGCACCTTC GACATTGTGA CATTGCATCT ACCATCGCCA AAGTCCCTAA  
 10201 ACAAATCCCG AGCACTTGTA GCCATCACTC GGGCAAGACA TGGGTTGTTC ATTTATGACC  
 10261 CTCATGACCA ACTCCAGGAG TTTTTCAACT TAACCCCGA GCGCACTGAT TGTAACCTTG  
 10321 CGTTCAGCCG TGGGGATGAG CTGGTTGTTT TGAATGTGGA TAATGCGGTC ACAACTGTAG  
 5 10381 CGAAGGCCCT AGAGACAGGT TCACCCCGAT TTCGAGTATC GGACCCGAGG TGCAAGTCTC  
 10441 TCTTAGCCGC TTGTTCGGCC AGTCTAGAAG GGAGCTGCAT GCCACTACCA CAAGTAGCAC  
 10501 ATAACCTGGG GTTTTACTTT TCCCCGGACA GCCCAGCTTT TGCACCCCTG CCAAAGAGC  
 10561 TGGCGCCACA TTGGCCAGTG GTCACCCACC AGAATAATCG AGCGTGGCCT GATCGACTTG  
 10621 TCGCTAGTAT GCGCCCAATT GATGCCCGCT ACAGCAAGCC AATGGTCGGT GCAGGGTATG  
 10 10681 TGGTCGGGCC ATCCATTTTT CTTGGCACTC CTGGTGTGGT GTCATACTAT CTCACATTAT  
 10741 ACATCGGGGG CGAGCCTCAG GCCCTGCCAG AAACACTCGT TTCAACAGGA CGTATAGCCA  
 10801 CAGATTGTGC GGAATATCTC GACGCGGCTG AGGAAGAGGC AGCGAGAGAA CTTCCCCACG  
 10861 CATTATTTGG CGATGTCAA GGCCTACGG TCGGGGGTG TCACCACATT ACATCGAAAT  
 10921 ACCTACCTAG GTCCCTGCCT AAAGACTCTG TTGCTGTGGT TGGGGTGAGT TCGCCCGGTA  
 15 10981 GGGCTGCTAA AGCCGTGTGC ACTCTCACCG ATGTGTACCT CCCCAGACTC CGACCATATT  
 11041 TGCAACCGGA GACGGCATCA AAATGCTGGA AACTTAACT GGATTTTCAAG GATGTTTCGAC  
 11101 TGATGGTCTG GAAAGGCGCC ACAGCCTATT TCCAGTTGGA AGGGCTGACA TGGTCAGCGC  
 11161 TGCCCGATTA TGCTAGGTTT ATTCAGCTAC CCAAGGATGC CGTTGTGTAC ATCGATCCGT  
 11221 GTATAGGGCC GGCAACAGCC AATCGCAAGG TTGTGCGAAC CACAGACTGG CGGGCCGACC  
 20 11281 TGGCAGTGAC ACCGTATGAT TACGGTGCTC AGGTCATTTT GACAACAGCC TGGTTCGAGG  
 11341 ACCTTGGGCC GCAGTGGGAA ATTTTGGGGT TGCAGCCTTT CAGACGAACA TTTGGCTTTG  
 11401 AGAACACTGA AGATTGGGCA ATTCTCGCAC GCCGTATGAA TGACGGCAA GATTACTCTG  
 11461 ACTATAATTG GCATTGTGTA CGAGAACGCC CACACGCAAT TTACGGGCGC GCCCGTGACC  
 11521 ATACGTATCA TTTTGCCTTT GGCCTGAAC TGCAAGTAGA GCTGGGCAGA CCCCAGCTGC  
 25 11581 CTCCTGAGCA AGTGCCGTGA

SEQ ID NO:29 Nucleótido que codifica ORF2 del PRRSV atenuado 94881

11611 ATGCAATGGG TTCACTGTGG AGTAAAATCA  
 11641 GTCAGTTGTT CGTGGATGCC TTCACTGAGT TCCTTGTTAG TGTGGTTGAC ATTGTCATCT  
 11701 TTCTCGCCAT ATTGTTTGGG TTCACTGTTG CAGGCTGGTT ATTGGTCTTC CTTCTCAGAG  
 30 11761 TGGTTTGCTC CGCGTTTCTC CGTTCGCGCT CTGCCATTCA CTCTCCCGAA CTATCGAAGG  
 11821 TCCTATGAGG GCTTGCTACC CAACTGCAGA CCGGATGTCC CACAATTCGC AGTTAAGCAC  
 11881 CCGTTGGGTA TACTTTGGCA TATGCGAGTC TCCCACCTAA TTGACGAAAT GGTCTCTCGC  
 11941 CGCATTTACC GGACCATGGA ACATTCGGGT CAAGCGGCCT GGAAGCAGGT TGTTAGTGAA  
 12001 GCCACTCTCA CAAAACCTGTC AAGGCTTGAC GTAGTCACTC ATTTCCAACA CCTGGCCGCA  
 35 12061 GTGGAGGCTG ATTCTTGCCG CTTCTTAGC TCACGACTCG CGATGCTGAA AAACCTTGCC  
 12121 GTTGGCAATG TGAGCCTGGA GTACAACACT ACTTTGGACC GCGTTGAGCT CATCTTTCCC  
 12181 ACACCAGGTA CGAGGCCCAA GTTGACCGAT TTTAGGCAAT GGCTTATCAG CGTGCACGCT

## ES 2 692 809 T3

12241 TCCATCTTCT CCTCTGTGGC TTCGTCTGTT ACCTTGTTCA CAGTGCTTTG GCTTCGAATT  
12301 CCAGCTCTAC GCTATGTTTT TGGTTTCCAT TGGCCCACGG CAACACATCA TTCGAACTAA

### SEQ ID NO:30 Nucleótido que codifica ORF3 del PRRSV atenuado 94881

12219 AT GGCTTATCAG CGTGCACGCT

5 12241 TCCATCTTCT CCTCTGTGGC TTCGTCTGTT ACCTTGTTCA CAGTGCTTTG GCTTCGAATT  
12301 CCAGCTCTAC GCTATGTTTT TGGTTTCCAT TGGCCCACGG CAACACATCA TTCGAACTAA  
12361 CTATCAATTA CACTATATGT AAGCCATGCC CTACCAGTCA AGCTGCCCAA CAAAGACTCG  
12421 AGCCTGGCCG TAACGTGTGG TGCAAAATAG GGCACGACAG GTGTGAGGAA CGTGACCATG  
12481 ATGAGTTGTC AATGTCCATT CCGTCCGGGT ACGACAACCT CAAACTTGAG GGTATTATG  
10 12541 CTTGGCTGGC TTTTTTGTCC TTTTCCTACG CGGCCCAATT CCATCCGGAG CTGTTCCGAA  
12601 TAGGAAACGT GTCGCGCGTC TTTGTGGATA AGCGACACCA GTTCATTTGC GCCGAGCATG  
12661 ATGACAAAA TTCAACCATA TCTGCCAGAC ACAACATCTC CGCGTCGTAT GCGGTGTATT  
12721 ACCATCATCA AATAGACGGG GGCAATTGGT TTCATTTGGA ATGGCTGCGA CCATTCTTTT  
12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT  
15 12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCTT  
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT  
12961 CAGGAGGTCG TCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAA

### SEQ ID NO:31 Nucleótido que codifica ORF4 del PRRSV atenuado 94881

12761 ATGGCTGCGA CCATTCTTTT

20 12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT  
12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCTT  
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT  
12961 CAGGAGGTCG TCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAACGGC  
13021 TAATGTGACC GATGAATCGT ATTTGTACAA CGCGGACTTG CTGATGCTTT CCGCGTGCCT  
25 13081 TTTCTACGCC TCGGAAATGA GCGAGAAAGG CTTCAAAGTC ATCTTTGGGA ATATTTCTGG  
13141 CGTTGTTTCC GCTTGTGTTA ATTTACAGA TTATGTGGCC CATGTGACCC AACACACTCA  
13201 GCAGCACCAT TTGTAATTG ATCACATTCG GTTACTACAC TTCTTGACAC CGTCTACGAT  
13261 GAGGTGGGCT ACAACCATTG CTTGTTTGTG TGCCATTCTT TTGGCGGTAT GA

### SEQ ID NO:32 Nucleótido que codifica ORF5 del PRRSV atenuado 94881

30 13309 AT GAAATGTTCT  
13321 TGCAAGTTGG GGCATTTCTT GACTCCTCAC TCTTGCTTCT GGTGGCTTTT TTTGCTGTGT  
13381 ACCGGCTTGT CTTGGTCCTT TGTCGATGGC AACGACAACA GCTCGACATC CCAATACATA  
13441 TATAATTTGA CGATATGCGA GCTGAATGGG ACCGAATGGT TGTCCGGTCA TTTTGATTGG  
13501 GCAGTCGAAA CCTTTGTGCT TTACCCAGTT GCCACTCATA TCATTTCACT GGGTTTTTCTC  
35 13561 ACAACAAGCC ATTTCCCTGA TGCGCTCGGT CTCGGCGCTG TGTCCGCCAC AGGATTCATT  
13621 GCGGAGCGGT ATGTACTTAG CAGCATGTAC GGCCTTTGCG CCTTCGCGGC GCTCGTATGT  
13681 TTTGTCATCC GTGCTGCTAA AAATTGCATG GCTTGCCGCT ATGCCCGCAC CCGTTTTACC

## ES 2 692 809 T3

13741 AACTTCATCG TGGACGACCG GGAAGAATC CATCGATGGA AGTCTTCAAT AGTGGTGGAG  
13801 AAATTGGGCA AAGCTGAAGT CGGTGGTGAC CTTGTCAACA TTAAGCATGT TGTCTCGAA  
13861 GGGGTTAAAG CTCAACCCTT GACGAGGACT TCGGCTGAGC AATGGGAAGC CTAG

### SEQ ID NO:33 Nucleótido que codifica ORF6 del PRRSV atenuado 94881

5 13902 ATGGGAAGC CTAGACGACT  
13921 TTTGCAACGA TCCCACCGCC GCACAAAAAC TCGTGCTGGC CTTTAGCATC ACATATACAC  
13981 CCATAATGAT ATACGCCCTT AAGGTGTAC GCGGCCGACT CCTGGGGCTG TTGCACATCT  
14041 TGATATTTCT GAATTGTTCC TTTACTTTTG GGTACATGAC ATATGTGCAT TTTCAATCCA  
14101 CCAACCGTGT CGCACTCACT CTGGGGGCTG TAGTCGCCCT TTTGTGGGGT GTTTACAGCC  
10 14161 TCACAGAGTC ATGGAAGTTC ATCACTTCCA GATGCAGATT GTGTTGCCTA GGCCGGCGAT  
14221 ACATTCTGGC CCCTGCCCAT CACGTAGAAA GTGCTGCAGG CCTCCATTCA ATCCCAGCGT  
14281 CTGGTAACCG AGCATACGCT GTGAGAAAGC CCGACTAAC ATCAGTGAAC GGCACCTAG  
14341 TACCTGGGCT TCGGAGCCTC GTGCTGGGCG GCAAACGAGC TGTTAAACGA GGAGTGGTTA  
14401 ACCTCGTCAA GTATGGCCGG TAA

### 15 SEQ ID NO:34 Nucleótido que codifica ORF7 del PRRSV atenuado 94881

14413 ATGGCCGG TAAGAACCAG AGCCAGAAGA AAAGAAGAAA TGCAGCTCCG  
14461 ATGGGGAAAG GCCAGCCAGT CAATCAACTG TGCCAGTTGC TGGGTACAAT GATAAAGTCC  
14521 CAGCGCCAGC AATCTAGGGG AGGACAGGCC AAAAAGAAGA AGCCTGAGAA GCCACATTTT  
14581 CCCCTAGCTG CTGAAGATGA CATTCCGGCAC CATCTCACCC AGGCCGAACG TTCCCTCTGC  
20 14641 TTGCAATCGA TCCAGACGGC TTTCAATCAA GGCGCAGGAA CTGCGTCGCT TTCATCCAGC  
14701 GGAAGGTCA GTTTCCAGGT TGAGTTCATG CTGCCGGTTG CTCATACAGT GCGCCTGATT  
14761 CGCGTGACTION CTACATCCGC CAGTCAGGGT GCAAATTA

### Listado de secuencias

25 <110> KROLL, Jeremy  
VAUGHN, Eric  
BURGARD, Kim  
ORVEILLON, Francois-Xavier  
30 LAYTON, Sarah  
UTLEY, Phil  
PESCH, Stefan  
OHLINGER, Volker  
ROOF, Mike  
PIONTKOWSKI, Mike  
35 <120> NUEVA CEPA DE PRRSV EUROPEA  
<130> 10-0137  
40 <160> 34  
<170> PatentIn version 3.5  
45 <210> 1  
<211> 14843  
<212> DNA  
<213> Virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino



ES 2 692 809 T3

<400> 1

tttgtgtacc ttggaggcgt gggtagacgcc ctgccccacc ctttgggtccc tgttctagcc	60
cgacaagtac ccttctctct cggggcgagc gcgccgcctg ctgctccctt gcggcgggaa	120
ggacctccc agtatttccg gagagcacct gctttacggg atctccgcc tttaacccatg	180
tctgggatgt tctcccgggt catgtgcacc ccggctgcc gggatatttg gaacgccggc	240
caagtctatt gcacacgggt tctcagtgca cggctctctc tctctccaga acttcaggac	300
acggacctcg gtgcagttgg cttgtttcac aagcctaaag acaagctcca ttggaaagtt	360
cccatggta tccccaggt ggaatgttct ccatctgggt gttgctggct gtcaaccatt	420
tttcttttag cgcgatgac ctccggcaat cacaacttcc ttcaacgact cgtgaaggtt	480
gctgatgat tgtaccgtga cggttgctta acccctagac acctccgtga actccaagtt	540
tacgagcgtg gttgcaattg gtatccgatt acggggcctg tgcctgggat ggctgtgtac	600
gcgaaactcca tgcacgtgtc cgaccaaccg ttccctgggt ccaactcatgt gtaacaaat	660
tcccctttgc ctcaacgggc ttgtcggcag ccgttctgtc cgttcgaaga ggcccattct	720
agcatataca ggtgggaaaa atttgtaatt tttatggatt cctoctccga cggtcgatct	780
cgcgatgatg ggactccgga atccgatgac tccacggctt tggaagttct gccgcccgag	840
ctagaacacc aggtcaaggt ccttgctcgg agctttcccg cccatcacct tgtcgacctt	900
gccgattggg agctcactga gtcccctgat aacggttttt ccttcagcac gtcacatcct	960
tgcggctacc ttgttcggga cccggctgta tccgaaggca agtgttggct ttcctgcttt	1020
ttgagccagt cagccgaagt gctcagtcgc gaggcgcatac tggctaccgc ctatggttac	1080
caaaccaagt ggggtgtgcc tggcaagtac atccagcgca gacttcaagt tcacggtctc	1140

ES 2 692 809 T3

cgtgctgtgg	tcgaccctga	tgggccatt	cacggtgaag	cattgtcttg	ccccagctc	1200
tggatcaggc	acttgaccct	gaatgatgat	gtcaccocgg	gattcgttcg	cctaagtctc	1260
cttcgcattg	tgccgaacac	agagcctacc	acacaccgga	tctttcgttt	tggagtgcac	1320
aagtggatg	gtgccgccgg	caaacggggc	cgtggcaagc	gtgccgcaa	aagtgagaaa	1380
gactcggctt	ccaccctcaa	ggttgcccga	ccgacttcca	ccagtggaat	cgtcacctac	1440
tccccacctg	cggacgggtc	ttgtggttgg	catgcccttg	ccgccatact	gaaccggatg	1500
attaataatg	acttcacgtc	ccctctgcct	cggtaacaaca	ggccggagga	cgattgggct	1560
tctgatgggtg	acottgctca	ggccattcaa	tgtttgcaac	tacctgccgc	catagctcgg	1620
aaccgcgcct	gccctaacgc	caaatacctc	ataaaactca	acggagttca	ttgggaggtg	1680
gaggtgagggc	ctggaatggc	tctctgctcc	ctctctcgtg	agtgcgttgt	tggcgtctgc	1740
tctgaaggct	gtgtcgcgtc	gccttacccg	gaggacgggt	tgccataacg	tgcacttgag	1800
gccctggcgt	ctgcttatag	actgccttca	gactgtgttt	gtgatgggat	tattgacttc	1860
cttgccaatc	cacctcccca	ggagttctgg	actcttgaca	aaatggtgac	ttccccgtca	1920
ccggagcagt	ccggcttctc	tagtctgtat	aaattgttgt	tagagatcct	gccgcagaaa	1980
tgcggatcca	cagaagggga	attcatctat	actgttgaga	ggatggtgaa	ggattgtccg	2040
agctccaaac	aggccatggc	cctccttgca	aaaattaagg	tcccatcctc	aaaggcccca	2100
tccgtgactc	tgaacgagtg	cttccccacg	gatgttccag	tcaactctga	gttaatatct	2160
tgggaagagc	ccaaagacct	tggcgtgct	gttgtcctat	gtccatcgga	tgcaaaagaa	2220
tctaaggaaa	cagcccctga	agaagctcaa	gcgagaaacc	gtaaggctcct	tcaccctgtg	2280
gtccttaccg	aggaacttag	cgagcaacag	gtgcaggtgg	ttgaggggtg	tcaggatatg	2340
ccactggatt	tgacttggcc	aaccttaacc	gctacggcga	cccctgtag	agggccggta	2400
ccggacaatt	tgagctctgg	cattggtgcc	cagcccgtca	ccgttcaaga	actcattctg	2460
gcgaggcctg	caccccgctc	tgttgagcgc	tgtggcacgg	agtccaacgg	cagcagttca	2520
tttctggatt	tgccctgacgt	gcagacctcg	gaccagcctt	tagacctgtc	cctggccgcg	2580
tggcctgtaa	gggctaccgc	gtctgacccc	ggttgatcc	acggtaggcg	tgagcctgtc	2640
tttgtgaagc	ctcgaggtgt	tttctctgat	ggcagtcgg	cccttcagtt	cggagagctt	2700
tccgaagcca	gttctgtcgt	cgatgaccgg	acaaaagaag	ctccgggtgt	tgacgcccc	2760
atcgatttga	caacttcgaa	cgagacgctc	tctgggtctg	accccttga	attcgccaaa	2820
ttcaggcgcc	cgggtttctc	cgcgcaagct	ttaatcgacc	gaggtggtcc	gcttgccgat	2880
gttcatgcaa	agataaagag	tcgggtatat	gaacaatgcc	ttcaagcttg	tgaacctggt	2940
agtcgtgcga	ccccagccac	caagaagtgg	ctcgacaaaa	tgtgggacag	ggtggacatg	3000

ES 2 692 809 T3

aaaacttggc gctgcacctc gcagttccaa gctggtcaca ttcttgagtc cctcaaattc 3060  
 ctccctgaca tgattcaaga cacaccgctt cctgttccca ggaagaaccg agctgggtgac 3120  
 agtgccggcc tgaagcaact ggtggcgagc tgggatagga aatcgagtgt gacaccccc 3180  
 acaaaaccgg ttggaccggt gcttgaccag gccgtccctc tgcctatgga catccagcaa 3240  
 ggagatgcca tctccgctga caagccaccc cattcgcaaa acccttctag tcaagtagat 3300  
 gtgggtggag gttgaaaag ttttatgctc tccggcaccg gtttcgaggg gtccgttagt 3360  
 cagcgcctta cgacatgggt ttttgaggtt ctctccctc tcccagcttt tatgctcaca 3420  
 cttttctcgc cacggggctc tatggctcca ggtgattggc tgtttgcagg tgetgttcta 3480  
 cttgctctcc tgctctgccg ttcttaccca atactcggat gccttccctt attgggtgtc 3540  
 ttttctggtt ctgtcgggtg tgttcgtttg ggtgtttttg gttcttggat ggcttttgct 3600  
 gtatttttat tctcgactcc acccgaccca gtcggttctt cttgtgacca cgattcggcg 3660  
 gagtgtcatg ctgagctttt ggctcttgag cagcgccaac ttggggaacc tgtgcgcagc 3720  
 cttgtggctg ggccatcggg cctcttatgc gtcattcttg gcaagttact cgggtgggtca 3780  
 cgttgtctct ggtttgttct cctacgtata tgcattctcg cagatttggc aatttctctt 3840  
 atttatgtgg tgtcccaagg gcggtgtcac aagtgttggg gaaagtgtat aaggacggct 3900  
 cctgcagaag tggcccttaa tgtgtttcct ttttcgagcg ccaccgcctc atctcttgtg 3960  
 tccttgtgtg atcggttcca agcgccaaaa ggagttgacc ccgtgcactt ggcgacaggc 4020  
 tggcgcgggt gctggtgtgg tgagagccct attcatcaat cacacccaaa accgatagct 4080  
 tatgccaaact tggatgaaaa gaagatatcc gcccagacgg tgattgctgt cccgtatgat 4140  
 cctagtcagg ccattaaatg cctgaaagt ttgcagcagc gaggggctat tgtggaccag 4200  
 cctacgcccg aggtatctgt tgtgtctgag attcccttct cggcccccatt ttttccgaag 4260  
 gtcccagtca acccagactg cagggttgtg gtagattcgg acaactttgt ggctgcggtc 4320  
 cgctcgggtt attcgacagc acaactggct cttggtcggg gcaactttgc caagctaaat 4380  
 cagaccccc tcaggaactc tgtcccacc aaaacaactg gtggggcctc atacaccctt 4440  
 gccgtggccc aggtatctgt gtggactcct gttcatttca tcctcggcct ttggttaacg 4500  
 tcacctcaag tgtgtggctg agggacctct gaccctgggt gttcgaacct ttttctgat 4560  
 cctacttatg gccccggagt tgtgtgttcc tctcgactct gcgtgtctgc cgacggagtt 4620  
 accctgccat tgttctcagc cgttgcccat ctttccggtg gagaggtggg gatttttatt 4680  
 ttggtgcttg cctccttggg cgcttttagc caccgcttgg ctcttaaggc agacatgtca 4740  
 atggtctttt tggcgttttg tgcttacgcc tggcccatga gctcctggtt aatttgcttc 4800  
 tttcctatgc tcttgaggtg ggtaaccctt cactctctca ctatgctttg ggtgcactca 4860  
 tttttggtgt tttgcctacc agctgcgggc gttctctcgc tgggaataac cgttcttctt 4920

ES 2 692 809 T3

tgggcagttg gccgtttcac ccaggttgcc ggaattatca caccttatga catccaccag	4980
tatacctccg gaccacgtgg tgcagctgct gtagcaacgg ctccagaagg tacttacatg	5040
gcggccgttc ggagagccgc tttgactgga cggactttga tcttcacacc atctgcagtc	5100
ggatcccttc ttgaaggtgc tttcagaact caaaagccct gccttaacac cgtgaatgtc	5160
gtaggctctt cccttggttc tggaggagtt ttcaccattg atggcagaag agtcatcgtc	5220
actgccacc atgtgttgaa tggtaacaca gccagggtca ctggtgattc ctacaaccgc	5280
atgcacacgt tcaataactaa tggtgattat gcctggtccc atgctgatga ctggcaaggc	5340
gttgccocta tggttaagat cgctaagggg tatcgcggtc gtgcctactg gcaaacgtca	5400
accggagtcg aacctggcat catgggggaa ggattcgctt tctgtttcac taactgtggc	5460
gactcaggtt cacctgtcat ttcagaagct ggtgacctta ttggagtcca taccggttca	5520
aacaaactcg gttctggtct tgtgacaacc cctgaagggg agacctgctc catcaaggaa	5580
actaggctct ctgaccttcc tagacatttt gcagggtcaa gcgtccctct tggggacatt	5640
aagttgagcc cagccatcat ccctgatgtg acaactattc cgagtgactt ggcacgctc	5700
cttgcttctg tccccgtgat ggaaggtggc ctctcaactg tccagctttt gtgcgtcttt	5760
ttccttctct ggcgcatgat gggccatgcc tggacaccca ttgttgccgt aggcttcttt	5820
ttgctgaatg aaattctccc agcagtcttg gtccgagctg tgttctcttt tgcactcttt	5880
gtacttgc atggccacccc ctggtcggca caagtgttga tgattagact cctcacggcg	5940
gctctcaacc gcaacaggtt gtccctggcg ttctacgcat tcggaggtgt cgttggcctg	6000
gccacagaaa tcgggacttt tgetggtgga tggcctgaac tgtcccaage cctctcgaca	6060
tactgcttcc tgcccaggtt ccttgctgtg actagttatg tccccacat catcatcggg	6120
gggctccatg ccctcggcgt aattttgtgg ttattcaaat accgatgcct ccacaacatg	6180
ctggttgggtg atgggagttt ctcaagcgtt ttcttctac ggtattttgc tgagggtaat	6240
cttaggaaag gcgtgtcgca gtccctgtggc atgaataacg aatccctgac agctgctttg	6300
gcttgcaagt tgtcgcaagc tgacctgat tttttgtcca gtttaacgaa cttcaagtgc	6360
tttgtgtccg cttcaaacat gaaaaatgca gctggccaat acatcgaggc ggcgtatgct	6420
agagctctgc gtcaggagct ggcctccttg gttcaggtt acaagatgaa aggagtattg	6480
gccaagctcg aggctttcgc tgagacggcc actccgtcac ttgacacagg ggacgtgatt	6540
gttctgcttg ggcaacaccc ccatggatcc atcctcgaca ttaatgtggg ggggtgaaagg	6600
aaaactgtgt ctgtgcaaga aacacgatgc ctgggtggtt ccaaattcag tgtctgcact	6660
gtcgtgtcca acacgcccgt ggataccttg accggtatcc cacttcagac gccaacccca	6720
ctttttgaaa atggcccgcg ccatcgcagc gaggacgacg acctcaaagt tgagagaatg	6780

ES 2 692 809 T3

aaaaaaact gtgtatccct cggcttccac aaaatcaatg gtaaagttta ctgcaaaatt 6840  
 tgggacaagt ctaacggcga caccttttac acggatgatt cccgatacac tcaagacat 6900  
 gcttttcagg acaggtcaac cgactataga gacagggtt atgaagggtg acagaccgcc 6960  
 ccccaacagg gattcgatcc aaagtccgaa gccctgttg gcaactgtgt aatcgggtggc 7020  
 attacgtata acaggcatct ggtcaaagggt aaggagggtcc tagttcccaa acctgacaac 7080  
 tgccttgaag ctgccagact gtcccttgag caagctcttg ctgggatggg ccaaacttgt 7140  
 gaccttacag ctaccgaagt ggagaaacta aagcgcacatca ttagtcaact ccaaggctctg 7200  
 accactgaac aggcctttaa ctgctagccg ccagcggctt gaccgcgtgt ggcgcggcg 7260  
 gcctagtgtt aactgaaacg gcggtaaaaa tcgtaaaata ccacagcaga actttcacct 7320  
 taggctcttt agacctaaaa gtcacctccg aggtggagggt gaagaaatca actgagcagg 7380  
 ggcacgctgt cgtggcgaac ttatgttccg gtgtcgtctt gatgaggcct caccaccgt 7440  
 cccttgttga cgttctctc aaaccggac ttgacacaac acccggcatt caaccagggc 7500  
 atggggccgg gaatatgggc gtgaacgggt ctatgtggga ttttgaaact gcaccacaa 7560  
 aggtagaact agagttgtcc aagcaataa tccaagcatg tgaagtcagg cgcggggacg 7620  
 ccctaacct ccaactcccc tacaagcttt atcctgtcag gggggacccc gagcggcgta 7680  
 aaggtcgcct tgtcaacact aggtttggag atttacctta caaaactccc caagacacca 7740  
 agtccgcaat tcatcgggct tgttcctgc atcccaatgg ggtcctcgtg tctgatggca 7800  
 aatccacgct gggtagcact cttcaacatg gtttcgagct ttatgtcccc actgtacctt 7860  
 atagtgtcat ggaatacctt gattcacgcc ctgacacccc ttttatgtgt actaaacatg 7920  
 gcacttccaa ggctgctgca gaggacctcc aaaaatatga cctatccact caagggtttg 7980  
 tcttgctcgg ggtcctacgc ctagtgcgca ggttcacctt tagccatgtt ggtaaggcgc 8040  
 caccactgtt ccttccatca acctaccctg ccaagaactc catggcaggg gtcaatggcc 8100  
 agaggttccc aacaaaggat gtccagagca tacctgaaat tgatgaaatg tgcgccctg 8160  
 ccgtcaagga aaattggcag actgtgacac cttgcaccct caaaaaacag tactgttcca 8220  
 aacctaaaac tagaacatc ctaggtagca acaacttcat agccttggct cacaggctcag 8280  
 cactcagtgg tgtcaccag gcgttcatga agaaggcctg gaagtccca attgccttgg 8340  
 ggaaaaaaca gtttaaggaa ttgcattgca ctgtcgcgg cagatgcctt gaggtgacc 8400  
 tggcttctg cgatcgcagc acccccgcca ttgtgagggt gtttgttgc aacctcctgt 8460  
 atgaacttgc aggatgtgaa gagtacttgc ctactacgt gctcaactgt tgccatgacc 8520  
 ttgtggcaac gcaggatggc gctttcaca aacgcgggtg cctgtcgtcc ggggaccccg 8580  
 tcaccagtgt gtccaacacc gtctactcac tgataattta cgccagcac atggtgcttt 8640  
 cggccttgaa gatgggtcat gaaattggtc tcaagttcct tgaggaacag ctcaaatttg 8700

ES 2 692 809 T3

aggaccttct tgaatccag cccatgtag tgtattctga tgacctcgtc ttgtatgagg 8760  
aaagaccac ttttcccaac taccattggt gggctcagca tcttgacctg atgttgggct 8820  
ttaaacgga cccaaagaaa actgtcataa ctgataaacc cagttttctc ggctgcagaa 8880  
ttgaagcagg acggcagtta gtccccaatc gcgacctat tctggctgct cttgcatatc 8940  
atatgaaggc gcagaacgcc tcagagtatt atgctccgc tgcgcaatt ctgatggatt 9000  
cgtgtgcttg cattgacct gaccccgagt ggtatgagga tcttatctgc ggcacgccc 9060  
gggtgtgctc ccaggacggt taccgttttc caggcccggc atttttcatg tccatgtggg 9120  
agaagctgaa aagtcataat gaagggaaga aatgccgtca ctgcggcatc tgcgacgcca 9180  
aagccgacta tgcgtccgcc tgtggacttg atttgtgttt gttccattca cactttcatc 9240  
aacactgccc agtcactctg agctgtggcc accatgccgg ttcaaaggaa tgttcgcagt 9300  
gtcagtcacc tgcggggct ggcaaatccc cccttgacgc tgtgctgaaa caaatcccgt 9360  
acaaacctcc tcgtaccatt atcatgaag tggacaacaa aacaacgacc cttgaccggy 9420  
gaagatatca gtcccgtcga ggtctgttg cagtcaaaag aggtattgca ggtaatgagg 9480  
ttgatctttc tgatggagac taccaagtgg tgcctctttt gccgacttgc aaagacataa 9540  
acatggtgaa ggtggcttgc aactactac tcagcaagtt tatagtaggg ccgccagggt 9600  
ccgaaaaaac cacctggcta ctgaaccaag tccaggacga tgatgtcatt tacacaccta 9660  
ctcatcagac aatgtttgac atagtcagt ctcttaaagt ttgcaggat tccatcccag 9720  
gagcctcagg actccctttt ccaccacctg ccaggccgg gccgtgggtt aggctcatcg 9780  
ccagcggaca tgtccctgce cgagtgtcat atctcgatga ggcaggatat tgcaatcatc 9840  
tagacattct aaggctgctt tccaaaacac cccttgtgtg tttgggtgac cttcagcaac 9900  
ttcaccgggt cggctttgat tcctattggt atgtgttcca tcagatgcct cagaagcagc 9960  
tgaccacat ttatagattt ggcctaaca tctgtgcagc catccagcct tgttacaggg 10020  
agaaacttga atccaaggcc aggaacacca gagtggtttt caccaccgg cctgtggcct 10080  
ttggtcaggt cctgacaccg taccacaaag atcgtaccgg ctctgcaata actatagatt 10140  
catcccaggg ggcgacctc gacattgtga cattgcatct accatcgcca aagtcctaa 10200  
acaaatccc agcacttcta gccatcactc gggcaagaca tgggttgttc atttatgacc 10260  
ctcatgacca actccaggag ttttcaact taacccccga gcgactgat tgtaacctg 10320  
cgttcagccc tgggatgag ctggtgttt tgaatgtgga taatgcggtc acaactgtag 10380  
cgaaggccct agagacaggt tcacccgat ttcgagtatc ggacccgagg tgcaagtctc 10440  
tcttagccgc ttgttcggcc agtctagaag ggagctgat gccactacca caagtagcac 10500  
ataacctggg gttttacttt tccccggaca gccagcttt tgcaccctg ccaaaagagc 10560

ES 2 692 809 T3

tggcgccaca ttggccagtg gtcacccacc agaataatcg agcgtggcct gatcgacttg 10620  
 tcgctagtat gcgccaatt gatgcccgt acagcaagcc aatggtcggt gcagggtatg 10680  
 tggcggggc atccatTTTT cttggcactc ctgggtgtgggt gtcatactat ctcacattat 10740  
 acatcggggg cgagcctcag gccctgccag aaacactcgt ttcaacagga cgtatagcca 10800  
 cagattgtcg ggaatatctc gacgcggctg aggaagaggg agcgagagaa cttccccacg 10860  
 catttattgg cgatgtcaaa ggcactacga tcgggggggtg tcaccacatt acatcgaat 10920  
 acetacctag gtcctgcct aaagactctg ttgctgtgggt tgggggtgagt tcgcccggta 10980  
 gggctgctaa agccgtgtgc actctcaccg atgtgtacct cccggaactc cgaccatatt 11040  
 tgcaaccgga gacggcatca aaatgctgga aacttaaact ggatttcagg gatgttcgac 11100  
 tgatggctctg gaaaggcgcc acagcctatt tccagttgga agggctgaca tggtcagcgc 11160  
 tgcccgatta tgctaggttc attcagctac ccaaggatgc cgttgtgtac atcgatccgt 11220  
 gtatagggcc ggcaacagcc aatcgcaagg ttgtgcgaac cacagactgg cgggccgacc 11280  
 tggcagtgc accgtatgat tacgggtctc aggtcatttt gacaacagcc tggttcgagg 11340  
 accttggggc gcagtggaag attttgggggt tgcagccttt cagacgaaca tttggctttg 11400  
 agaaactga agattgggca attctcgac gccgtatgaa tgacggcaaa gattactcg 11460  
 actataattg gcattgtgta cgagaacgcc cacacgcaat ttacgggccc gcccgtgacc 11520  
 atacgtatca ttttccctt ggcaactgaa tgcaagtaga gctgggcaga ccccggtgc 11580  
 ctctgagca agtgccgtga acgcgagtg atgcaatggg tttactgtgg agtaaatca 11640  
 gtcagttgtt cgtggatgcc ttcactgagt tccttgttag tgtggttgac attgtcatct 11700  
 ttctcgccat attgtttggg ttcactgttg caggctgggt attggtcttc cttctcagag 11760  
 tggtttgctc cgcgtttctc cgttcgcgct ctgccattca ctctccgaa ctatcgaagg 11820  
 tcctatgagg gcttctacc caactgcaga ccggatgtcc cacaattcgc agttaagcac 11880  
 ccgttgggta tactttggca tatgcgagtc tccaccta aa ttgacgaaat ggtctctcgc 11940  
 cgcatttacc ggaccatgga acattcgggt caagcggcct ggaagcagg tgttagtgaa 12000  
 gccactctca caaaaactgtc aaggcttgac gtagtcactc atttccaaca cctggccgca 12060  
 gtggaggctg attcttgccg cttccttagc tcacgactcg cgatgctgaa aaaccttgcc 12120  
 gttggcaatg tgagcctgga gtacaacact actttggacc gcgttgagct catctttccc 12180  
 acaccaggta cgagggccaa gttgaccgat tttaggcaat ggcttatcag cgtgcacgct 12240  
 tccatctct cctctgtggc ttcgtctggt accttgttca cagtgtttg gcttcgaatt 12300  
 ccagctctac gctatgtttt tggtttccat tggcccacgg caacacatca ttcgaactaa 12360  
 ctatcaatta cactatatgt aagccatgcc ctaccagtca agctgcccaa caaagactcg 12420  
 agcctggccc taacgtgtgg tgcaaaaatag ggcacgacag gtgtgaggaa cgtgaccatg 12480

ES 2 692 809 T3

atgagttgtc	aatgtccatt	ccgtccgggt	acgacaacct	caaacttgag	ggttattatg	12540
cttggtggc	ttttttgtcc	tttctctacg	cggcccaatt	ccatccggag	ctgttcggaa	12600
taggaaacgt	gtcgcgcgtc	tttgtggata	agcgacacca	gttcatttgc	gccgagcatg	12660
atggacaaaa	ttcaaccata	tctgccagac	acaacatctc	cgcgtcgtat	gcggtgtatt	12720
accatcatca	aatagacggg	ggcaattggg	ttcatttggg	atggctgcga	ccattctttt	12780
cctcctggct	ggtgctcaac	atctcatggg	ttctgaggcg	ttcgcctgca	agccctgctt	12840
ctcgacgcat	ctatcagata	ttaagaccaa	cacgaccgcg	gctgccgggt	tcatggtcct	12900
tcagaacatc	aattgtttcc	aatctcacag	ggcctcaaca	gcgcaaggta	ccactcccct	12960
caggaggtcg	tcccaatgtc	gtgaagccgt	cggcattccc	cagtacatca	cgataacggc	13020
taatgtgacc	gatgaatcgt	atgtgtacaa	cggcgacttg	ctgatgcttt	ccgctgcct	13080
tttctacgcc	tcggaaatga	gcgagaaagg	cttcaaagtc	atctttggga	atatttctgg	13140
cgttgtttcc	gcttgtgtta	atctcacaga	ttatgtggcc	catgtgacct	aacacactca	13200
gcagcaccat	ttggtaattg	atcacattcg	gttactacac	ttcttgacac	cgtctacgat	13260
gaggtgggct	acaaccattg	cttgtttgct	tgccattctt	ttggcgggat	gaaatgttct	13320
tgcaagttgg	ggcatttctt	gactcctcac	tcttgcttct	ggtggctttt	tttgctgtgt	13380
accggcttgt	cttggtcctt	tgctgatggc	aacgacgaca	gctcgacatc	ccaatacata	13440
tataatttga	cgatatgcga	gctgaatggg	accgaatggg	tgtccgggtca	ttttgattgg	13500
gcagtcgaaa	cctttgtgct	ttaccagtt	gccactcata	tcatttctct	gggttttctc	13560
acaacaagcc	atctccttga	tgcgctcggg	ctcggcgctg	tgtccgccac	aggattcatt	13620
ggcgagcggg	atgtacttag	cagcatgtac	ggcgtttgcg	ccttcgcggc	gttcgatgt	13680
tttgtcatcc	gtgctgctaa	aaattgcatg	gcttgccgct	atgcccgcac	ccggtttacc	13740
aacttcatcg	tggacgaccg	gggaagaatc	catcgatgga	agtcttcaat	agtggtggag	13800
aaattgggca	aagctgaagt	cggcgggtgac	cttgtcaaca	ttaagcatgt	tgctcctcgaa	13860
ggggttaaag	ctcaaccctt	gacgaggact	tcggctgagc	aatgggaagc	ctagacgact	13920
tttgcaacga	tcccaccgcc	gcacaaaaac	tcgtgctggc	ctttagcatc	acatatacac	13980
ccataatgat	atacgccctt	aaggtgtcac	gcggccgact	cctggggctg	ttgcacatct	14040
tgatatttct	gaattgttcc	tttacttttg	ggtacatgac	atatgtgcat	tttcaatcca	14100
ccaaccgtgt	cgcattcact	ctgggggctg	tagtcgccct	tttgtggggg	gtttacagcc	14160
tcacagagtc	atggaagttc	atcacttcca	gatgcagatt	gtgttcctca	ggccggcgat	14220
acattctggc	ccctgcccat	cacgtagaaa	gtgctgcagg	cctccattca	atcccagcgt	14280
ctggtaacgc	agcatacgct	gtgagaaagc	ccggactaac	atcagtgaac	ggcactctag	14340



ES 2 692 809 T3

tacctgggct tcggagcctc gtgctgggcg gcaaacgagc tgtaaacga ggagtggta 14400  
 acctcgtcaa gtatggccgg taagaaccag agccagaaga aaagaagaaa tgcagctccg 14460  
 atggggaaag gccagccagt caatcaactg tgccagttgc tgggtacaat gataaagtcc 14520  
 cagcgccagc aatctagggg aggacaggcc aaaaagaaga agcctgagaa gccacatttt 14580  
 cccctagctg ctgaagatga cattcggcac catctcacc aggccgaacg ttcctctgc 14640  
 ttgcaatcga tccagacggc tttcaatcaa ggcgaggaa ctgcgctcgt ttcctccagc 14700  
 gggaaggta gtttccaggt tgagttcatg ctgccggtt ctcatacagt gcgcctgatt 14760  
 cgcgtagact ctacatccgc cagtcagggt gcaaattaat ttgacagtca ggtgaatggc 14820  
 cgcgattgac gtgtggcctc taa 14843

<210> 2  
 <211> 2349  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> ORF 1a DE MSV 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS  
 178..7227

<400> 2

Met Ser Gly Met Phe Ser Arg Cys Met Cys Thr Pro Ala Ala Arg Val 1  
 5 10 15

Phe Trp Asn Ala Gly Gln Val Tyr Cys Thr Arg Cys Leu Ser Ala Arg  
 20 25 30

Ser Leu Leu Ser Pro Glu Leu Gln Asp Thr Asp Leu Gly Ala Val Gly 35  
 40 45

Leu Phe His Lys Pro Lys Asp Lys Leu His Trp Lys Val Pro Ile Gly 50  
 55 60

Ile Pro Gln Val Glu Cys Ser Pro Ser Gly Cys Cys Trp Leu Ser Thr 65  
 70 75 80

Ile Phe Pro Leu Ala Arg Met Thr Ser Gly Asn His Asn Phe Leu Gln  
 85 90 95

Arg Leu Val Lys Val Ala Asp Val Leu Tyr Arg Asp Gly Cys Leu Thr  
 100 105 110

15

ES 2 692 809 T3

Pro Arg His Leu Arg Glu Leu Gln Val Tyr Glu Arg Gly Cys Asn Trp 115  
 120 125

Tyr Pro Ile Thr Gly Pro Val Pro Gly Met Ala Val Tyr Ala Asn Ser 130  
 135 140

Met His Val Ser Asp Gln Pro Phe Pro Gly Ala Thr His Val Leu Thr 145  
 150 155 160

Asn Ser Pro Leu Pro Gln Arg Ala Cys Arg Gln Pro Phe Cys Pro Phe  
 165 170 175

Glu Glu Ala His Ser Ser Ile Tyr Arg Trp Glu Lys Phe Val Ile Phe  
 180 185 190

Met Asp Ser Ser Ser Asp Gly Arg Ser Arg Met Met Trp Thr Pro Glu 195  
 200 205

Ser Asp Asp Ser Thr Ala Leu Glu Val Leu Pro Pro Glu Leu Glu His 210  
 215 220

Gln Val Lys Val Leu Val Arg Ser Phe Pro Ala His His Leu Val Asp 225  
 230 235 240

Leu Ala Asp Trp Glu Leu Thr Glu Ser Pro Asp Asn Gly Phe Ser Phe  
 245 250 255

Ser Thr Ser His Pro Cys Gly Tyr Leu Val Arg Asp Pro Ala Val Ser  
 260 265 270

Glu Gly Lys Cys Trp Leu Ser Cys Phe Leu Ser Gln Ser Ala Glu Val 275  
 280 285

Leu Ser Arg Glu Ala His Leu Ala Thr Ala Tyr Gly Tyr Gln Thr Lys 290  
 295 300

Trp Gly Val Pro Gly Lys Tyr Ile Gln Arg Arg Leu Gln Val His Gly 305

ES 2 692 809 T3

310 315 320

Leu Arg Ala Val Val Asp Pro Asp Gly Pro Ile His Val Glu Ala Leu  
325 330 335

Ser Cys Pro Gln Ser Trp Ile Arg His Leu Thr Leu Asn Asp Asp Val  
340 345 350

Thr Pro Gly Phe Val Arg Leu Met Ser Leu Arg Ile Val Pro Asn Thr 355  
360 365

Glu Pro Thr Thr His Arg Ile Phe Arg Phe Gly Val His Lys Trp Tyr 370  
375 380

Gly Ala Ala Gly Lys Arg Ala Arg Gly Lys Arg Ala Ala Lys Ser Glu 385  
390 395 400

Lys Asp Ser Ala Ser Thr Leu Lys Val Ala Arg Pro Thr Ser Thr Ser  
405 410 415

Gly Ile Val Thr Tyr Ser Pro Pro Ala Asp Gly Ser Cys Gly Trp His  
420 425 430

Ala Leu Ala Ala Ile Leu Asn Arg Met Ile Asn Asn Asp Phe Thr Ser 435  
440 445

Pro Leu Pro Arg Tyr Asn Arg Pro Glu Asp Asp Trp Ala Ser Asp Gly 450  
455 460

Asp Leu Ala Gln Ala Ile Gln Cys Leu Gln Leu Pro Ala Ala Ile Ala 465  
470 475 480

Arg Asn Arg Ala Cys Pro Asn Ala Lys Tyr Leu Ile Lys Leu Asn Gly  
485 490 495

Val His Trp Glu Val Glu Val Arg Pro Gly Met Ala Pro Arg Ser Leu  
500 505 510

ES 2 692 809 T3

Ser Arg Glu Cys Val Val Gly Val Cys Ser Glu Gly Cys Val Ala Ser 515  
520 525

Pro Tyr Pro Glu Asp Gly Leu Pro Lys Arg Ala Leu Glu Ala Leu Ala 530  
535 540

Ser Ala Tyr Arg Leu Pro Ser Asp Cys Val Cys Asp Gly Ile Ile Asp 545  
550 555 560

Phe Leu Ala Asn Pro Pro Pro Gln Glu Phe Trp Thr Leu Asp Lys Met  
565 570 575

Leu Thr Ser Pro Ser Pro Glu Gln Ser Gly Phe Ser Ser Leu Tyr Lys  
580 585 590

Leu Leu Leu Glu Ile Leu Pro Gln Lys Cys Gly Ser Thr Glu Gly Glu 595  
600 605

Phe Ile Tyr Thr Val Glu Arg Met Leu Lys Asp Cys Pro Ser Ser Lys 610  
615 620

Gln Ala Met Ala Leu Leu Ala Lys Ile Lys Val Pro Ser Ser Lys Ala 625  
630 635 640

Pro Ser Val Thr Leu Asn Glu Cys Phe Pro Thr Asp Val Pro Val Asn  
645 650 655

Ser Glu Leu Ile Ser Trp Glu Glu Pro Lys Asp Pro Gly Ala Ala Val  
660 665 670

Val Leu Cys Pro Ser Asp Ala Lys Glu Ser Lys Glu Thr Ala Pro Glu 675  
680 685

Glu Ala Gln Ala Arg Asn Arg Lys Val Leu His Pro Val Val Leu Thr 690  
695 700

Glu Glu Leu Ser Glu Gln Gln Val Gln Val Val Glu Gly Asp Gln Asp 705  
710 715 720

ES 2 692 809 T3

Met Pro Leu Asp Leu Thr Trp Pro Thr Leu Thr Ala Thr Ala Thr Pro  
725 730 735

Val Arg Gly Pro Val Pro Asp Asn Leu Ser Ser Gly Ile Gly Ala Gln  
740 745 750

Pro Ala Thr Val Gln Glu Leu Ile Leu Ala Arg Pro Ala Pro Arg Leu 755  
760 765

Val Glu Arg Cys Gly Thr Glu Ser Asn Gly Ser Ser Ser Phe Leu Asp 770  
775 780

Leu Pro Asp Val Gln Thr Ser Asp Gln Pro Leu Asp Leu Ser Leu Ala 785  
790 795 800

Ala Trp Pro Val Arg Ala Thr Ala Ser Asp Pro Gly Trp Ile His Gly  
805 810 815

Arg Arg Glu Pro Val Phe Val Lys Pro Arg Gly Val Phe Ser Asp Gly  
820 825 830

Glu Ser Ala Leu Gln Phe Gly Glu Leu Ser Glu Ala Ser Ser Val Val 835  
840 845

Asp Asp Arg Thr Lys Glu Ala Pro Val Val Asp Ala Pro Ile Asp Leu 850  
855 860

Thr Thr Ser Asn Glu Thr Leu Ser Gly Ser Asp Pro Phe Glu Phe Ala 865  
870 875 880

Lys Phe Arg Arg Pro Arg Phe Ser Ala Gln Ala Leu Ile Asp Arg Gly  
885 890 895

Gly Pro Leu Ala Asp Val His Ala Lys Ile Lys Ser Arg Val Tyr Glu  
900 905 910

ES 2 692 809 T3

Gln Cys Leu Gln Ala Cys Glu Pro Gly Ser Arg Ala Thr Pro Ala Thr 915  
920 925

Lys Lys Trp Leu Asp Lys Met Trp Asp Arg Val Asp Met Lys Thr Trp 930  
935 940

Arg Cys Thr Ser Gln Phe Gln Ala Gly His Ile Leu Glu Ser Leu Lys 945  
950 955 960

Phe Leu Pro Asp Met Ile Gln Asp Thr Pro Pro Pro Val Pro Arg Lys  
965 970 975

Asn Arg Ala Gly Asp Ser Ala Gly Leu Lys Gln Leu Val Ala Gln Trp  
980 985 990

Asp Arg Lys Ser Ser Val Thr Pro Pro Thr Lys Pro Val Gly Pro Val  
995 1000 1005

Leu Asp Gln Ala Val Pro Leu Pro Met Asp Ile Gln Gln Gly Asp 1010  
1015 1020

Ala Ile Ser Ala Asp Lys Pro Pro His Ser Gln Asn Pro Ser Ser 1025  
1030 1035

Gln Val Asp Val Gly Gly Gly Trp Lys Ser Phe Met Leu Ser Gly 1040  
1045 1050

Thr Arg Phe Ala Gly Ser Val Ser Gln Arg Leu Thr Thr Trp Val 1055  
1060 1065

Phe Glu Val Leu Ser His Leu Pro Ala Phe Met Leu Thr Leu Phe 1070  
1075 1080

Ser Pro Arg Gly Ser Met Ala Pro Gly Asp Trp Leu Phe Ala Gly 1085  
1090 1095

Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Leu Cys Arg Ser Tyr Pro Ile Leu 1100  
1105 1110

ES 2 692 809 T3

Gly Cys 1120	Leu Pro Leu Leu Gly 1125	Val Phe Ser Gly Ser	Val Arg Cys	1115
Val Arg 1135	Leu Gly Val Phe Gly 1140	Ser Trp Met Ala Phe	Ala Val Phe	1130
Leu Phe 1150	Ser Thr Pro Pro Asp 1155	Pro Val Gly Ser Ser	Cys Asp His	1145
Asp Ser 1165	Pro Glu Cys His Ala 1170	Glu Leu Leu Ala Leu	Glu Gln Arg	1160
Gln Leu 1180	Trp Glu Pro Val Arg 1185	Ser Leu Val Val Gly	Pro Ser Gly	1175
Leu Leu 1195	Cys Val Ile Leu Gly 1200	Lys Leu Leu Gly Gly	Ser Arg Cys	1190
Leu Trp 1210	Phe Val Leu Leu Arg 1215	Ile Cys Met Leu Ala	Asp Leu Ala	1205
Ile Ser 1225	Leu Ile Tyr Val Val 1230	Ser Gln Gly Arg Cys	His Lys Cys	1220
Trp Gly 1240	Lys Cys Ile Arg Thr 1245	Ala Pro Ala Glu Val	Ala Leu Asn	1235
Val Phe 1255	Pro Phe Ser Arg Ala 1260	Thr Arg Ser Ser Leu	Val Ser Leu	1250
Cys Asp 1270	Arg Phe Gln Ala Pro 1275	Lys Gly Val Asp Pro	Val His Leu	1265
Ala Thr 1285	Gly Trp Arg Gly Cys 1290	Trp Cys Gly Glu Ser	Pro Ile His	1280
Gln Ser	His Gln Lys Pro Ile	Ala Tyr Ala Asn Leu	Asp Glu Lys	1295

ES 2 692 809 T3

1300		1305										
Lys Ile 1315	Ser Ala Gln	Thr Val 1320	Ile Ala Val	Pro Tyr	Asp Pro Ser							1310
Gln Ala 1330	Ile Lys Cys	Leu Lys 1335	Val Leu Gln	Ala Gly	Gly Ala Ile							1325
Val Asp 1345	Gln Pro Thr	Pro Glu 1350	Val Val Arg	Val Ser	Glu Ile Pro							1340
Phe Ser 1360	Ala Pro Phe	Phe Pro 1365	Lys Val Pro	Val Asn	Pro Asp Cys							1355
Arg Val 1375	Val Val Asp	Ser Asp 1380	Thr Phe Val	Ala Ala	Val Arg Cys							1370
Gly Tyr 1390	Ser Thr Ala	Gln Leu 1395	Val Leu Gly	Arg Gly	Asn Phe Ala							1385
Lys Leu 1405	Asn Gln Thr	Pro Leu 1410	Arg Asn Ser	Val Pro	Thr Lys Thr							1400
Thr Gly 1420	Gly Ala Ser	Tyr Thr 1425	Leu Ala Val	Ala Gln	Val Ser Val							1415
Trp Thr 1435	Leu Val His	Phe Ile 1440	Leu Gly Leu	Trp Leu	Thr Ser Pro							1430
Gln Val 1450	Cys Gly Arg	Gly Thr 1455	Ser Asp Pro	Trp Cys	Ser Asn Pro							1445
Phe Ser 1465	Tyr Pro Thr	Tyr Gly 1470	Pro Gly Val	Val Cys	Ser Ser Arg							1460
Leu Cys 1480	Val Ser Ala	Asp Gly 1485	Val Thr Leu	Pro Leu	Phe Ser Ala							1475



ES 2 692 809 T3

Val Ala 1495	His Leu Ser 1500	Gly Arg 1500	Glu Val Gly Ile Phe 1500	Ile Leu Val 1495	1490
Leu Ala 1510	Ser Leu Gly 1515	Ala Leu 1515	Ala His Arg Leu Ala 1515	Leu Lys Ala 1510	1505
Asp Met 1525	Ser Met Val 1530	Phe Leu 1530	Ala Phe Cys Ala Tyr 1530	Ala Trp Pro 1525	1520
Met Ser 1540	Ser Trp Leu 1545	Ile Cys 1545	Phe Phe Pro Met Leu 1545	Leu Arg Trp 1540	1535
Val Thr 1555	Leu His Pro 1560	Leu Thr 1560	Met Leu Trp Val His 1560	Ser Phe Leu 1555	1550
Val Phe 1570	Cys Leu Pro 1575	Ala Ala 1575	Gly Val Leu Ser Leu 1575	Gly Ile Thr 1570	1565
Gly Leu 1585	Leu Trp Ala 1590	Val Gly 1590	Arg Phe Thr Gln Val 1590	Ala Gly Ile 1585	1580
Ile Thr 1600	Pro Tyr Asp 1605	Ile His 1605	Gln Tyr Thr Ser Gly 1605	Pro Arg Gly 1600	1595
Ala Ala 1615	Ala Val Ala 1620	Thr Ala 1620	Pro Glu Gly Thr Tyr 1620	Met Ala Ala 1615	1610
Val Arg 1630	Arg Ala Ala 1635	Leu Thr 1635	Gly Arg Thr Leu Ile 1635	Phe Thr Pro 1630	1625
Ser Ala 1645	Val Gly Ser 1650	Leu Leu 1650	Glu Gly Ala Phe Arg 1650	Thr Gln Lys 1645	1640
Pro Cys 1660	Leu Asn Thr 1665	Val Asn 1665	Val Val Gly Ser Ser 1665	Leu Gly Ser 1660	1655
Gly Gly 1675	Val Phe Thr 1680	Ile Asp 1680	Gly Arg Arg Val Ile 1680	Val Thr Ala 1675	1670

ES 2 692 809 T3

Thr His 1690	Val Leu Asn 1695	Gly Asn	Thr Ala Arg Val Thr	Gly Asp Ser	1685
Tyr Asn 1705	Arg Met His 1710	Thr Phe	Asn Thr Asn Gly Asp	Tyr Ala Trp	1700
Ser His 1720	Ala Asp Asp 1725	Trp Gln	Gly Val Ala Pro Met	Val Lys Ile	1715
Ala Lys 1735	Gly Tyr Arg 1740	Gly Arg	Ala Tyr Trp Gln Thr	Ser Thr Gly	1730
Val Glu 1750	Pro Gly Ile 1755	Met Gly	Glu Gly Phe Ala Phe	Cys Phe Thr	1745
Asn Cys 1765	Gly Asp Ser 1770	Gly Ser	Pro Val Ile Ser Glu	Ala Gly Asp	1760
Leu Ile 1780	Gly Val His 1785	Thr Gly	Ser Asn Lys Leu Gly	Ser Gly Leu	1775
Val Thr 1795	Thr Pro Glu 1800	Gly Glu	Thr Cys Ser Ile Lys	Glu Thr Arg	1790
Leu Ser 1810	Asp Leu Ser 1815	Arg His	Phe Ala Gly Pro Ser	Val Pro Leu	1805
Gly Asp 1825	Ile Lys Leu 1830	Ser Pro	Ala Ile Ile Pro Asp	Val Thr Thr	1820
Ile Pro 1840	Ser Asp Leu 1845	Ala Ser	Leu Leu Ala Ser Val	Pro Val Met	1835
Glu Gly 1855	Gly Leu Ser 1860	Thr Val	Gln Leu Leu Cys Val	Phe Phe Leu	1850

ES 2 692 809 T3

Leu Trp 1870	Arg Met Met 1875	Gly His 1875	Ala Trp Thr Pro Ile 1875	Val Ala Val 1875	1865
Gly Phe 1885	Phe Leu Leu 1890	Asn Glu 1890	Ile Leu Pro Ala Val 1890	Leu Val Arg 1890	1880
Ala Val 1900	Phe Ser Phe 1905	Ala Leu 1905	Phe Val Leu Ala Trp 1905	Ala Thr Pro 1905	1895
Trp Ser 1915	Ala Gln Val 1920	Leu Met 1920	Ile Arg Leu Leu Thr 1920	Ala Ala Leu 1920	1910
Asn Arg 1930	Asn Arg Leu 1935	Ser Leu 1935	Ala Phe Tyr Ala Phe 1935	Gly Gly Val 1935	1925
Val Gly 1945	Leu Ala Thr 1950	Glu Ile 1950	Gly Thr Phe Ala Gly 1950	Gly Trp Pro 1950	1940
Glu Leu 1960	Ser Gln Ala 1965	Leu Ser 1965	Thr Tyr Cys Phe Leu 1965	Pro Arg Phe 1965	1955
Leu Ala 1975	Val Thr Ser 1980	Tyr Val 1980	Pro Thr Ile Ile Ile 1980	Gly Gly Leu 1980	1970
His Ala 1990	Leu Gly Val 1995	Ile Leu 1995	Trp Leu Phe Lys Tyr 1995	Arg Cys Leu 1995	1985
His Asn 2005	Met Leu Val 2010	Gly Asp 2010	Gly Ser Phe Ser Ser 2010	Ala Phe Phe 2010	2000
Leu Arg 2020	Tyr Phe Ala 2025	Glu Gly 2025	Asn Leu Arg Lys Gly 2025	Val Ser Gln 2025	2015
Ser Cys 2035	Gly Met Asn 2040	Asn Glu 2040	Ser Leu Thr Ala Ala 2040	Leu Ala Cys 2040	2030
Lys Leu 2050	Ser Gln Ala 2055	Asp Leu 2055	Asp Phe Leu Ser Ser 2055	Leu Thr Asn 2055	2045

ES 2 692 809 T3

Phe Lys 2065	Cys Phe Val	Ser Ala 2070	Ser Asn Met Lys Asn	Ala Ala Gly	2060
Gln Tyr 2080	Ile Glu Ala	Ala Tyr 2085	Ala Arg Ala Leu Arg	Gln Glu Leu	2075
Ala Ser 2095	Leu Val Gln	Val Asp 2100	Lys Met Lys Gly Val	Leu Ala Lys	2090
Leu Glu 2110	Ala Phe Ala	Glu Thr 2115	Ala Thr Pro Ser Leu	Asp Thr Gly	2105
Asp Val 2125	Ile Val Leu	Leu Gly 2130	Gln His Pro His Gly	Ser Ile Leu	2120
Asp Ile 2140	Asn Val Gly	Gly Glu 2145	Arg Lys Thr Val Ser	Val Gln Glu	2135
Thr Arg 2155	Cys Leu Gly	Gly Ser 2160	Lys Phe Ser Val Cys	Thr Val Val	2150
Ser Asn 2170	Thr Pro Val	Asp Thr 2175	Leu Thr Gly Ile Pro	Leu Gln Thr	2165
Pro Thr 2185	Pro Leu Phe	Glu Asn 2190	Gly Pro Arg His Arg	Ser Glu Asp	2180
Asp Asp 2200	Leu Lys Val	Glu Arg 2205	Met Lys Lys His Cys	Val Ser Leu	2195
Gly Phe 2215	His Lys Ile	Asn Gly 2220	Lys Val Tyr Cys Lys	Ile Trp Asp	2210
Lys Ser 2230	Asn Gly Asp	Thr Phe 2235	Tyr Thr Asp Asp Ser	Arg Tyr Thr	2225
Gln Asp	His Ala Phe	Gln Asp	Arg Ser Thr Asp Tyr	Arg Asp Arg	2240

ES 2 692 809 T3

2245

2250

Asp Tyr Glu Gly Val Gln Thr Ala Pro Gln Gln Gly Phe Asp Pro 2255  
2260 2265

Lys Ser Glu Ala Pro Val Gly Thr Val Val Ile Gly Gly Ile Thr 2270  
2275 2280

Tyr Asn Arg His Leu Val Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Pro Lys 2285  
2290 2295

Pro Asp Asn Cys Leu Glu Ala Ala Arg Leu Ser Leu Glu Gln Ala 2300  
2305 2310

Leu Ala Gly Met Gly Gln Thr Cys Asp Leu Thr Ala Thr Glu Val 2315  
2320 2325

Glu Lys Leu Lys Arg Ile Ile Ser Gln Leu Gln Gly Leu Thr Thr 2330  
2335 2340

Glu Gln Ala Leu Asn Cys 2345

<210> 3

<211> 1463

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> ORF 1B DE MSV 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 7209..11600

<400> 3

Thr Gly Phe Lys Leu Leu Ala Ala Ser Gly Leu Thr Arg Cys Gly Arg 1  
5 10 15

Gly Gly Leu Val Val Thr Glu Thr Ala Val Lys Ile Val Lys Tyr His  
20 25 30

Ser Arg Thr Phe Thr Leu Gly Ser Leu Asp Leu Lys Val Thr Ser Glu 35  
40 45

ES 2 692 809 T3

Val Glu Val Lys Lys Ser Thr Glu Gln Gly His Ala Val Val Ala Asn 50  
55 60

Leu Cys Ser Gly Val Val Leu Met Arg Pro His Pro Pro Ser Leu Val 65  
70 75 80

Asp Val Leu Leu Lys Pro Gly Leu Asp Thr Thr Pro Gly Ile Gln Pro  
85 90 95

Gly His Gly Ala Gly Asn Met Gly Val Asn Gly Ser Ile Trp Asp Phe  
100 105 110

Glu Thr Ala Pro Thr Lys Val Glu Leu Glu Leu Ser Lys Gln Ile Ile 115  
120 125

Gln Ala Cys Glu Val Arg Arg Gly Asp Ala Pro Asn Leu Gln Leu Pro 130  
135 140

Tyr Lys Leu Tyr Pro Val Arg Gly Asp Pro Glu Arg Arg Lys Gly Arg 145  
150 155 160

Leu Val Asn Thr Arg Phe Gly Asp Leu Pro Tyr Lys Thr Pro Gln Asp  
165 170 175

Thr Lys Ser Ala Ile His Ala Ala Cys Cys Leu His Pro Asn Gly Val  
180 185 190

Leu Val Ser Asp Gly Lys Ser Thr Leu Gly Thr Thr Leu Gln His Gly 195  
200 205

Phe Glu Leu Tyr Val Pro Thr Val Pro Tyr Ser Val Met Glu Tyr Leu 210  
215 220

Asp Ser Arg Pro Asp Thr Pro Phe Met Cys Thr Lys His Gly Thr Ser 225  
230 235 240

Lys Ala Ala Ala Glu Asp Leu Gln Lys Tyr Asp Leu Ser Thr Gln Gly  
245 250 255

ES 2 692 809 T3

Phe Val Leu Pro Gly Val Leu Arg Leu Val Arg Arg Phe Ile Phe Ser  
 260 265 270

His Val Gly Lys Ala Pro Pro Leu Phe Leu Pro Ser Thr Tyr Pro Ala 275  
 280 285

Lys Asn Ser Met Ala Gly Val Asn Gly Gln Arg Phe Pro Thr Lys Asp 290  
 295 300

Val Gln Ser Ile Pro Glu Ile Asp Glu Met Cys Ala Arg Ala Val Lys 305  
 310 315 320

Glu Asn Trp Gln Thr Val Thr Pro Cys Thr Leu Lys Lys Gln Tyr Cys  
 325 330 335

Ser Lys Pro Lys Thr Arg Thr Ile Leu Gly Thr Asn Asn Phe Ile Ala  
 340 345 350

Leu Ala His Arg Ser Ala Leu Ser Gly Val Thr Gln Ala Phe Met Lys 355  
 360 365

Lys Ala Trp Lys Ser Pro Ile Ala Leu Gly Lys Asn Lys Phe Lys Glu 370  
 375 380

Leu His Cys Thr Val Ala Gly Arg Cys Leu Glu Ala Asp Leu Ala Ser 385  
 390 395 400

Cys Asp Arg Ser Thr Pro Ala Ile Val Arg Trp Phe Val Ala Asn Leu  
 405 410 415

Leu Tyr Glu Leu Ala Gly Cys Glu Glu Tyr Leu Pro Ser Tyr Val Leu  
 420 425 430

Asn Cys Cys His Asp Leu Val Ala Thr Gln Asp Gly Ala Phe Thr Lys 435  
 440 445

ES 2 692 809 T3

Arg Gly Gly Leu Ser Ser Gly Asp Pro Val Thr Ser Val Ser Asn Thr 450  
455 460

Val Tyr Ser Leu Ile Ile Tyr Ala Gln His Met Val Leu Ser Ala Leu 465  
470 475 480

Lys Met Gly His Glu Ile Gly Leu Lys Phe Leu Glu Glu Gln Leu Lys  
485 490 495

Phe Glu Asp Leu Leu Glu Ile Gln Pro Met Leu Val Tyr Ser Asp Asp  
500 505 510

Leu Val Leu Tyr Ala Glu Arg Pro Thr Phe Pro Asn Tyr His Trp Trp 515  
520 525

Val Glu His Leu Asp Leu Met Leu Gly Phe Lys Thr Asp Pro Lys Lys 530  
535 540

Thr Val Ile Thr Asp Lys Pro Ser Phe Leu Gly Cys Arg Ile Glu Ala 545  
550 555 560

Gly Arg Gln Leu Val Pro Asn Arg Asp Arg Ile Leu Ala Ala Leu Ala  
565 570 575

Tyr His Met Lys Ala Gln Asn Ala Ser Glu Tyr Tyr Ala Ser Ala Ala  
580 585 590

Ala Ile Leu Met Asp Ser Cys Ala Cys Ile Asp His Asp Pro Glu Trp 595  
600 605

Tyr Glu Asp Leu Ile Cys Gly Ile Ala Arg Cys Ala Arg Gln Asp Gly 610  
615 620

Tyr Arg Phe Pro Gly Pro Ala Phe Phe Met Ser Met Trp Glu Lys Leu 625  
630 635 640

Lys Ser His Asn Glu Gly Lys Lys Cys Arg His Cys Gly Ile Cys Asp  
645 650 655



ES 2 692 809 T3

Ala Lys Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Cys Gly Leu Asp Leu Cys Leu Phe  
660 665 670

His Ser His Phe His Gln His Cys Pro Val Thr Leu Ser Cys Gly His 675  
680 685

His Ala Gly Ser Lys Glu Cys Ser Gln Cys Gln Ser Pro Val Gly Ala 690  
695 700

Gly Lys Ser Pro Leu Asp Ala Val Leu Lys Gln Ile Pro Tyr Lys Pro 705  
710 715 720

Pro Arg Thr Ile Ile Met Lys Val Asp Asn Lys Thr Thr Thr Leu Asp  
725 730 735

Pro Gly Arg Tyr Gln Ser Arg Arg Gly Leu Val Ala Val Lys Arg Gly  
740 745 750

Ile Ala Gly Asn Glu Val Asp Leu Ser Asp Gly Asp Tyr Gln Val Val 755  
760 765

Pro Leu Leu Pro Thr Cys Lys Asp Ile Asn Met Val Lys Val Ala Cys 770  
775 780

Asn Val Leu Leu Ser Lys Phe Ile Val Gly Pro Pro Gly Ser Gly Lys 785  
790 795 800

Thr Thr Trp Leu Leu Asn Gln Val Gln Asp Asp Asp Val Ile Tyr Thr  
805 810 815

Pro Thr His Gln Thr Met Phe Asp Ile Val Ser Ala Leu Lys Val Cys  
820 825 830

Arg Tyr Ser Ile Pro Gly Ala Ser Gly Leu Pro Phe Pro Pro Pro Ala 835  
840 845

Arg Ser Gly Pro Trp Val Arg Leu Ile Ala Ser Gly His Val Pro Gly 850

ES 2 692 809 T3

855

860

Arg Val Ser Tyr Leu Asp Glu Ala Gly Tyr Cys Asn His Leu Asp Ile 865  
870 875 880

Leu Arg Leu Leu Ser Lys Thr Pro Leu Val Cys Leu Gly Asp Leu Gln  
885 890 895

Gln Leu His Pro Val Gly Phe Asp Ser Tyr Cys Tyr Val Phe Asp Gln  
900 905 910

Met Pro Gln Lys Gln Leu Thr Thr Ile Tyr Arg Phe Gly Pro Asn Ile 915  
920 925

Cys Ala Ala Ile Gln Pro Cys Tyr Arg Glu Lys Leu Glu Ser Lys Ala 930  
935 940

Arg Asn Thr Arg Val Val Phe Thr Thr Arg Pro Val Ala Phe Gly Gln 945  
950 955 960

Val Leu Thr Pro Tyr His Lys Asp Arg Thr Gly Ser Ala Ile Thr Ile  
965 970 975

Asp Ser Ser Gln Gly Ala Thr Phe Asp Ile Val Thr Leu His Leu Pro  
980 985 990

Ser Pro Lys Ser Leu Asn Lys Ser Arg Ala Leu Val Ala Ile Thr Arg  
995 1000 1005

Ala Arg His Gly Leu Phe Ile Tyr Asp Pro His Asp Gln Leu Gln 1010  
1015 1020

Glu Phe Phe Asn Leu Thr Pro Glu Arg Thr Asp Cys Asn Leu Ala 1025  
1030 1035

Phe Ser Arg Gly Asp Glu Leu Val Val Leu Asn Val Asp Asn Ala 1040  
1045 1050

ES 2 692 809 T3

Val Thr 1060	Thr Val	Ala Lys Ala 1065	Leu Glu Thr Gly Ser	Pro Arg Phe	1055
Arg Val 1075	Ser Asp Pro	Arg Cys 1080	Lys Ser Leu Leu Ala	Ala Cys Ser	1070
Ala Ser 1090	Leu Glu Gly	Ser Cys 1095	Met Pro Leu Pro Gln	Val Ala His	1085
Asn Leu 1105	Gly Phe Tyr	Phe Ser 1110	Pro Asp Ser Pro Ala	Phe Ala Pro	1100
Leu Pro 1120	Lys Glu Leu	Ala Pro 1125	His Trp Pro Val Val	Thr His Gln	1115
Asn Asn 1135	Arg Ala Trp	Pro Asp 1140	Arg Leu Val Ala Ser	Met Arg Pro	1130
Ile Asp 1150	Ala Arg Tyr	Ser Lys 1155	Pro Met Val Gly Ala	Gly Tyr Val	1145
Val Gly 1165	Pro Ser Ile	Phe Leu 1170	Gly Thr Pro Gly Val	Val Ser Tyr	1160
Tyr Leu 1180	Thr Leu Tyr	Ile Gly 1185	Gly Glu Pro Gln Ala	Leu Pro Glu	1175
Thr Leu 1195	Val Ser Thr	Gly Arg 1200	Ile Ala Thr Asp Cys	Arg Glu Tyr	1190
Leu Asp 1210	Ala Ala Glu	Glu Glu 1215	Ala Ala Arg Glu Leu	Pro His Ala	1205
Phe Ile 1225	Gly Asp Val	Lys Gly 1230	Thr Thr Ile Gly Gly	Cys His His	1220
Ile Thr 1240	Ser Lys Tyr	Leu Pro 1245	Arg Ser Leu Pro Lys	Asp Ser Val	1235

ES 2 692 809 T3

Ala Val 1255	Val Gly Val 1260	Ser Ser 1260	Pro Gly Arg Ala Ala 1260	Lys Ala Val 1260	1250
Cys Thr 1270	Leu Thr Asp 1275	Val Tyr 1275	Leu Pro Glu Leu Arg 1275	Pro Tyr Leu 1275	1265
Gln Pro 1285	Glu Thr Ala 1290	Ser Lys 1290	Cys Trp Lys Leu Lys 1290	Leu Asp Phe 1290	1280
Arg Asp 1300	Val Arg Leu 1305	Met Val 1305	Trp Lys Gly Ala Thr 1305	Ala Tyr Phe 1305	1295
Gln Leu 1315	Glu Gly Leu 1320	Thr Trp 1320	Ser Ala Leu Pro Asp 1320	Tyr Ala Arg 1320	1310
Phe Ile 1330	Gln Leu Pro 1335	Lys Asp 1335	Ala Val Val Tyr Ile 1335	Asp Pro Cys 1335	1325
Ile Gly 1345	Pro Ala Thr 1350	Ala Asn 1350	Arg Lys Val Val Arg 1350	Thr Thr Asp 1350	1340
Trp Arg 1360	Ala Asp Leu 1365	Ala Val 1365	Thr Pro Tyr Asp Tyr 1365	Gly Ala Gln 1365	1355
Val Ile 1375	Leu Thr Thr 1380	Ala Trp 1380	Phe Glu Asp Leu Gly 1380	Pro Gln Trp 1380	1370
Lys Ile 1390	Leu Gly Leu 1395	Gln Pro 1395	Phe Arg Arg Thr Phe 1395	Gly Phe Glu 1395	1385
Asn Thr 1405	Glu Asp Trp 1410	Ala Ile 1410	Leu Ala Arg Arg Met 1410	Asn Asp Gly 1410	1400
Lys Asp 1420	Tyr Thr Asp 1425	Tyr Asn 1425	Trp His Cys Val Arg 1425	Glu Arg Pro 1425	1415
His Ala 1435	Ile Tyr Gly 1440	Arg Ala 1440	Arg Asp His Thr Tyr 1440	His Phe Ala 1440	1430
Leu Gly 1450	Thr Glu Leu 1455	Gln Val 1455	Glu Leu Gly Arg Pro 1455	Arg Leu Pro 1455	1445
Pro Glu 1460	Gln Val Pro 1460				1460

5 <210> 4  
<211> 249

ES 2 692 809 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 5 <223> ORF 2 DE MSV 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS  
 11611..12360

<400> 4

Met Gln Trp Val Tyr Cys Gly Val Lys Ser Val Ser Cys Ser Trp Met 1  
 5 10 15

Pro Ser Leu Ser Ser Leu Leu Val Trp Leu Thr Leu Ser Ser Phe Ser  
 20 25 30

Pro Tyr Cys Leu Gly Ser Leu Leu Gln Ala Gly Tyr Trp Ser Ser Phe 35  
 40 45

Ser Glu Trp Phe Ala Pro Arg Phe Ser Val Arg Ala Leu Pro Phe Thr 50  
 55 60

Leu Pro Asn Tyr Arg Arg Ser Tyr Glu Gly Leu Leu Pro Asn Cys Arg 65  
 70 75 80

Pro Asp Val Pro Gln Phe Ala Val Lys His Pro Leu Gly Ile Leu Trp  
 85 90 95

His Met Arg Val Ser His Leu Ile Asp Glu Met Val Ser Arg Arg Ile  
 100 105 110

10 Tyr Arg Thr Met Glu His Ser Gly Gln Ala Ala Trp Lys Gln Val Val 115  
 120 125

ES 2 692 809 T3

Ser Glu Ala Thr Leu Thr Lys Leu Ser Arg Leu Asp Val Val Thr His 130  
135 140

Phe Gln His Leu Ala Ala Val Glu Ala Asp Ser Cys Arg Phe Leu Ser 145  
150 155 160

Ser Arg Leu Ala Met Leu Lys Asn Leu Ala Val Gly Asn Val Ser Leu  
165 170 175

Glu Tyr Asn Thr Thr Leu Asp Arg Val Glu Leu Ile Phe Pro Thr Pro  
180 185 190

Gly Thr Arg Pro Lys Leu Thr Asp Phe Arg Gln Trp Leu Ile Ser Val 195  
200 205

His Ala Ser Ile Phe Ser Ser Val Ala Ser Ser Val Thr Leu Phe Thr 210  
215 220

Val Leu Trp Leu Arg Ile Pro Ala Leu Arg Tyr Val Phe Gly Phe His 225  
230 235 240

Trp Pro Thr Ala Thr His His Ser Asn 245

<210> 5

<211> 265

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> ORF 3 DE MSV 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS  
12219..13016

<400> 5

Met Ala Tyr Gln Arg Ala Arg Phe His Leu Leu Leu Cys Gly Phe Val 1  
5 10 15

Cys Tyr Leu Val His Ser Ala Leu Ala Ser Asn Ser Ser Ser Thr Leu  
20 25 30

15 Cys Phe Trp Phe Pro Leu Ala His Gly Asn Thr Ser Phe Glu Leu Thr 35



ES 2 692 809 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> ORF 4 DE MSV 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 12761..13312

<400> 6

Met Ala Ala Thr Ile Leu Phe Leu Leu Ala Gly Ala Gln His Leu Met 1  
5 10 15

Val Ser Glu Ala Phe Ala Cys Lys Pro Cys Phe Ser Thr His Leu Ser  
20 25 30

Asp Ile Lys Thr Asn Thr Thr Ala Ala Ala Gly Phe Met Val Leu Gln 35  
40 45

Asn Ile Asn Cys Phe Gln Ser His Arg Ala Ser Thr Ala Gln Gly Thr 50  
55 60

Thr Pro Leu Arg Arg Ser Ser Gln Cys Arg Glu Ala Val Gly Ile Pro 65  
70 75 80

Gln Tyr Ile Thr Ile Thr Ala Asn Val Thr Asp Glu Ser Tyr Leu Tyr  
85 90 95

Asn Ala Asp Leu Leu Met Leu Ser Ala Cys Leu Phe Tyr Ala Ser Glu  
100 105 110

Met Ser Glu Lys Gly Phe Lys Val Ile Phe Gly Asn Ile Ser Gly Val 115  
120 125

Val Ser Ala Cys Val Asn Phe Thr Asp Tyr Val Ala His Val Thr Gln 130  
135 140

10 His Thr Gln Gln His His Leu Val Ile Asp His Ile Arg Leu Leu His 145  
150 155 160

Phe Leu Thr Pro Ser Thr Met Arg Trp Ala Thr Thr Ile Ala Cys Leu  
165 170 175

Leu Ala Ile Leu Leu Ala Val 180

<210> 7

<211> 201

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>



ES 2 692 809 T3

<223> ORF 5 DE MSV 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 13309..13914

<400> 7

5

Met Lys Cys Ser Cys Lys Leu Gly His Phe Leu Thr Pro His Ser Cys 1  
5 10 15

Phe Trp Trp Leu Phe Leu Leu Cys Thr Gly Leu Ser Trp Ser Phe Val  
20 25 30

Asp Gly Asn Asp Asp Ser Ser Thr Ser Gln Tyr Ile Tyr Asn Leu Thr 35  
40 45

Ile Cys Glu Leu Asn Gly Thr Glu Trp Leu Ser Gly His Phe Asp Trp 50  
55 60

Ala Val Glu Thr Phe Val Leu Tyr Pro Val Ala Thr His Ile Ile Ser 65  
70 75 80

Leu Gly Phe Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Ala Leu Gly Leu Gly  
85 90 95

Ala Val Ser Ala Thr Gly Phe Ile Gly Glu Arg Tyr Val Leu Ser Ser  
100 105 110

Met Tyr Gly Val Cys Ala Phe Ala Ala Phe Val Cys Phe Val Ile Arg 115  
120 125

Ala Ala Lys Asn Cys Met Ala Cys Arg Tyr Ala Arg Thr Arg Phe Thr 130  
135 140

Asn Phe Ile Val Asp Asp Arg Gly Arg Ile His Arg Trp Lys Ser Ser 145  
150 155 160

Ile Val Val Glu Lys Leu Gly Lys Ala Glu Val Gly Gly Asp Leu Val  
165 170 175

Asn Ile Lys His Val Val Leu Glu Gly Val Lys Ala Gln Pro Leu Thr  
180 185 190

Arg Thr Ser Ala Glu Gln Trp Glu Ala 195 200

10

<210> 8  
<211> 173  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15

<220>

ES 2 692 809 T3

<223> ORF 6 DE MSV 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 13902..14423

<400> 8

5

```

Met Gly Ser Leu Asp Asp Phe Cys Asn Asp Pro Thr Ala Ala Gln Lys 1
 5                               10                               15

Leu Val Leu Ala Phe Ser Ile Thr Tyr Thr Pro Ile Met Ile Tyr Ala
20                               25                               30

Leu Lys Val Ser Arg Gly Arg Leu Leu Gly Leu Leu His Ile Leu Ile           35
40                               45

Phe Leu Asn Cys Ser Phe Thr Phe Gly Tyr Met Thr Tyr Val His Phe           50
55                               60

Gln Ser Thr Asn Arg Val Ala Phe Thr Leu Gly Ala Val Val Ala Leu 65
70                               75                               80

Leu Trp Gly Val Tyr Ser Leu Thr Glu Ser Trp Lys Phe Ile Thr Ser
85                               90                               95

Arg Cys Arg Leu Cys Cys Leu Gly Arg Arg Tyr Ile Leu Ala Pro Ala
100                              105                              110

His His Val Glu Ser Ala Ala Gly Leu His Ser Ile Pro Ala Ser Gly           115
120                              125

Asn Arg Ala Tyr Ala Val Arg Lys Pro Gly Leu Thr Ser Val Asn Gly           130
135                              140

Thr Leu Val Pro Gly Leu Arg Ser Leu Val Leu Gly Gly Lys Arg Ala 145
150                              155                              160

Val Lys Arg Gly Val Val Asn Leu Val Lys Tyr Gly Arg                       165
170

```

10

<210> 9  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>  
 <223> ORF 7 DE MSV 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 14413..14799

20

<400> 9

ES 2 692 809 T3

Met Ala Gly Lys Asn Gln Ser Gln Lys Lys Arg Arg Asn Ala Ala Pro 1  
 5 10 15

Met Gly Lys Gly Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Leu Leu Gly Thr  
 20 25 30

Met Ile Lys Ser Gln Arg Gln Gln Ser Arg Gly Gly Gln Ala Lys Lys 35  
 40 45

Lys Lys Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Ala Glu Asp Asp Ile 50  
 55 60

Arg His His Leu Thr Gln Ala Glu Arg Ser Leu Cys Leu Gln Ser Ile 65  
 70 75 80

Gln Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Ala Ser Leu Ser Ser Ser  
 85 90 95

Gly Lys Val Ser Phe Gln Val Glu Phe Met Leu Pro Val Ala His Thr  
 100 105 110

Val Arg Leu Ile Arg Val Thr Ser Thr Ser Ala Ser Gln Gly Ala Asn 115  
 120 125

- 5 <210> 10
- <211> 14843
- <212> DNA
- <213> Virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino

10 <400> 10

ES 2 692 809 T3

tttgtgtacc ttggaggcgt gggtagacgcc ctgccccacc cettggcccc tgttctagcc	60
cgacaggtag ccttctctct cggggcgagc gcgcccctg ctgctccctt gcggcgggaa	120
ggacctcccg agtatttccg gagagcacct gctttacggg atctccgcc ttaaccatg	180
tctgggatgt tctcccgggt catgtgcacc ccggctgcc ggtattttg gaacgccggc	240
caagtctatt gcacacggtg tctcagtga cggctctctt tctctccaga acttcaggac	300
acggacctcg gtgcagttgg cttgtttcac aagcctaaag acaagctcca ttggaaagt	360
cccatggta tccccagggt ggaatgttct ccatctgggt gttgctggct gtcaaccatt	420
tttccttag cgcgatgac ctccggcaat cacaacttcc ttcaacgact cgtgaaggt	480
gctgacgtat tgtaccgtga cggttgctta acccctagac acctccgtga actccaagt	540
tacgagcgtg gttgcaattg gtatccgatt acggggcctg tgccctggat ggctgtgtac	600
gcgaactcca tgcacgtgtc cgaccaaccg ttccctgggt ccaactcatgt gtaacaaat	660
tcccctttgc ctcaacgggc ttgtcggcag ccgttctgtc cgttcgaaga ggccattct	720
agcatataca ggtgggaaaa atttgtaatt tttatggatt cctcctccga cggctgatct	780
cgcatgatgt ggactccgga atccgatgac tccacggctt tggaagtctt gccgcccag	840
ctagaacacc aggtcaaggt ccttgttcgg agctttccc cccatcacct tgtcgacctt	900
gccgattggg agctcactga gtcccctgag aacggttttt ccttcagcac gtcacatcct	960
tgcggctacc ttgttcggga cccggctgta tccgaaggca agtgttggct ttctgcttt	1020
ttgagccagt cagccgaagt gctcagtcgc gaggcgcac tggtaccgc ctatggttac	1080
caaaccaagt ggggtgtgcc tggcaagtac atccagcgca gacttcaagt tcacggtctc	1140

ES 2 692 809 T3

cgtgctgtgg tcgaccctga tgggccatt cacggtgaag cattgtcttg cccccagtct 1200  
 tggatcaggc acttgaccct gaatgatgat gtcaccccg gattcgttcg cctaagtctct 1260  
 cttcgcattg tgccgaacac agagcctacc acacaccgga tctttcgttt tggagtgcac 1320  
 aagtggatg gtgccgccgg caaacggggc cgtggcaagc gtgccgcaa aagtgagaaa 1380  
 gactcggctt ccaccctcaa ggttgcccga ccgacttcca ccagtggaat cgtcacctac 1440  
 tccccacctg cggacgggtc ttgtggttg catgcccttg ccgccatact gaaccggatg 1500  
 attaataatg acttcacgtc ccctctgcct cggatcaaca gcccgaggga cgattgggct 1560  
 tctgatggtg acctgtctca ggccattcaa tgtttgcaac tacctgccgc catagctcgg 1620  
 aaccgcgctt gccctaacgc caaatacctc gtaaaactca acggagttca ttgggaggta 1680  
 gaggtgagggc ctggaatggc tcctcgtctc ctctctcgtg agtgcggttg tggcgtctgc 1740  
 tctgaaggct gtgtcgcgtc gccttaccg gaggacgggt tgcctaaacg tgcacttgag 1800  
 gccctggcgt ctgcttatag actgccttca gactgtgttt gtgatggtat tattgacttc 1860  
 cttgccaatc cacctcccca ggagttctgg actcttgaca aaatggtgac ttccccgta 1920  
 ccggagcagt ccggcttctc tagtctgtat aaattgttg tagaggctct gccgcagaaa 1980  
 tgcggatcca cagaagggga attcatctat actggtgaga ggatggtgaa ggattgtccg 2040  
 agctccaaac aggccatggc cctccttgca aaaattaagg tcccatcctc aaaggcccca 2100  
 tccgtgactc tgaacgagtg cttccccacg gatgttccag tcaactctga gttaatatct 2160  
 tgggaagagc ccaaagacc tggcgtgct gttgtcctat gtccatcgga tgcaaaagaa 2220  
 tctaaggaaa cagcccctga agaagctcaa gcgagaaacc gtaaggctct ccaccctgtg 2280  
 gtccttaccg aggaacttag cgagcaacag gtgcaggtgg ttgaggggtga tcaggatatg 2340  
 ccaactggatt tgacttgcc aaccttaacc gctacggcga ccctggttag agggccggtg 2400  
 ccggacaatt tgagctctgg cattggtgcc cagcccgtc cgttcaaga actcattctg 2460  
 gcgaggcctg caccctgtct tgttgagcgc tgtggcacgg agtcaaacgg cagcagttca 2520  
 tttctggatt tgcctgacgt gcagacctc gaccagcctt tagacctgtc cctggccgcg 2580  
 tggcctgtaa gggctaccgc gtctgacccc ggttgatcc acggtaggcg tgagcctgtc 2640  
 tttgtgaagc ctcgaggtgt tttctctgat ggcgagtcgg cccttcagtt cggagagctt 2700  
 tccgaagcca gttctgtcgt cgatgaccgg acaaaagaag ctccggtggt tgacgcccc 2760  
 atcgatttga caacttcgaa cgagacgtc tctgggtctg accccttga attcgcaaaa 2820  
 ttcaggcgcc cgggtttctc cgcgcaagct ttaatcgacc gaggtggtcc gcttgccgat 2880  
 gttcatgcaa agataaagag tcgggtatat gaacaatgcc ttcaagcttg tgaacctggt 2940  
 agtcgtgca cccagccac caagaagtgg ctcgacaaaa tgtgggacag ggtggacatg 3000

ES 2 692 809 T3

aaaacttggc gctgcacctc gcagttccaa gctggtcaca ttcttgagtc cctcaaattc 3060  
 ctccctgaca tgattcaaga cacaccgcct cctgttccca ggaagaaccg agctgggtgac 3120  
 agtgccggcc tgaagcaact ggtggcgagc tgggatagga aattgagtgt gacaccccc 3180  
 acaaaaccgg ttggaccggt gcttgaccag accgtccctc tgcctatgga catccagcaa 3240  
 gaagatgcca tctccgctga caagccaccc cattcgcaaa acccttctag tcaagtagat 3300  
 gtgggtggag gttgaaaag ttttatgctc tccggcaccg gtttcgcggg gtccgttagt 3360  
 cagcgcctta cgacatgggt ttttgaggtt ctctccctc tcccagcttt tatgctcaca 3420  
 cttttctcgc cacggggctc tatggctcca ggtgattggc tgtttgcagg tgetgttcta 3480  
 cttgctctcc tgctctgccg ttcttaccca atactcggat gccttccctt attgggtgtc 3540  
 ttttctggtt ctgtcgggtg tgttcgtttg ggtgtttttg gttcttggat ggcttttgct 3600  
 gtatttttat tctcgactcc acccgaccca gtcggttctt cttgtgacca cgattcgcgg 3660  
 gagtgtcatg ctgagctttt ggctcttgag cagcgccaac tttgggaacc tgtgcgcagc 3720  
 cttgtggctg ggccatcggg cctcttatgc gtcattcttg gcaagttact cgggtgggtca 3780  
 cgttgtctct ggtttgttct cctacgtata tgcattctcg cagatttggc aatttctctt 3840  
 atttatgtgg tgtcccaagg gcggtgtcac aagtgttggg gaaagtgtat aaggacggct 3900  
 cctgcagaag tgacccttaa tgtgtttcct ttttcgcggc ccaccgcctc atctcttgtg 3960  
 tccttgtgtg atcggttcca agcgcaaaa ggagttgacc ccgtgcactt ggcgacaggc 4020  
 tggcgcgggt gctggtgtgg tgagagccct attcatcaat cacaccaaaa accgatagct 4080  
 tatgccaact tggatgaaaa gaagatatcc gccagacggg tgattgctgt cccgtatgat 4140  
 cccagtcagg ccattaaatg cctgaaagt tttgcagcag gaggggctat tgtggaccag 4200  
 cctacgcccg aggtatctgt tgtgtctgag attcccttct cggccccatt ttttccgaag 4260  
 gtcccagtca acccagattg cagggttgtg gtagattcgg acaactttgt ggctgcggtc 4320  
 cgctcgggtt attcgacagc acaactggtc cttggtcggg gcaactttgc caagctaaat 4380  
 cagaccccc tcaggaactc tgtccccacc aaaacaactg gtggggcctc atacaccctt 4440  
 gccgtggccc aggtatctgt gtggactcct gttcatttca tcctcggcct ttggttaacg 4500  
 tcacctcaag tgtgtggctg agggacctct gaccctgggt gttcgaacct ttttctgat 4560  
 ctaettatg gccccggagt tgtgtgttcc tctcgactct gcgtgtctgc cgacggagtt 4620  
 accctgccat tgttctcagc cgttgcccat ctttccggtg gagaggtggg gatttttatt 4680  
 ttggtgcttg cctccttggg cgcttttagc caccgcttgg ctcttaaggc agacatgtca 4740  
 atggtctttt tggcgttttg tgcttacgcc tggcccatga gctcctggtt aatttgcttc 4800  
 tttctatgc tcttgaggtg ggtaaccctt cactctctca ctatgctttg ggtgcactca 4860  
 tttttggtgt tttgcctacc agctgcgggc gttctctcgc tgggaataac cgttcttctt 4920

ES 2 692 809 T3

tgggcagttg gccgtttcac ccaggttgcc ggaattatca caccttatga catccaccag	4980
tatacctccg gaccacgtgg tgcagctgct gtagcaacgg ctccagaagg tacttacatg	5040
gcggccgttc ggagagccgc tttgactgga cggactttga tcttcacacc atctgcagtc	5100
ggatcccttc ttgaaggtgc tttcagaact caaaagccct gccttaacac cgtgaatgtc	5160
gtaggctctt cccttggttc tggaggagtt ttcaccattg atggcagaag agtcatcgtc	5220
actgccacc atgtgttgaa tggtaacaca gccagggca ctggtgattc ctacaaccgc	5280
atgcacacgt tcaataactaa tggtgattat gcctggtccc atgctgatga ctggcaaggc	5340
gttgccocta tggttaagat cgctaagggg tatcgcggtc gtgcctactg gcaaacgtca	5400
accggagtcg aacctggcat catgggggaa ggattcgctt tctgtttcac taactgtggc	5460
gactcagggc cacctgtcat ttcagaagct ggtgacctta ttggagtcca taccggttca	5520
aacaaactcg gttctggtct tgtgacaacc cctgaagggg agacctgctc catcaaggaa	5580
actaggctct ctgaccttc tagacatddd gcaggtccaa gcgtccctct tggggacatt	5640
aagttgagcc cagccatcat ccctgatgtg acaactattc cgagtgactt ggcacgctc	5700
cttgcttctg tccccgtgat ggaaggtggc ctctcaactg tccagctddd gtgcgtcttt	5760
ttccttctct ggcgcatgat gggccatgcc tggacaccca ttgttgccgt aggcttcttt	5820
ttgctgaatg aaattctccc agcagtcttg gtccgagctg tgttctcttt tgcactcttt	5880
gtacttgc atggccacccc ctggtcggca caagtgttga tgattagact cctcacggcg	5940
gctctcaacc gcaacaggtt gtccctggcg ttctacgcac tcggaggtgt cgttggcctg	6000
gccacagaaa tcgggacttt tgetggtgga tggcctgaac tgtcccaage cctctcgaca	6060
tactgcttcc tgcccaggtt ccttgctgtg actagttatg tccccacat catcatcggg	6120
gggctccatg ccctcggcgt aatdddgtgg ttattcaaat accgatgcct ccacaacatg	6180
ctggttggtg atgggagttt ctcaagcgtt ttcttctac ggtatdddgc tgagggtaat	6240
cttaggaaag gcgtgtcgca gtccgtggc atgaataacg aatccctgac agctgctttg	6300
gcttgcaagt tgtcgcaagc tgacctgat tdddgtcca gtttaacgaa cttcaagtgc	6360
tttgtgtccg cttcaaacat gaaaaatgca gctggccaat acatcgaggc ggcgtatgct	6420
agagctctgc gtcaggagct ggcctccttg gttcaggtg acaagatgaa aggagtattg	6480
gccaagctcg aggcttctgc tgagacggcc actccgtcac ttgacacagg tgacgtgatt	6540
gttctgcttg ggcaacacccc ccatggatcc atcctcgaca ttaatgtggg ggggtaaagg	6600
aaaactgtgt ctgtgcaaga aacacgatgc ctgggtgggt ccaaattcag tgtctgcact	6660
gtcgtgtcca acacgcccgt ggataccttg accggcatcc cacttcagac gccaacccca	6720
ctdddgaaa atggcccgcg ccatcgcagc gaggacgacg accttaaagt tgagagaatg	6780

ES 2 692 809 T3

aaaaaaact gtgtatccct cggcttccac aaaatcaatg gtaaagttta ctgcaaaatt 6840  
 tgggacaagt ctaacggcga caccttttac acggatgatt cccgatacac tcaagaccat 6900  
 gcttttcagg acaggtcaac cgactataga gacagggatt atgaaggtgt acagaccgcc 6960  
 ccccaacagg gattc gatcc aaagtccgaa gccctgttg gcaactgtgt aatcgggtggc 7020  
 attacgtata acaggcatct ggtcaaagggt aaggaggtcc tagttcccaa acctgacaac 7080  
 tgccttgaag ctgccagact gtcccttgag caagctcttg ctgggatggg ccaaacttgt 7140  
 gaccttacag ctaccgaagt ggagaaacta aagcgcacatca ttagtcaact ccaaggctctg 7200  
 accactgaac aggcctttaa ctgctagccg ccagcggcctt gaccgcctgt ggccgcggcg 7260  
 gcctagtgtt aactgaaacg gcggtaaaaa tcgtaaaata ccacagcaga actttcacct 7320  
 taggctcttt agacctaaaa gtcacctccg aggtggaggt gaagaaatca actgagcagg 7380  
 ggcacgctgt cgtggcgaac ttatgttccg gtgtcgtctt gatgaggcct caccaccgt 7440  
 cccttgttga cgttctctc aaaccggac ttgacacaac acccggcatt caaccagggc 7500  
 atggggccgg gaatatgggc gtgaacgggt ctatgtggga ttttgaaact gcaccacaa 7560  
 aggtagaact agagttgtcc aagcaataa tccaagcatg tgaagtcagg cgcggggacg 7620  
 ccctaacct ccaactcccc tacaagcttt atcctgtcag gggggacccc gagcggcgta 7680  
 aaggtcgcct tgtcaaacact aggtttggag atttacctta caaaactccc caagacacca 7740  
 agtccgcaat tcatcgggct tgttcctgc atcccaatgg ggtcctcgtg tctgatggta 7800  
 aatccacgct gggtagcact cttcaacatg gtttcgagct ttatgtcccc actgtacctt 7860  
 atagtgtcat ggaatacctt gattcacgcc ctgacacccc ttttatgtgt actaaacatg 7920  
 gcacttccaa ggctgctgca gaggacctcc aaaaatatga cctatccact caagggtttg 7980  
 tcttgctcgt ggtcctacgc ctagtgcgca ggttcatctt tagccatgtt ggtaaggcgc 8040  
 caccactgtt ccttccatca acctaccctg ccaagaactc catggcaggg gtcaatggcc 8100  
 agaggttccc aacaaaggat gtccagagca tacctgaaat tgatgaaatg tgcgccctgt 8160  
 ccgtcaagga aaattggcag actgtgacac cttgcaccct caaaaaacag tactgttcca 8220  
 aacctaaaac tagaacctc ctaggtacca acaacttcat agccttggct cacaggctcag 8280  
 cactcagtgg tgtcaccag gcgttcatga agaaggcctg gaagtccca attgccttgg 8340  
 ggaaaaaaca gtttaaggaa ttgcattgca ctgtcgcgg cagatgcctt gaggtgacc 8400  
 tggcttctg cgatcgcagc acccccgcca ttgtgaggtg gtttgttgc aacctcctgt 8460  
 atgaacttgc aggatgtgaa gagtacttgc cttagctacgt gctcaactgt tgccatgacc 8520  
 ttgtggcaac gcagatggc gctttcaca aacgcggtgg cctgtcgtcc ggggaccccg 8580  
 tcaccagtgt gtccaacacc gtctactcac tgataattta cgccagcac atggtgcttt 8640  
 cggccttgaa gatgggtcat gaaattggtc tcaagttcct tgaggaacag ctcaaatttg 8700



ES 2 692 809 T3

aggaccttct tgaatccag cccatgtag tgtattctga tgacctcgtc ttgtatgagg 8760  
aaagaccac ttttcccaac taccattggt gggtcgagca tcttgacctg atgttgggct 8820  
ttaaacgga cccaaagaaa actgtcataa ctgataaacc cagttttctc ggctgcagaa 8880  
ttgaagcagg acggcagtta gtccccaatc gcgacctat tctggctgct cttgcatatc 8940  
atatgaaggc gcagaacgcc tcagagtatt atgctccgc tgcgcaatt ctgatggatt 9000  
cgtgtgcttg cattgacct gaccccgagt ggtatgagga ccttatctgc ggcacgccc 9060  
gggtgtgctc ccaggacggt taccgttttc caggcccggc atttttcatg tccatgtggg 9120  
agaagctgaa aagtcataac gaagggaaga aatgccgtca ctgcggcatc tgcgacgcca 9180  
aagccgacta tgcgtccgcc tgtggacttg atttgtgttt gttccattca cactttcatc 9240  
aacactgccc agtcactctg agctgtggcc accatgccgg ttcaaaggaa tgttcgcagt 9300  
gtcagtcacc tgcggggct ggcaaatccc cccttgacgc tgtgctgaa caaatcccgt 9360  
acaaacctcc tcgtaccatt atcatgaag tggacaacaa aacaacgacc cttgaccggy 9420  
gaagatatca gtcccgtcga ggtctgttg cagtcaaaag aggtattgca ggtaatgagg 9480  
ttgatctttc tgatggagac taccaagtgg tgcctctttt gccgacttgc aaagacataa 9540  
acatggtgaa ggtggcttgc aactactac tcagcaagt tatagtaggg ccgccagggt 9600  
ccgaaaaaac cacctggcta ctgaaccaag tccaggacga tgatgtcatt tacacaccta 9660  
ctcatcagac aatgtttgac atagtcagt ctcttaaagt ttgcaggat tccatcccag 9720  
gagcctcagg actccctttt ccaccacctg ccaggtcgg gccgtgggtt aggctcatcg 9780  
ccagcggaca tgtccctgce cgagtgtcat atctcgatga ggcaggatat tgcaatcatc 9840  
tagacattct aaggctgctt tccaaaacac cccttgtgtg tttgggtgac cttcagcaac 9900  
ttcaccgggt cggctttgat tcctattgtt atgtgttcca tcagatgcct cagaagcagc 9960  
tgaccacat ttatagattt ggcctaaca tctgtgcagc catccagcct tgttacaggg 10020  
agaaacttga atccaaggcc aggaacacca gagtggtttt caccaccgg cctgtggcct 10080  
ttggtcaggt cctgacaccg taccacaaag atcgtaccgg ctctgcaata actatagatt 10140  
catcccaggg ggcgacctc gacattgtga cattgcatct accatcgcca aagtcctaa 10200  
acaaatccc agcacttcta gccatcactc gggcaagaca tgggttgttc atttatgacc 10260  
ctcatgacca actccaggag ttttcaact taacccccga gcgactgat tgtaacctg 10320  
cgttcagccc tgggatgag ctggtgttt tgaatgtgga taatgcggtc acaactgtag 10380  
cgaaggccct agagacaggt tcacccgat ttcgagtatc ggacccgagg tgcaagtctc 10440  
tcttagccgc ttgttcggcc agtctagaag ggagctgat gccactacca caagtagcac 10500  
ataacctggg gttttacttt tccccggaca gccagcttt tgcaccctg ccaaaagagc 10560

ES 2 692 809 T3

tggcgccaca ttggccagtg gtcacccacc agaataatcg agcgtggcct gatcgacttg 10620  
 tcgctagtat gcgccaatt gatgcccgct acagcaagcc aatggtcggt gcagggtatg 10680  
 tggcggggcc atccatTTTT cttggcactc ctgggtgtggg gtcatactat ctcacattat 10740  
 acatcggggg cgagcctcag gccctgccag aaacactcgt ttcaacagga cgtatagcca 10800  
 cagattgtcg ggaatatctc gacgcggctg aggaagaggg agcgagagaa cttccccacg 10860  
 catttattgg cgatgtcaaa ggcactacgg tcgggggggtg tcaccacatt acatcgaat 10920  
 acetacctag gtcctgcct aaagactctg ttgctgtggg tgggggtgagt tcgcccggta 10980  
 gggctgctaa agccgtgtgc actctcaccg atgtgtacct cccggaactc cgaccatatt 11040  
 tgcaaccgga gacggcatca aaatgctgga aacttaaact ggatttcagg gatgttcgac 11100  
 tgatggctctg gaaaggcgcc acagcctatt tccagttgga agggctgaca tggtcagcgc 11160  
 tgcccgatta tgctaggttc attcagctac ccaaggatgc cgttgtgtac atcgatccgt 11220  
 gtatagggcc ggcaacagcc aatcgcaagg ttgtgcgaac cacagactgg cgggccgacc 11280  
 tggcagtgc accgtatgat tacgggtctc aggtcatttt gacaacagcc tggttcgagg 11340  
 accttggggc gcagtggaag attttggggg tgcagccttt cagacgaaca tttggctttg 11400  
 agaaactga agattgggca attctcgac gccgtatgaa tgacggcaaa gattactcg 11460  
 actataattg gcattgtgta cgagaacgcc cacacgcaat ttacgggcgc gcccgtgacc 11520  
 atacgtatca ttttccctt ggcactgaac tgcaagtaga gctgggcaga ccccggtgc 11580  
 ctctgagca agtgccgtga acgcggagtg atgcaatggg ttcactgtgg agtaaatca 11640  
 gtcagttggt cgtggatgcc ttcactgagt tccttgttag tgtggttgac attgtcatct 11700  
 ttctcgccat attgtttggg ttcactgttg caggctgggt attggtcttc cttctcagag 11760  
 tggtttgctc cgcgtttctc cgttcgcgct ctgccattca ctctcccga ctatcgaagg 11820  
 tcctatgagg gcttctacc caactgcaga ccggatgtcc cacaattcgc agttaagcac 11880  
 ccgttgggta tactttggca tatgcgagtc tccaccta taagcgaat ggtctctcgc 11940  
 cgcatttacc ggaccatgga acattcgggt caagcggcct ggaagcagg tgttagtgaa 12000  
 gccactctca caaaactgtc aaggcttgac gtagtcactc atttccaaca cctggccgca 12060  
 gtggaggctg attcttgccg cttccttagc tcacgactcg cgatgctgaa aaaccttgcc 12120  
 gttggcaatg tgagcctgga gtacaacact actttggacc gcgttgagct catctttccc 12180  
 acaccaggta cgagggccaa gttgaccgat tttaggcaat ggcttatcag cgtgcacgct 12240  
 tccatctct cctctgtggc ttcgtctggt accttgttca cagtgtttg gcttcgaatt 12300  
 ccagctctac gctatgtttt tggtttccat tggcccacgg caacacatca ttcgaactaa 12360  
 ctatcaatta cactatatgt aagccatgcc ctaccagtca agctgccaa caaagactcg 12420  
 agcctggccg taacgtgtgg tgcaaaaatag ggcacgacag gtgtgaggaa cgtgaccatg 12480

ES 2 692 809 T3

atgagttgtc aatgtccatt ccgtccgggt acgacaacct caaacttgag ggttattatg 12540  
cttggtggc ttttttgtcc ttttctacg cggcccaatt ccatccggag ctgttcggaa 12600  
taggaaacgt gtcgcgcgtc tttgtggata agcgacacca gttcatttgc gccgagcatg 12660  
atggacaaaa ttcaaccata tctgccagac acaacatctc cgcgtcgtat gcggtgtatt 12720  
accatcatca aatagacggg ggcaattggt ttcatttggga atggctgcga ccattctttt 12780  
cctcctggct ggtgctcaac atctcatggt ttctgaggcg ttcgcctgca agccctgctt 12840  
ctcgacgcat ctatcagata ttaagaccaa cacgaccgag gctgccgggt tcatggtcct 12900  
tcagaacatc aattgtttcc aatctcacag ggcctcaaca gcgcaaggta ccaactccct 12960  
caggaggtcg tcccaatgtc gtgaagccgt cggcattccc cagtacatca cgataacggc 13020  
taatgtgacc gatgaatcgt atttgtacaa cgcggacttg ctgatgcttt ccgctgcct 13080  
tttctacgcc tcggaaatga gcgagaaagg cttaaagtc atctttggga atatttctgg 13140  
cgttgtttcc gcttgtgtta atttcacaga ttatgtggcc catgtgacct aacacactca 13200  
gcagcaccat ttggtaattg atcacattcg gttactacac ttcttgacac cgtctacgat 13260  
gaggtgggct acaaccattg cttgtttggt tgccattctt ttggcgggat gaaatgttct 13320  
tgcaagttgg ggcatttctt gactcctcac tcttgcttct ggtggctttt ttgctgtgt 13380  
accggttgt cttggtcctt tgcgatggc aacgacaaca gctcgacatc ccaatacata 13440  
tataatttga cgatatgcga gctgaatggg accgaatggt tgtccggca ttttgattgg 13500  
gcagtcgaaa ctttgtgct ttaccagtt gccactcata tcatttact gggttttctc 13560  
acaacaagcc atttcttga tgcgctcggg ctgcggcgtg tgtccgccac aggattcatt 13620  
ggcgagcggg atgtacttag cagcatgtac ggcgtttgag ccttcggcgc gctcgtatgt 13680  
tttgtcatcc gtgctgctaa aaattgcatg gcttgccgct atgcccgac ccggtttacc 13740  
aacttcatcg tggacgaccg ggaagaatc catcgaatga agtcttcaat agtgggtggag 13800  
aaattgggca aagctgaagt cgggtgtgac cttgtcaaca ttaagcatgt tgcctcga 13860  
ggggttaaag ctcaaccctt gacgaggact tcggctgagc aatgggaagc ctagacgact 13920  
tttgcaacga tcccaccgcc gcacaaaaac tcgtgctggc ctttagcatc acatatacac 13980  
ccataatgat atacgccctt aaggtgtcac gcggccgact cctggggctg ttgcacatct 14040  
tgatatttct gaattgttcc tttacttttg ggtacatgac atatgtgcat tttcaatcca 14100  
ccaaccgtgt cgcactcact ctgggggctg tagtcgccct tttgtggggt gtttacagcc 14160  
tcacagagtc atggaagtcc atcaattcca gatgcagatt gtgttcctta ggccggcgat 14220  
acattctggc ccctgcccat cacgtagaaa gtgctgcagg cctccattca atcccagcgt 14280  
ctggtaaccc agcatacgct gtgagaaagc ccggactaac atcagtgaac ggcactctag 14340

ES 2 692 809 T3

tacctgggct tgggagcctc gtgctgggcg gcaaacgagc tgtaaacga ggagtggta 14400  
 acctcgtcaa gtatggccgg taagaaccag agccagaaga aaagaagaaa tgcagctccg 14460  
 atggggaaag gccagccagt caatcaactg tgccagttgc tgggtacaat gataaagtcc 14520  
 cagcgccagc aatctagggg aggacaggcc aaaaagaaga agcctgagaa gccacatttt 14580  
 cccctagctg ctgaagatga cattcggcac catctcacc aggccgaacg ttcctctgc 14640  
 ttgcaatcga tccagacggc tttcaatcaa ggcgcaggaa ctgcgtcgct ttcattccagc 14700  
 gggaaggtca gtttccaggt tgagttcatg ctgccggttg ctcatcagc ggcctgatt 14760  
 cgcgtgactt ctacatccgc cagtcagggt gcaaattaat ttgacagtca ggtgaatggc 14820  
 cgcgattgac gtgtggcctc taa 14843

<210> 11  
 <211> 2349  
 <212> PRT  
 <213> Virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino

5

<400> 11

Met Ser Gly Met Phe Ser Arg Cys Met Cys Thr Pro Ala Ala Arg Val 1  
 5 10 15

Phe Trp Asn Ala Gly Gln Val Tyr Cys Thr Arg Cys Leu Ser Ala Arg  
 20 25 30

Ser Leu Leu Ser Pro Glu Leu Gln Asp Thr Asp Leu Gly Ala Val Gly 35  
 40 45

Leu Phe His Lys Pro Lys Asp Lys Leu His Trp Lys Val Pro Ile Gly 50  
 55 60

Ile Pro Gln Val Glu Cys Ser Pro Ser Gly Cys Cys Trp Leu Ser Thr 65  
 70 75 80

Ile Phe Pro Leu Ala Arg Met Thr Ser Gly Asn His Asn Phe Leu Gln  
 85 90 95

Arg Leu Val Lys Val Ala Asp Val Leu Tyr Arg Asp Gly Cys Leu Thr  
 100 105 110

Pro Arg His Leu Arg Glu Leu Gln Val Tyr Glu Arg Gly Cys Asn Trp 115  
 120 125

10

ES 2 692 809 T3

Tyr Pro Ile Thr Gly Pro Val Pro Gly Met Ala Val Tyr Ala Asn Ser 130  
 135 140

Met His Val Ser Asp Gln Pro Phe Pro Gly Ala Thr His Val Leu Thr 145  
 150 155 160

Asn Ser Pro Leu Pro Gln Arg Ala Cys Arg Gln Pro Phe Cys Pro Phe  
 165 170 175

Glu Glu Ala His Ser Ser Ile Tyr Arg Trp Glu Lys Phe Val Ile Phe  
 180 185 190

Met Asp Ser Ser Ser Asp Gly Arg Ser Arg Met Met Trp Thr Pro Glu 195  
 200 205

Ser Asp Asp Ser Thr Ala Leu Glu Val Leu Pro Pro Glu Leu Glu His 210  
 215 220

Gln Val Lys Val Leu Val Arg Ser Phe Pro Ala His His Leu Val Asp 225  
 230 235 240

Leu Ala Asp Trp Glu Leu Thr Glu Ser Pro Glu Asn Gly Phe Ser Phe  
 245 250 255

Ser Thr Ser His Pro Cys Gly Tyr Leu Val Arg Asp Pro Ala Val Ser  
 260 265 270

Glu Gly Lys Cys Trp Leu Ser Cys Phe Leu Ser Gln Ser Ala Glu Val 275  
 280 285

Leu Ser Arg Glu Ala His Leu Ala Thr Ala Tyr Gly Tyr Gln Thr Lys 290  
 295 300

Trp Gly Val Pro Gly Lys Tyr Ile Gln Arg Arg Leu Gln Val His Gly 305  
 310 315 320

ES 2 692 809 T3

Leu Arg Ala Val Val Asp Pro Asp Gly Pro Ile His Val Glu Ala Leu  
 325 330 335

Ser Cys Pro Gln Ser Trp Ile Arg His Leu Thr Leu Asn Asp Asp Val  
 340 345 350

Thr Pro Gly Phe Val Arg Leu Met Ser Leu Arg Ile Val Pro Asn Thr 355  
 360 365

Glu Pro Thr Thr His Arg Ile Phe Arg Phe Gly Val His Lys Trp Tyr 370  
 375 380

Gly Ala Ala Gly Lys Arg Ala Arg Gly Lys Arg Ala Ala Lys Ser Glu 385  
 390 395 400

Lys Asp Ser Ala Ser Thr Leu Lys Val Ala Arg Pro Thr Ser Thr Ser  
 405 410 415

Gly Ile Val Thr Tyr Ser Pro Pro Ala Asp Gly Ser Cys Gly Trp His  
 420 425 430

Ala Leu Ala Ala Ile Leu Asn Arg Met Ile Asn Asn Asp Phe Thr Ser 435  
 440 445

Pro Leu Pro Arg Tyr Asn Arg Pro Glu Asp Asp Trp Ala Ser Asp Gly 450  
 455 460

Asp Leu Ala Gln Ala Ile Gln Cys Leu Gln Leu Pro Ala Ala Ile Ala 465  
 470 475 480

Arg Asn Arg Ala Cys Pro Asn Ala Lys Tyr Leu Val Lys Leu Asn Gly  
 485 490 495

Val His Trp Glu Val Glu Val Arg Pro Gly Met Ala Pro Arg Ser Leu  
 500 505 510

Ser Arg Glu Cys Val Val Gly Val Cys Ser Glu Gly Cys Val Ala Ser 515  
 520 525

ES 2 692 809 T3

Pro Tyr Pro Glu Asp Gly Leu Pro Lys Arg Ala Leu Glu Ala Leu Ala 530  
535 540

Ser Ala Tyr Arg Leu Pro Ser Asp Cys Val Cys Asp Gly Ile Ile Asp 545  
550 555 560

Phe Leu Ala Asn Pro Pro Pro Gln Glu Phe Trp Thr Leu Asp Lys Met  
565 570 575

Leu Thr Ser Pro Ser Pro Glu Gln Ser Gly Phe Ser Ser Leu Tyr Lys  
580 585 590

Leu Leu Leu Glu Val Leu Pro Gln Lys Cys Gly Ser Thr Glu Gly Glu 595  
600 605

Phe Ile Tyr Thr Val Glu Arg Met Leu Lys Asp Cys Pro Ser Ser Lys 610  
615 620

Gln Ala Met Ala Leu Leu Ala Lys Ile Lys Val Pro Ser Ser Lys Ala 625  
630 635 640

Pro Ser Val Thr Leu Asn Glu Cys Phe Pro Thr Asp Val Pro Val Asn  
645 650 655

Ser Glu Leu Ile Ser Trp Glu Glu Pro Lys Asp Pro Gly Ala Ala Val  
660 665 670

Val Leu Cys Pro Ser Asp Ala Lys Glu Ser Lys Glu Thr Ala Pro Glu 675  
680 685

Glu Ala Gln Ala Arg Asn Arg Lys Val Leu His Pro Val Val Leu Thr 690  
695 700

Glu Glu Leu Ser Glu Gln Gln Val Gln Val Val Glu Gly Asp Gln Asp 705  
710 715 720

Met Pro Leu Asp Leu Thr Trp Pro Thr Leu Thr Ala Thr Ala Thr Pro

## ES 2 692 809 T3

```

725                730                735

Val Arg Gly Pro Val Pro Asp Asn Leu Ser Ser Gly Ile Gly Ala Gln
740                745                750

Pro Ala Thr Val Gln Glu Leu Ile Leu Ala Arg Pro Ala Pro Arg Leu    755
760                765

Val Glu Arg Cys Gly Thr Glu Ser Asn Gly Ser Ser Ser Phe Leu Asp    770
775                780

Leu Pro Asp Val Gln Thr Ser Asp Gln Pro Leu Asp Leu Ser Leu Ala 785
790                795                800

Ala Trp Pro Val Arg Ala Thr Ala Ser Asp Pro Gly Trp Ile His Gly
805                810                815

Arg Arg Glu Pro Val Phe Val Lys Pro Arg Gly Val Phe Ser Asp Gly
820                825                830

Glu Ser Ala Leu Gln Phe Gly Glu Leu Ser Glu Ala Ser Ser Val Val    835
840                845

Asp Asp Arg Thr Lys Glu Ala Pro Val Val Asp Ala Pro Ile Asp Leu    850
855                860

Thr Thr Ser Asn Glu Thr Leu Ser Gly Ser Asp Pro Phe Glu Phe Ala 865
870                875                880

Lys Phe Arg Arg Pro Arg Phe Ser Ala Gln Ala Leu Ile Asp Arg Gly
885                890                895

Gly Pro Leu Ala Asp Val His Ala Lys Ile Lys Ser Arg Val Tyr Glu
900                905                910

Gln Cys Leu Gln Ala Cys Glu Pro Gly Ser Arg Ala Thr Pro Ala Thr    915
920                925

```



ES 2 692 809 T3

Lys Lys Trp Leu Asp Lys Met Trp Asp Arg Val Asp Met Lys Thr Trp 930  
935 940

Arg Cys Thr Ser Gln Phe Gln Ala Gly His Ile Leu Glu Ser Leu Lys 945  
950 955 960

Phe Leu Pro Asp Met Ile Gln Asp Thr Pro Pro Pro Val Pro Arg Lys  
965 970 975

Asn Arg Ala Gly Asp Ser Ala Gly Leu Lys Gln Leu Val Ala Gln Trp  
980 985 990

Asp Arg Lys Leu Ser Val Thr Pro Pro Thr Lys Pro Val Gly Pro Val  
995 1000 1005

Leu Asp Gln Thr Val Pro Leu Pro Met Asp Ile Gln Gln Glu Asp 1010  
1015 1020

Ala Ile Ser Ala Asp Lys Pro Pro His Ser Gln Asn Pro Ser Ser 1025  
1030 1035

Gln Val Asp Val Gly Gly Gly Trp Lys Ser Phe Met Leu Ser Gly 1040  
1045 1050

Thr Arg Phe Ala Gly Ser Val Ser Gln Arg Leu Thr Thr Trp Val 1055  
1060 1065

Phe Glu Val Leu Ser His Leu Pro Ala Phe Met Leu Thr Leu Phe 1070  
1075 1080

Ser Pro Arg Gly Ser Met Ala Pro Gly Asp Trp Leu Phe Ala Gly 1085  
1090 1095

Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Leu Cys Arg Ser Tyr Pro Ile Leu 1100  
1105 1110

Gly Cys Leu Pro Leu Leu Gly Val Phe Ser Gly Ser Val Arg Cys 1115  
1120 1125

ES 2 692 809 T3

Val Arg 1135	Leu Gly Val	Phe Gly 1140	Ser Trp Met Ala Phe	Ala Val Phe	1130
Leu Phe 1150	Ser Thr Pro	Pro Asp 1155	Pro Val Gly Ser Ser	Cys Asp His	1145
Asp Ser 1165	Pro Glu Cys	His Ala 1170	Glu Leu Leu Ala Leu	Glu Gln Arg	1160
Gln Leu 1180	Trp Glu Pro	Val Arg 1185	Ser Leu Val Val Gly	Pro Ser Gly	1175
Leu Leu 1195	Cys Val Ile	Leu Gly 1200	Lys Leu Leu Gly Gly	Ser Arg Cys	1190
Leu Trp 1210	Phe Val Leu	Leu Arg 1215	Ile Cys Met Leu Ala	Asp Leu Ala	1205
Ile Ser 1225	Leu Ile Tyr	Val Val 1230	Ser Gln Gly Arg Cys	His Lys Cys	1220
Trp Gly 1240	Lys Cys Ile	Arg Thr 1245	Ala Pro Ala Glu Val	Thr Leu Asn	1235
Val Phe 1255	Pro Phe Ser	Arg Ala 1260	Thr Arg Ser Ser Leu	Val Ser Leu	1250
Cys Asp 1270	Arg Phe Gln	Ala Pro 1275	Lys Gly Val Asp Pro	Val His Leu	1265
Ala Thr 1285	Gly Trp Arg	Gly Cys 1290	Trp Cys Gly Glu Ser	Pro Ile His	1280
Gln Ser 1300	His Gln Lys	Pro Ile 1305	Ala Tyr Ala Asn Leu	Asp Glu Lys	1295

ES 2 692 809 T3

Lys Ile 1315	Ser Ala Gln Thr Val 1320	Ile Ala Val Pro Tyr 1310	Asp Pro Ser 1310
Gln Ala 1330	Ile Lys Cys Leu Lys 1335	Val Leu Gln Ala Gly 1325	Gly Ala Ile 1325
Val Asp 1345	Gln Pro Thr Pro Glu 1350	Val Val Arg Val Ser 1340	Glu Ile Pro 1340
Phe Ser 1360	Ala Pro Phe Phe Pro 1365	Lys Val Pro Val Asn 1355	Pro Asp Cys 1355
Arg Val 1375	Val Val Asp Ser Asp 1380	Thr Phe Val Ala Ala 1370	Val Arg Cys 1370
Gly Tyr 1390	Ser Thr Ala Gln Leu 1395	Val Leu Gly Arg Gly 1385	Asn Phe Ala 1385
Lys Leu 1405	Asn Gln Thr Pro Leu 1410	Arg Asn Ser Val Pro 1400	Thr Lys Thr 1400
Thr Gly 1420	Gly Ala Ser Tyr Thr 1425	Leu Ala Val Ala Gln 1415	Val Ser Val 1415
Trp Thr 1435	Leu Val His Phe Ile 1440	Leu Gly Leu Trp Leu 1430	Thr Ser Pro 1430
Gln Val 1450	Cys Gly Arg Gly Thr 1455	Ser Asp Pro Trp Cys 1445	Ser Asn Pro 1445
Phe Ser 1465	Tyr Pro Thr Tyr Gly 1470	Pro Gly Val Val Cys 1460	Ser Ser Arg 1460
Leu Cys 1480	Val Ser Ala Asp Gly 1485	Val Thr Leu Pro Leu 1475	Phe Ser Ala 1475
Val Ala 1495	His Leu Ser Gly Arg 1500	Glu Val Gly Ile Phe 1490	Ile Leu Val 1490

ES 2 692 809 T3

Leu Ala 1510	Ser Leu Gly 1515	Ala Leu 1515	Ala His Arg 1515	Leu Ala 1515	Leu Lys Ala 1515	1505
Asp Met 1525	Ser Met Val 1530	Phe Leu 1530	Ala Phe Cys 1530	Ala Tyr 1530	Ala Trp Pro 1530	1520
Met Ser 1540	Ser Trp Leu 1545	Ile Cys 1545	Phe Phe Pro 1545	Met Leu 1545	Leu Arg Trp 1545	1535
Val Thr 1555	Leu His Pro 1560	Leu Thr 1560	Met Leu Trp 1560	Val His 1560	Ser Phe Leu 1560	1550
Val Phe 1570	Cys Leu Pro 1575	Ala Ala 1575	Gly Val Leu 1575	Ser Leu 1575	Gly Ile Thr 1575	1565
Gly Leu 1585	Leu Trp Ala 1590	Val Gly 1590	Arg Phe Thr 1590	Gln Val 1590	Ala Gly Ile 1590	1580
Ile Thr 1600	Pro Tyr Asp 1605	Ile His 1605	Gln Tyr Thr 1605	Ser Gly 1605	Pro Arg Gly 1605	1595
Ala Ala 1615	Ala Val Ala 1620	Thr Ala 1620	Pro Glu Gly 1620	Thr Tyr 1620	Met Ala Ala 1620	1610
Val Arg 1630	Arg Ala Ala 1635	Leu Thr 1635	Gly Arg Thr 1635	Leu Ile 1635	Phe Thr Pro 1635	1625
Ser Ala 1645	Val Gly Ser 1650	Leu Leu 1650	Glu Gly Ala 1650	Phe Arg 1650	Thr Gln Lys 1650	1640
Pro Cys 1660	Leu Asn Thr 1665	Val Asn 1665	Val Val Gly 1665	Ser Ser 1665	Leu Gly Ser 1665	1655
Gly Gly 1675	Val Phe Thr 1680	Ile Asp 1680	Gly Arg Arg 1680	Val Ile 1680	Val Thr Ala 1680	1670
Thr His 1685	Val Leu Asn 1685	Gly Asn 1685	Thr Ala Arg 1685	Val Thr 1685	Gly Asp Ser 1685	1685

ES 2 692 809 T3

1690		1695	
Tyr Asn 1705	Arg Met His	Thr Phe 1710	Asn Thr Asn Gly Asp Tyr Ala Trp 1700
Ser His 1720	Ala Asp Asp	Trp Gln 1725	Gly Val Ala Pro Met Val Lys Ile 1715
Ala Lys 1735	Gly Tyr Arg	Gly Arg 1740	Ala Tyr Trp Gln Thr Ser Thr Gly 1730
Val Glu 1750	Pro Gly Ile	Met Gly 1755	Glu Gly Phe Ala Phe Cys Phe Thr 1745
Asn Cys 1765	Gly Asp Ser	Gly Ser 1770	Pro Val Ile Ser Glu Ala Gly Asp 1760
Leu Ile 1780	Gly Val His	Thr Gly 1785	Ser Asn Lys Leu Gly Ser Gly Leu 1775
Val Thr 1795	Thr Pro Glu	Gly Glu 1800	Thr Cys Ser Ile Lys Glu Thr Arg 1790
Leu Ser 1810	Asp Leu Ser	Arg His 1815	Phe Ala Gly Pro Ser Val Pro Leu 1805
Gly Asp 1825	Ile Lys Leu	Ser Pro 1830	Ala Ile Ile Pro Asp Val Thr Thr 1820
Ile Pro 1840	Ser Asp Leu	Ala Ser 1845	Leu Leu Ala Ser Val Pro Val Met 1835
Glu Gly 1855	Gly Leu Ser	Thr Val 1860	Gln Leu Leu Cys Val Phe Phe Leu 1850
Leu Trp 1870	Arg Met Met	Gly His 1875	Ala Trp Thr Pro Ile Val Ala Val 1865

ES 2 692 809 T3

Gly Phe 1885	Phe Leu Leu 1890	Asn Glu 1890	Ile Leu Pro Ala Val 1890	Leu Val Arg 1890	1880
Ala Val 1900	Phe Ser Phe 1905	Ala Leu 1905	Phe Val Leu Ala Trp 1905	Ala Thr Pro 1905	1895
Trp Ser 1915	Ala Gln Val 1920	Leu Met 1920	Ile Arg Leu Leu Thr 1920	Ala Ala Leu 1920	1910
Asn Arg 1930	Asn Arg Leu 1935	Ser Leu 1935	Ala Phe Tyr Ala Leu 1935	Gly Gly Val 1935	1925
Val Gly 1945	Leu Ala Thr 1950	Glu Ile 1950	Gly Thr Phe Ala Gly 1950	Gly Trp Pro 1950	1940
Glu Leu 1960	Ser Gln Ala 1965	Leu Ser 1965	Thr Tyr Cys Phe Leu 1965	Pro Arg Phe 1965	1955
Leu Ala 1975	Val Thr Ser 1980	Tyr Val 1980	Pro Thr Ile Ile Ile 1980	Gly Gly Leu 1980	1970
His Ala 1990	Leu Gly Val 1995	Ile Leu 1995	Trp Leu Phe Lys Tyr 1995	Arg Cys Leu 1995	1985
His Asn 2005	Met Leu Val 2010	Gly Asp 2010	Gly Ser Phe Ser Ser 2010	Ala Phe Phe 2010	2000
Leu Arg 2020	Tyr Phe Ala 2025	Glu Gly 2025	Asn Leu Arg Lys Gly 2025	Val Ser Gln 2025	2015
Ser Cys 2035	Gly Met Asn 2040	Asn Glu 2040	Ser Leu Thr Ala Ala 2040	Leu Ala Cys 2040	2030
Lys Leu 2050	Ser Gln Ala 2055	Asp Leu 2055	Asp Phe Leu Ser Ser 2055	Leu Thr Asn 2055	2045
Phe Lys 2065	Cys Phe Val 2070	Ser Ala 2070	Ser Asn Met Lys Asn 2070	Ala Ala Gly 2070	2060

ES 2 692 809 T3

Gln Tyr 2080	Ile Glu Ala 2085	Ala Tyr 2085	Ala Arg Ala Leu Arg 2085	Gln Glu Leu 2085	2075
Ala Ser 2095	Leu Val Gln 2100	Val Asp 2100	Lys Met Lys Gly Val 2100	Leu Ala Lys 2100	2090
Leu Glu 2110	Ala Phe Ala 2115	Glu Thr 2115	Ala Thr Pro Ser Leu 2115	Asp Thr Gly 2115	2105
Asp Val 2125	Ile Val Leu 2130	Leu Gly 2130	Gln His Pro His Gly 2130	Ser Ile Leu 2130	2120
Asp Ile 2140	Asn Val Gly 2145	Gly Glu 2145	Arg Lys Thr Val Ser 2145	Val Gln Glu 2145	2135
Thr Arg 2155	Cys Leu Gly 2160	Gly Ser 2160	Lys Phe Ser Val Cys 2160	Thr Val Val 2160	2150
Ser Asn 2170	Thr Pro Val 2175	Asp Thr 2175	Leu Thr Gly Ile Pro 2175	Leu Gln Thr 2175	2165
Pro Thr 2185	Pro Leu Phe 2190	Glu Asn 2190	Gly Pro Arg His Arg 2190	Ser Glu Asp 2190	2180
Asp Asp 2200	Leu Lys Val 2205	Glu Arg 2205	Met Lys Lys His Cys 2205	Val Ser Leu 2205	2195
Gly Phe 2215	His Lys Ile 2220	Asn Gly 2220	Lys Val Tyr Cys Lys 2220	Ile Trp Asp 2220	2210
Lys Ser 2230	Asn Gly Asp 2235	Thr Phe 2235	Tyr Thr Asp Asp Ser 2235	Arg Tyr Thr 2235	2225
Gln Asp 2245	His Ala Phe 2250	Gln Asp 2250	Arg Ser Thr Asp Tyr 2250	Arg Asp Arg 2250	2240

ES 2 692 809 T3

Asp Tyr Glu Gly Val Gln Thr Ala Pro Gln Gln Gly Phe Asp Pro 2255  
2260 2265

Lys Ser Glu Ala Pro Val Gly Thr Val Val Ile Gly Gly Ile Thr 2270  
2275 2280

Tyr Asn Arg His Leu Val Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Pro Lys 2285  
2290 2295

Pro Asp Asn Cys Leu Glu Ala Ala Arg Leu Ser Leu Glu Gln Ala 2300  
2305 2310

Leu Ala Gly Met Gly Gln Thr Cys Asp Leu Thr Ala Thr Glu Val 2315  
2320 2325

Glu Lys Leu Lys Arg Ile Ile Ser Gln Leu Gln Gly Leu Thr Thr 2330  
2335 2340

Glu Gln Ala Leu Asn Cys 2345

<210> 12

<211> 1463

5 <212> PRT

<213> Virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino

<400> 12

Thr Gly Phe Lys Leu Leu Ala Ala Ser Gly Leu Thr Arg Cys Gly Arg 1  
5 10 15

Gly Gly Leu Val Val Thr Glu Thr Ala Val Lys Ile Val Lys Tyr His  
20 25 30

Ser Arg Thr Phe Thr Leu Gly Ser Leu Asp Leu Lys Val Thr Ser Glu 35  
40 45

Val Glu Val Lys Lys Ser Thr Glu Gln Gly His Ala Val Val Ala Asn 50  
55 60

10 Leu Cys Ser Gly Val Val Leu Met Arg Pro His Pro Pro Ser Leu Val 65  
70 75 80



ES 2 692 809 T3

Asp Val Leu Leu Lys Pro Gly Leu Asp Thr Thr Pro Gly Ile Gln Pro  
 85 90 95

Gly His Gly Ala Gly Asn Met Gly Val Asn Gly Ser Ile Trp Asp Phe  
 100 105 110

Glu Thr Ala Pro Thr Lys Val Glu Leu Glu Leu Ser Lys Gln Ile Ile 115  
 120 125

Gln Ala Cys Glu Val Arg Arg Gly Asp Ala Pro Asn Leu Gln Leu Pro 130  
 135 140

Tyr Lys Leu Tyr Pro Val Arg Gly Asp Pro Glu Arg Arg Lys Gly Arg 145  
 150 155 160

Leu Val Asn Thr Arg Phe Gly Asp Leu Pro Tyr Lys Thr Pro Gln Asp  
 165 170 175

Thr Lys Ser Ala Ile His Ala Ala Cys Cys Leu His Pro Asn Gly Val  
 180 185 190

Leu Val Ser Asp Gly Lys Ser Thr Leu Gly Thr Thr Leu Gln His Gly 195  
 200 205

Phe Glu Leu Tyr Val Pro Thr Val Pro Tyr Ser Val Met Glu Tyr Leu 210  
 215 220

Asp Ser Arg Pro Asp Thr Pro Phe Met Cys Thr Lys His Gly Thr Ser 225  
 230 235 240

Lys Ala Ala Ala Glu Asp Leu Gln Lys Tyr Asp Leu Ser Thr Gln Gly  
 245 250 255

Phe Val Leu Pro Gly Val Leu Arg Leu Val Arg Arg Phe Ile Phe Ser  
 260 265 270

ES 2 692 809 T3

His Val Gly Lys Ala Pro Pro Leu Phe Leu Pro Ser Thr Tyr Pro Ala 275  
 280 285

Lys Asn Ser Met Ala Gly Val Asn Gly Gln Arg Phe Pro Thr Lys Asp 290  
 295 300

Val Gln Ser Ile Pro Glu Ile Asp Glu Met Cys Ala Arg Ala Val Lys 305  
 310 315 320

Glu Asn Trp Gln Thr Val Thr Pro Cys Thr Leu Lys Lys Gln Tyr Cys  
 325 330 335

Ser Lys Pro Lys Thr Arg Thr Ile Leu Gly Thr Asn Asn Phe Ile Ala  
 340 345 350

Leu Ala His Arg Ser Ala Leu Ser Gly Val Thr Gln Ala Phe Met Lys 355  
 360 365

Lys Ala Trp Lys Ser Pro Ile Ala Leu Gly Lys Asn Lys Phe Lys Glu 370  
 375 380

Leu His Cys Thr Val Ala Gly Arg Cys Leu Glu Ala Asp Leu Ala Ser 385  
 390 395 400

Cys Asp Arg Ser Thr Pro Ala Ile Val Arg Trp Phe Val Ala Asn Leu  
 405 410 415

Leu Tyr Glu Leu Ala Gly Cys Glu Glu Tyr Leu Pro Ser Tyr Val Leu  
 420 425 430

Asn Cys Cys His Asp Leu Val Ala Thr Gln Asp Gly Ala Phe Thr Lys 435  
 440 445

Arg Gly Gly Leu Ser Ser Gly Asp Pro Val Thr Ser Val Ser Asn Thr 450  
 455 460

Val Tyr Ser Leu Ile Ile Tyr Ala Gln His Met Val Leu Ser Ala Leu 465  
 470 475 480

ES 2 692 809 T3

Lys Met Gly His Glu Ile Gly Leu Lys Phe Leu Glu Glu Gln Leu Lys  
485 490 495

Phe Glu Asp Leu Leu Glu Ile Gln Pro Met Leu Val Tyr Ser Asp Asp  
500 505 510

Leu Val Leu Tyr Ala Glu Arg Pro Thr Phe Pro Asn Tyr His Trp Trp 515  
520 525

Val Glu His Leu Asp Leu Met Leu Gly Phe Lys Thr Asp Pro Lys Lys 530  
535 540

Thr Val Ile Thr Asp Lys Pro Ser Phe Leu Gly Cys Arg Ile Glu Ala 545  
550 555 560

Gly Arg Gln Leu Val Pro Asn Arg Asp Arg Ile Leu Ala Ala Leu Ala  
565 570 575

Tyr His Met Lys Ala Glu Asn Ala Ser Glu Tyr Tyr Ala Ser Ala Ala  
580 585 590

Ala Ile Leu Met Asp Ser Cys Ala Cys Ile Asp His Asp Pro Glu Trp 595  
600 605

Tyr Glu Asp Leu Ile Cys Gly Ile Ala Arg Cys Ala Arg Gln Asp Gly 610  
615 620

Tyr Arg Phe Pro Gly Pro Ala Phe Phe Met Ser Met Trp Glu Lys Leu 625  
630 635 640

Lys Ser His Asn Glu Gly Lys Lys Cys Arg His Cys Gly Ile Cys Asp  
645 650 655

Ala Lys Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Cys Gly Leu Asp Leu Cys Leu Phe  
660 665 670

His Ser His Phe His Gln His Cys Pro Val Thr Leu Ser Cys Gly His 675

ES 2 692 809 T3

680

685

His Ala Gly Ser Lys Glu Cys Ser Gln Cys Gln Ser Pro Val Gly Ala 690  
695 700

Gly Lys Ser Pro Leu Asp Ala Val Leu Lys Gln Ile Pro Tyr Lys Pro 705  
710 715 720

Pro Arg Thr Ile Ile Met Lys Val Asp Asn Lys Thr Thr Thr Leu Asp  
725 730 735

Pro Gly Arg Tyr Gln Ser Arg Arg Gly Leu Val Ala Val Lys Arg Gly  
740 745 750

Ile Ala Gly Asn Glu Val Asp Leu Ser Asp Gly Asp Tyr Gln Val Val 755  
760 765

Pro Leu Leu Pro Thr Cys Lys Asp Ile Asn Met Val Lys Val Ala Cys 770  
775 780

Asn Val Leu Leu Ser Lys Phe Ile Val Gly Pro Pro Gly Ser Gly Lys 785  
790 795 800

Thr Thr Trp Leu Leu Asn Gln Val Gln Asp Asp Asp Val Ile Tyr Thr  
805 810 815

Pro Thr His Gln Thr Met Phe Asp Ile Val Ser Ala Leu Lys Val Cys  
820 825 830

Arg Tyr Ser Ile Pro Gly Ala Ser Gly Leu Pro Phe Pro Pro Pro Ala 835  
840 845

Arg Ser Gly Pro Trp Val Arg Leu Ile Ala Ser Gly His Val Pro Gly 850  
855 860

Arg Val Ser Tyr Leu Asp Glu Ala Gly Tyr Cys Asn His Leu Asp Ile 865  
870 875 880

ES 2 692 809 T3

Leu Arg Leu Leu Ser Lys Thr Pro Leu Val Cys Leu Gly Asp Leu Gln  
 885 890 895

Gln Leu His Pro Val Gly Phe Asp Ser Tyr Cys Tyr Val Phe Asp Gln  
 900 905 910

Met Pro Gln Lys Gln Leu Thr Thr Ile Tyr Arg Phe Gly Pro Asn Ile 915  
 920 925

Cys Ala Ala Ile Gln Pro Cys Tyr Arg Glu Lys Leu Glu Ser Lys Ala 930  
 935 940

Arg Asn Thr Arg Val Val Phe Thr Thr Arg Pro Val Ala Phe Gly Gln 945  
 950 955 960

Val Leu Thr Pro Tyr His Lys Asp Arg Thr Gly Ser Ala Ile Thr Ile  
 965 970 975

Asp Ser Ser Gln Gly Ala Thr Phe Asp Ile Val Thr Leu His Leu Pro  
 980 985 990

Ser Pro Lys Ser Leu Asn Lys Ser Arg Ala Leu Val Ala Ile Thr Arg  
 995 1000 1005

Ala Arg His Gly Leu Phe Ile Tyr Asp Pro His Asp Gln Leu Gln 1010  
 1015 1020

Glu Phe Phe Asn Leu Thr Pro Glu Arg Thr Asp Cys Asn Leu Ala 1025  
 1030 1035

Phe Ser Arg Gly Asp Glu Leu Val Val Leu Asn Val Asp Asn Ala 1040  
 1045 1050

Val Thr Thr Val Ala Lys Ala Leu Glu Thr Gly Ser Pro Arg Phe 1055  
 1060 1065

Arg Val Ser Asp Pro Arg Cys Lys Ser Leu Leu Ala Ala Cys Ser 1070  
 1075 1080

ES 2 692 809 T3

Ala Ser 1090	Leu Glu Gly	Ser Cys 1095	Met Pro Leu Pro Gln	Val Ala His	1085
Asn Leu 1105	Gly Phe Tyr	Phe Ser 1110	Pro Asp Ser Pro Ala	Phe Ala Pro	1100
Leu Pro 1120	Lys Glu Leu	Ala Pro 1125	His Trp Pro Val Val	Thr His Gln	1115
Asn Asn 1135	Arg Ala Trp	Pro Asp 1140	Arg Leu Val Ala Ser	Met Arg Pro	1130
Ile Asp 1150	Ala Arg Tyr	Ser Lys 1155	Pro Met Val Gly Ala	Gly Tyr Val	1145
Val Gly 1165	Pro Ser Ile	Phe Leu 1170	Gly Thr Pro Gly Val	Val Ser Tyr	1160
Tyr Leu 1180	Thr Leu Tyr	Ile Gly 1185	Gly Glu Pro Gln Ala	Leu Pro Glu	1175
Thr Leu 1195	Val Ser Thr	Gly Arg 1200	Ile Ala Thr Asp Cys	Arg Glu Tyr	1190
Leu Asp 1210	Ala Ala Glu	Glu Glu 1215	Ala Ala Arg Glu Leu	Pro His Ala	1205
Phe Ile 1225	Gly Asp Val	Lys Gly 1230	Thr Thr Val Gly Gly	Cys His His	1220
Ile Thr 1240	Ser Lys Tyr	Leu Pro 1245	Arg Ser Leu Pro Lys	Asp Ser Val	1235
Ala Val 1255	Val Gly Val	Ser Ser 1260	Pro Gly Arg Ala Ala	Lys Ala Val	1250

ES 2 692 809 T3

Cys Thr 1270	Leu Thr Asp 1275	Val Tyr	Leu Pro Glu Leu Arg	Pro Tyr Leu	1265
Gln Pro 1285	Glu Thr Ala 1290	Ser Lys	Cys Trp Lys Leu Lys	Leu Asp Phe	1280
Arg Asp 1300	Val Arg Leu 1305	Met Val	Trp Lys Gly Ala Thr	Ala Tyr Phe	1295
Gln Leu 1315	Glu Gly Leu 1320	Thr Trp	Ser Ala Leu Pro Asp	Tyr Ala Arg	1310
Phe Ile 1330	Gln Leu Pro 1335	Lys Asp	Ala Val Val Tyr Ile	Asp Pro Cys	1325
Ile Gly 1345	Pro Ala Thr 1350	Ala Asn	Arg Lys Val Val Arg	Thr Thr Asp	1340
Trp Arg 1360	Ala Asp Leu 1365	Ala Val	Thr Pro Tyr Asp Tyr	Gly Ala Gln	1355
Val Ile 1375	Leu Thr Thr 1380	Ala Trp	Phe Glu Asp Leu Gly	Pro Gln Trp	1370
Lys Ile 1390	Leu Gly Leu 1395	Gln Pro	Phe Arg Arg Thr Phe	Gly Phe Glu	1385
Asn Thr 1405	Glu Asp Trp 1410	Ala Ile	Leu Ala Arg Arg Met	Asn Asp Gly	1400
Lys Asp 1420	Tyr Thr Asp 1425	Tyr Asn	Trp His Cys Val Arg	Glu Arg Pro	1415
His Ala 1435	Ile Tyr Gly 1440	Arg Ala	Arg Asp His Thr Tyr	His Phe Ala	1430
Leu Gly 1450	Thr Glu Leu 1455	Gln Val	Glu Leu Gly Arg Pro	Arg Leu Pro	1445
Pro Glu	Gln Val Pro				1460

- 5 <210> 13  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 692 809 T3

<220>

<223> ORF 2 CEPA 94881 DE PRRSV PARENTAL CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 11611..12360

5 <400> 13

```

Met Gln Trp Val His Cys Gly Val Lys Ser Val Ser Cys Ser Trp Met 1
 5                               10                          15

Pro Ser Leu Ser Ser Leu Leu Val Trp Leu Thr Leu Ser Ser Phe Ser
20                               25                          30

Pro Tyr Cys Leu Gly Ser Leu Leu Gln Ala Gly Tyr Trp Ser Ser Phe          35
40                               45

Ser Glu Trp Phe Ala Pro Arg Phe Ser Val Arg Ala Leu Pro Phe Thr          50
55                               60

Leu Pro Asn Tyr Arg Arg Ser Tyr Glu Gly Leu Leu Pro Asn Cys Arg 65
70                               75                          80

Pro Asp Val Pro Gln Phe Ala Val Lys His Pro Leu Gly Ile Leu Trp
85                               90                          95

His Met Arg Val Ser His Leu Ile Asp Glu Met Val Ser Arg Arg Ile
100                              105                         110

Tyr Arg Thr Met Glu His Ser Gly Gln Ala Ala Trp Lys Gln Val Val          115
120                              125

Ser Glu Ala Thr Leu Thr Lys Leu Ser Arg Leu Asp Val Val Thr His          130
135                              140

Phe Gln His Leu Ala Ala Val Glu Ala Asp Ser Cys Arg Phe Leu Ser 145

```



ES 2 692 809 T3

150

155

160

Ser Arg Leu Ala Met Leu Lys Asn Leu Ala Val Gly Asn Val Ser Leu  
165 170 175

Glu Tyr Asn Thr Thr Leu Asp Arg Val Glu Leu Ile Phe Pro Thr Pro  
180 185 190

Gly Thr Arg Pro Lys Leu Thr Asp Phe Arg Gln Trp Leu Ile Ser Val 195  
200 205

His Ala Ser Ile Phe Ser Ser Val Ala Ser Ser Val Thr Leu Phe Thr 210  
215 220

Val Leu Trp Leu Arg Ile Pro Ala Leu Arg Tyr Val Phe Gly Phe His 225  
230 235 240

Trp Pro Thr Ala Thr His His Ser Asn 245

<210> 14

<211> 265

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> ORF 3 CEPA 94881 DE PRRSV PARENTAL CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 12219..13016

<400> 14

Met Ala Tyr Gln Arg Ala Arg Phe His Leu Leu Leu Cys Gly Phe Val 1  
5 10 15

Cys Tyr Leu Val His Ser Ala Leu Ala Ser Asn Ser Ser Ser Thr Leu  
20 25 30

Cys Phe Trp Phe Pro Leu Ala His Gly Asn Thr Ser Phe Glu Leu Thr 35  
40 45

Ile Asn Tyr Thr Ile Cys Lys Pro Cys Pro Thr Ser Gln Ala Ala Gln 50  
55 60

15

ES 2 692 809 T3

Gln Arg Leu Glu Pro Gly Arg Asn Val Trp Cys Lys Ile Gly His Asp 65  
70 75 80

Arg Cys Glu Glu Arg Asp His Asp Glu Leu Ser Met Ser Ile Pro Ser  
85 90 95

Gly Tyr Asp Asn Leu Lys Leu Glu Gly Tyr Tyr Ala Trp Leu Ala Phe  
100 105 110

Leu Ser Phe Ser Tyr Ala Ala Gln Phe His Pro Glu Leu Phe Gly Ile 115  
120 125

Gly Asn Val Ser Arg Val Phe Val Asp Lys Arg His Gln Phe Ile Cys 130  
135 140

Ala Glu His Asp Gly Gln Asn Ser Thr Ile Ser Ala Arg His Asn Ile 145  
150 155 160

Ser Ala Ser Tyr Ala Val Tyr Tyr His His Gln Ile Asp Gly Gly Asn  
165 170 175

Trp Phe His Leu Glu Trp Leu Arg Pro Phe Phe Ser Ser Trp Leu Val  
180 185 190

Leu Asn Ile Ser Trp Phe Leu Arg Arg Ser Pro Ala Ser Pro Ala Ser 195  
200 205

Arg Arg Ile Tyr Gln Ile Leu Arg Pro Thr Arg Pro Arg Leu Pro Val 210  
215 220

Ser Trp Ser Phe Arg Thr Ser Ile Val Ser Asn Leu Thr Gly Pro Gln 225  
230 235 240

Gln Arg Lys Val Pro Leu Pro Ser Gly Gly Arg Pro Asn Val Val Lys  
245 250 255

Pro Ser Ala Phe Pro Ser Thr Ser Arg 260 265

<210> 15  
<211> 183  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
10 <223> ORF 4 CEPA 94881 DE PRRSV PARENTAL CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE  
LOS NUCLEÓTIDOS 12761..13312

<400> 15

ES 2 692 809 T3

Met Ala Ala Thr Ile Leu Phe Leu Leu Ala Gly Ala Gln His Leu Met 1  
 5 10 15

Val Ser Glu Ala Phe Ala Cys Lys Pro Cys Phe Ser Thr His Leu Ser  
 20 25 30

Asp Ile Lys Thr Asn Thr Thr Ala Ala Ala Gly Phe Met Val Leu Gln 35  
 40 45

Asn Ile Asn Cys Phe Gln Ser His Arg Ala Ser Thr Ala Gln Gly Thr 50  
 55 60

Thr Pro Leu Arg Arg Ser Ser Gln Cys Arg Glu Ala Val Gly Ile Pro 65  
 70 75 80

Gln Tyr Ile Thr Ile Thr Ala Asn Val Thr Asp Glu Ser Tyr Leu Tyr  
 85 90 95

Asn Ala Asp Leu Leu Met Leu Ser Ala Cys Leu Phe Tyr Ala Ser Glu  
 100 105 110

Met Ser Glu Lys Gly Phe Lys Val Ile Phe Gly Asn Ile Ser Gly Val 115  
 120 125

Val Ser Ala Cys Val Asn Phe Thr Asp Tyr Val Ala His Val Thr Gln 130  
 135 140

His Thr Gln Gln His His Leu Val Ile Asp His Ile Arg Leu Leu His 145  
 150 155 160

Phe Leu Thr Pro Ser Thr Met Arg Trp Ala Thr Thr Ile Ala Cys Leu  
 165 170 175

- 5 Phe Ala Ile Leu Leu Ala Val 180
- <210> 16
- <211> 201
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <223> ORF 5 CEPA 94881 DE PRRSV PARENTAL CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 13309..13914
- 15 <400> 16

ES 2 692 809 T3

Met Lys Cys Ser Cys Lys Leu Gly His Phe Leu Thr Pro His Ser Cys 1  
5 10 15

Phe Trp Trp Leu Phe Leu Leu Cys Thr Gly Leu Ser Trp Ser Phe Val  
20 25 30

Asp Gly Asn Asp Asn Ser Ser Thr Ser Gln Tyr Ile Tyr Asn Leu Thr 35  
40 45

Ile Cys Glu Leu Asn Gly Thr Glu Trp Leu Ser Gly His Phe Asp Trp 50  
55 60

Ala Val Glu Thr Phe Val Leu Tyr Pro Val Ala Thr His Ile Ile Ser 65  
70 75 80

Leu Gly Phe Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Ala Leu Gly Leu Gly  
85 90 95

Ala Val Ser Ala Thr Gly Phe Ile Gly Glu Arg Tyr Val Leu Ser Ser  
100 105 110

Met Tyr Gly Val Cys Ala Phe Ala Ala Leu Val Cys Phe Val Ile Arg 115  
120 125

Ala Ala Lys Asn Cys Met Ala Cys Arg Tyr Ala Arg Thr Arg Phe Thr 130  
135 140

Asn Phe Ile Val Asp Asp Arg Gly Arg Ile His Arg Trp Lys Ser Ser 145  
150 155 160

Ile Val Val Glu Lys Leu Gly Lys Ala Glu Val Gly Gly Asp Leu Val  
165 170 175

Asn Ile Lys His Val Val Leu Glu Gly Val Lys Ala Gln Pro Leu Thr  
180 185 190

Arg Thr Ser Ala Glu Gln Trp Glu Ala 195 200

5 <210> 17  
<211> 173  
<212> PRT  
<213> Virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino

10 <400> 17

ES 2 692 809 T3

Met Gly Ser Leu Asp Asp Phe Cys Asn Asp Pro Thr Ala Ala Gln Lys 1  
5 10 15

Leu Val Leu Ala Phe Ser Ile Thr Tyr Thr Pro Ile Met Ile Tyr Ala  
20 25 30

Leu Lys Val Ser Arg Gly Arg Leu Leu Gly Leu Leu His Ile Leu Ile 35  
40 45

Phe Leu Asn Cys Ser Phe Thr Phe Gly Tyr Met Thr Tyr Val His Phe 50  
55 60

Gln Ser Thr Asn Arg Val Ala Leu Thr Leu Gly Ala Val Val Ala Leu 65  
70 75 80

Leu Trp Gly Val Tyr Ser Leu Thr Glu Ser Trp Lys Phe Ile Thr Ser  
85 90 95

Arg Cys Arg Leu Cys Cys Leu Gly Arg Arg Tyr Ile Leu Ala Pro Ala  
100 105 110

His His Val Glu Ser Ala Ala Gly Leu His Ser Ile Pro Ala Ser Gly 115  
120 125

Asn Arg Ala Tyr Ala Val Arg Lys Pro Gly Leu Thr Ser Val Asn Gly 130  
135 140

Thr Leu Val Pro Gly Leu Arg Ser Leu Val Leu Gly Gly Lys Arg Ala 145  
150 155 160

Val Lys Arg Gly Val Val Asn Leu Val Lys Tyr Gly Arg 165  
170

5 <210> 18  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino

10 <400> 18

ES 2 692 809 T3

Met Ala Gly Lys Asn Gln Ser Gln Lys Lys Arg Arg Asn Ala Ala Pro 1  
 5 10 15

Met Gly Lys Gly Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Leu Leu Gly Thr  
 20 25 30

Met Ile Lys Ser Gln Arg Gln Gln Ser Arg Gly Gly Gln Ala Lys Lys 35  
 40 45

Lys Lys Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Ala Glu Asp Asp Ile 50  
 55 60

Arg His His Leu Thr Gln Ala Glu Arg Ser Leu Cys Leu Gln Ser Ile 65  
 70 75 80

Gln Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Ala Ser Leu Ser Ser Ser  
 85 90 95

Gly Lys Val Ser Phe Gln Val Glu Phe Met Leu Pro Val Ala His Thr  
 100 105 110

Val Arg Leu Ile Arg Val Thr Ser Thr Ser Ala Ser Gln Gly Ala Asn 115  
 120 125

- 5 <210> 19
- <211> 7050
- <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <223> Nucleótido que codifica el ORF1a DE PRRSV 94881 atenuado
- <400> 19

ES 2 692 809 T3

atgtctggga tgttctcccg gtgcatgtgc accccggctg cccgggtatt ttggaacgcc 60  
ggccaagtct attgcacacg gtgtctcagt gcacggcttc ttctctctcc agaacttcag 120  
gacacggacc tcggtgcagt tggcttgttt cacaagccta aagacaagct ccattggaaa 180  
gttcccattg gtatccccc ggtggaatgt tctccatctg ggtgttgctg gctgtcaacc 240  
atthttcctt tagcgcgcat gacctccggc aatcacaact tccttcaacg actcgtgaag 300  
gttgctgatg tattgtaccg tgacggttgc ttaacccta gacacctccg tgaactccaa 360  
gtttacgagc gtggttgcaa ttggtatccg attacggggc ctgtgcctgg gatggctgtg 420  
tacgcgaact ccattgcacgt gtccgaccaa ccgttccctg gtgccactca tgtgttaaca 480  
aattcccctt tgcctcaacg ggcttgtcgg cagccgttct gtccgttcga agaggcccat 540  
tctagcatat acaggtggga aaaatttcta atthttatgg attcctcctc cgacggtcga 600  
tctcgcataa tgtggactcc ggaatccgat gactccacgg ctttgggaagt tctgccgccc 660  
gagctagaac accaggtcaa ggtccttgtt cggagctttc ccgccatca ccttgtcgac 720  
cttgccgatt gggagctcac tgagtcccct gataacgggt tttccttcag cacgtcacat 780  
ccttgccgct accttgttcg ggacccggct gtatccgaag gcaagtgtt gctttcctgc 840  
thtttgagcc agtcagccga agtgctcagt cgcgaggcgc atctggctac cgcctatggt 900  
taccaaacca agtgggggtg gcctggcaag tacatccagc gcagacttca agttcacggt 960  
ctccgtgctg tggtcgaccc tgatggtccc attcacgttg aagcattgtc ttgccccag 1020  
tcttggatca ggcacttgac cctgaatgat gatgtcacc cgggattcgt tcgcctaata 1080  
tctcttcgca ttgtgccgaa cacagagcct accacacacc ggatctttcg thttggagt 1140  
cacaagtggg atggtgccgc cggcaaaccg gcccggtgca agcgtgccgc caaaagtgag 1200  
aaagactcgg ctccaccct caaggttgcc cgaccgactt ccaccagtgg aatcgtcacc 1260  
tactccccac ctgcccagcg gtcttgtggt tggcatgcc ttgccgcat actgaaccgg 1320  
atgattaata atgacttcac gtcccctctg cctcggtaaca acagccgga ggacgattgg 1380  
gcttctgatg gtgaccttgc tcaggccatt caatgtttgc aactacctgc cgccatagct 1440  
cggaaaccgg cctgcctaa cgccaaatac ctcataaaac tcaacggagt tcattgggag 1500

ES 2 692 809 T3

gttagaggta ggcctggaat ggctcctcgc tccctctctc gtgagtgcgt tgttggcgtc 1560  
 tgctctgaag gctgtgtcgc gtcgccttac cgggaggacg ggttgcctaa acgtgcactt 1620  
 gaggccctgg cgtctgctta tagactgcct tcagactgtg tttgtgatgg tattattgac 1680  
 ttccttgcca atccacctcc ccaggagtcc tggactcttg acaaaatggt gaactccccg 1740  
 tcaccgggagc agtccggcct ctctagtctg tataaattgt tgtagagat cttgccgag 1800  
 aatgctggat ccacagaagg ggaattcatc tatactgttg agaggatggt gaaggattgt 1860  
 ccgagctcca aacaggccat ggccctcctt gcaaaaatta aggtcccatc ctcaaaggcc 1920  
 ccatacgtga ctctgaacga gtgcttcccc acggatgttc cagtcaactc tgagttaata 1980  
 tcttgggaag agcccaaaga ccctggcgct gctgttctcc tatgtccatc ggatgcaaaa 2040  
 gaatctaagg aaacagcccc tgaagaagct caagcgagaa accgtaaggt ccttcaccct 2100  
 gtggtcctta ccgaggaact tagcgagcaa caggtgcagg tggttgaggg tgatcaggat 2160  
 atgccactgg atttgacttg gccaacctta accgctacgg cgaccctgt tagagggccg 2220  
 gtaccggaca atttgagctc tggcattggt gccagcccg ctaccgttca agaactcatt 2280  
 ctggcgaggc ctgcaccccc tcttgttgag cgctgtggca cggagtcgaa cggcagcagt 2340  
 tcatttctg atttgctga cgtgcagacc tcggaccagc ctttagacct gtccctggcc 2400  
 gcgtggcctg taagggttac cgcgtctgac cccggttggg tccacgtag gcgtgagcct 2460  
 gtctttgtga agcctcgagg tgttttctct gatggcgagt cggcccttca gttcggagag 2520  
 cttccgaag ccagttctgt cgtcgatgac cggacaaaag aagctccggt ggttgacgcc 2580  
 cccatcgatt tgacaacttc gaacgagacg ctctctgggt ctgaccctt tgaattcgcc 2640  
 aaattcaggc gcccgcttct ctccgcgcaa gctttaatcg accgaggtgg tccgcttgcc 2700  
 gatgttcag caaagataaa gagtcgggta tatgaacaat gccttcaagc ttgtgaacct 2760  
 ggtagtcgtg cgacccagc caccaagaag tggctcgaca aatgtggga caggggtggac 2820  
 atgaaaactt ggcgtgcac ctgcagttc caagctggtc acattcttga gtccctcaa 2880  
 ttctccctg acatgattca agacacaccg cctcctgttc ccaggaagaa ccgagctggt 2940  
 gacagtgccg gcctgaagca actggtggcg cagtgggata ggaaatcgag tgtgacacc 3000  
 cccacaaaac cggttggacc ggtgcttgac caggccgtcc ctctgcctat ggacatccag 3060  
 caaggagatg ccatactcgc tgacaagcca cccattcgc aaaaccttc tagtcaagta 3120  
 gatgtgggtg gaggttgaa aagttttatg ctctccgca cccgtttcgc ggggtccgtt 3180  
 agtcagcgc ttacgacatg ggtttttgag gttctctccc atctcccagc ttttatgctc 3240  
 acacttttct cgccacgggg ctctatggct ccaggatgatt ggctgtttgc aggtgctgtt 3300  
 ctacttgctc tctgctctg ccgttcttac ccaatactcg gatgccttc ctattgggt 3360  
 gtcttttctg gttctgtgcg gtgtgttcgt ttgggtggtt ttgggtcttg gatggctttt 3420



ES 2 692 809 T3

gctgtatfff tattctcgac tccacccgac ccagtcgggtt cttcttgtga ccacgattcg 3480  
ccggagtgtc atgctgagct tttggctcct gagcagcgcc aactttggga acctgtgcgc 3540  
agccttgtgg tcggggccatc gggcctctta tgcgtcattc ttggcaagtt actcggtggg 3600  
tcacgttgtc tctggtttgt tctcctacgt atatgcatgc tcgcagattt ggcaatftct 3660  
cttatttatg tgggtgtccca agggcgttgt cacaagtgtt ggggaaagtg tataaggacg 3720  
gctcctgcag aagtggccct taatgtgttt cctttttcgc gcgccacccg ctcatctcct 3780  
gtgtccttgt gtgatcgggt ccaagcgcca aaaggagttg acccogtgca cttggcgaca 3840  
ggctggggcg ggtgctggtg tggtagagac cctattcatc aatcacacca aaaaccgata 3900  
gcttatgcca acttggatga aaagaagata tccgcccaga cggtgattgc tgtcccgtat 3960  
gatcctagtc aggccattaa atgcctgaaa gttttgcagg caggaggggc tattgtggac 4020  
cagcctacgc ccgaggtcgt ccgtgtgtct gagattccct tctcggcccc atfttttccg 4080  
aaggtcccag tcaaccgaga ctgcagggtt gtggtagatt cggacacttt tgtggctgcg 4140  
gtccgctgcg gttattcgac agcacaactg gtccttggtc ggggcaactt tgccaagcta 4200  
aatcagaccc ccctcaggaa ctctgtcccc accaaaacaa ctggtggggc ctcatacacc 4260  
cttgcctggtg ccaggtatc tgtgtggact cttgttcatt tcatcctcgg cctttggtta 4320  
acgtcacctc aagtgtgtgg tcgagggacc tctgaccctg ggtgttcgaa cccttttctg 4380  
tatcctactt atggccccgg agttgtgtgt tcctctcgac tctgcgtgtc tgccgacgga 4440  
gttaccctgc cattgttctc agccgttgcc catctttccg gtagagaggt ggggattttt 4500  
atfttgggtc ttgcctcctt gggcgcttta gccaccctg tggctcttaa ggcagacatg 4560  
tcaatggtct ttttggcggt ttgtgcttac gcctggccca tgagctcctg gttaatftgc 4620  
ttctttccta tgcctctgag gtgggtaacc cttcatcctc tcactatgct ttgggtgcac 4680  
tcattfttgg tgttttgcct accagctgcc ggcgttctct cgctgggaat aaccggtctt 4740  
cfttgggcag ttggccgttt caccaggtt gccggaatta tcacacctta tgacatccac 4800  
cagtatacct ccggaccacg tgggtgcagct gctgtagcaa cggctccaga aggtacttac 4860  
atggcggccg ttoggagagc cgctttgact ggacggactt tgatcttcac accatctgca 4920  
gtcggatccc ttcttgaagg tgctttcaga actcaaaagc cctgccttaa caccgtgaat 4980  
gtcgtaggct cttcccttgg ttctggagga gttttacca ttgatggcag aagagtcatc 5040  
gtcactgcca cccatgtgtt gaatggtaac acagccaggg tcactggtga ttcctacaac 5100  
cgcatgcaca cgttcaatac taatggtgat tatgcctggt cccatgctga tgactggcaa 5160  
ggcgttgccc ctatggttaa gatcgctaag gggtatcgcg gtcgtgccta ctggcaaacg 5220  
tcaaccggag tcgaacctgg catcatgggg gaaggattcg ccttctgttt cactaactgt 5280

ES 2 692 809 T3

ggcgactcag ggtcacctgt catttcagaa gctggtgacc ttattggagt ccataccggt 5340  
 tcaaacaac tcggttctgg tcttgtgaca acccctgaag gggagacctg ctccatcaag 5400  
 gaaactaggc tctctgacct ttctagacat tttgcaggtc caagcgtccc tcttggggac 5460  
 attaagtga gccagccat catccctgat gtgacaacta ttccgagtga cttggcatcg 5520  
 ctccctgctt ctgtccccgt gatggaaggt ggcctctcaa ctgtccagct tttgtgcgtc 5580  
 tttttccttc tctggcgcat gatgggcat gcctggacac ccattgttgc cgtaggcttc 5640  
 tttttgctga atgaaattct cccagcagtc ttggtccgag ctgtgttctc ttttgcactc 5700  
 tttgtacttg catgggccac cccctggtcg gcacaagtgt tgatgattag actcctcacg 5760  
 gcggctctca accgcaacag gttgtccctg gcgttctacg caticggagg tgcctgtggc 5820  
 ctggccacag aaatcgggac ttttgctggt ggatggcctg aactgtcca agccctctcg 5880  
 acatactgct tcctgccag gttccttctg gtgactagtt atgtcccac catcatcatc 5940  
 ggtgggctcc atgcctcgg cgtaattttg tggttattca aataccgatg cctccacaac 6000  
 atgctggttg gtgatgggag tttctcaagc gctttcttcc tacggtattt tgctgaggtt 6060  
 aatcttagga aaggcgtgtc gcagtcctgt ggcataaata acgaatccct gacagctgct 6120  
 ttggcttga agttgtcgca agctgacctt gattttttgt ccagtttaac gaacttcaag 6180  
 tgctttgtgt ccgcttcaaa catgaaaaat gcagctggcc aatacatcga ggcggcgtat 6240  
 gctagagctc tgcgtcagga gctggcctcc ttggttcagg ttgacaagat gaaaggagta 6300  
 ttggccaagc tcgaggcttt cgctgagacg gccactcctg cacttgacac aggggacgtg 6360  
 attgttctgc ttgggcaaca ccccatgga tccatcctcg acattaatgt ggggggtgaa 6420  
 aggaaaactg tgtctgtgca agaaacacga tgcctgggtg gttccaaatt cagtgtctgc 6480  
 actgtcgtgt ccaacacgcc cgtggatacc ttgaccggta tcccacttca gacgccaacc 6540  
 ccactttttg aaaatggccc gcgccatcgc agcgaggacg acgacctca agttgagaga 6600  
 atgaaaaaac actgtgtatc cctcggcttc cacaaaatca atggtaaagt ttactgcaa 6660  
 atttgggaca agtctaacgg cgacaccttt tacacggatg attcccgata cactcaagac 6720  
 catgcttttc aggacaggtc aaccgactat agagacaggg attatgaagg tgtacagacc 6780  
 gcccccaac agggattcga tccaaagtcc gaagccctg ttggcactgt tgtaatcgg 6840  
 ggcattacgt ataacaggca tctggtcaaa ggtaaggagg tcctagttcc caaacctgac 6900  
 aactgccttg aagctgccag actgtccctt gagcaagctc ttgctgggat gggccaaact 6960  
 tgtgacctta cagctaccga agtggagaaa ctaaagcgca tcattagtca actccaaggt 7020  
 ctgaccactg aacaggcttt aaactgctag 7050

<210> 20  
 <211> 4392  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Nucleótido que codifica el ORF1B DE PRRSV 94881 atenuado

10

<400> 20

ES 2 692 809 T3

acaggcttta aactgctagc cgccagcggc ttgaccogct gtggccgcg ggcctagtt 60  
 gtaactgaaa cggcggtaaa aatcgtaaaa taccacagca gaactttcac cttaggctct 120  
 ttagacctaa aagtcacctc cgaggtggag gtgaagaaat caactgagca ggggcacgct 180  
 gtcgtggcga acttatgttc cgggtgcgtc ttgatgaggc ctcaccacc gtccttgtt 240  
 gacgttctcc tcaaaccgg acttgacaca acaccggca ttcaaccagg gcatggggcc 300  
 gggaaatag gctgaacgg ttctatttgg gatthttaa ctgcaccac aaaggtagaa 360  
 ctagagtgtt ccaagcaaat aatccaagca tgtgaagtca ggcgcgggga cgcccctaac 420  
 ctccaactcc cctacaagct ttatcctgtc aggggggacc ccgagcggcg taaaggtcgc 480  
 cttgtcaaca ctaggtttgg agatthttaa taaaaactc cccaagacac caagtccgca 540  
 attcatgagg cttgttgcct gcatcccaat ggggtcctcg tgtctgatgg caaatccacg 600  
 ctgggtacca ctcttcaaca tggthtgcag ctttatgtcc cactgtacc ttatagtgc 660  
 atggaatacc ttgattcacg ccctgacacc cthtttatgt gtactaaaca tggcacttcc 720  
 aaggctgctg cagaggacct caaaaaatat gacctatcca ctcaagggtt tgtcttgcct 780  
 ggggtcctac gcctagtgcg caggttcac tttagccatg ttggtaaggc gccaccactg 840  
 ttccttccat caacctacc tgccaagaac tccatggcag ggtcaatgg ccagaggttc 900  
 ccaacaaagg atgtccagag catacctgaa attgatgaaa tgtgccccg tgccgtcaag 960  
 gaaaattggc agactgtgac accttgacc ctcaaaaaac agtactgttc caaacctaaa 1020  
 actagaacca tcctaggtac caacaactc atagccttgg ctcacaggc agcactcagt 1080  
 ggtgtcacc aggcgttcat gaagaaggcc tggaaagccc caattgcctt ggggaaaaac 1140  
 aagthtaagg aattgcattg cactgtgcc ggcagatgcc ttgaggctga cctggcttcc 1200  
 tgcgatcgca gcaacccgc cattgtgagg tggthtgtt ccaacctcct gtatgaactt 1260  
 gcaggatgtg aagagtactt gcctagctac gtgctcaact gttgccatga cttgtggca 1320  
 acgcagatg gcgctttcac aaaacgcgg ggcctgtcgt ccggggacc cgtcaccagt 1380  
 gtgtccaaca ccgtctact actgataatt tacgccagc acatggtgct ttcggccttg 1440  
 aagatgggtc atgaaattgg totcaagttc cttgaggaac agctcaaat tgaggacctt 1500  
 cttgaaatcc agcccatgtt agtgtattct gatgacctc tcttgatgc ggaaagacc 1560  
 actthtcca actaccattg gtgggtcgag catcttgacc tgatgttgg cthtaaacg 1620  
 gacccaaga aactgtcat aactgataaa ccagthttc tcggctgcag aattgaagca 1680

ES 2 692 809 T3

ggacggcagt tagtcccaa tcgcgaccgt attctggctg ctcttgcata tcatatgaag 1740  
 ggcgagaacg cctcagagta ttatgcgtcc gctgccgcaa ttctgatgga ttcgtgtgct 1800  
 tgcattgacc atgaccccga gtggtatgag gatcttatct gcggcatcgc ccggtgtgct 1860  
 cgccaggacg gttaccgttt tccaggcccc gcatttttca tgtccatgtg ggagaagctg 1920  
 aaaagtcata atgaagggaa gaaatgccgt cactgcggca tctgcgacgc caaagccgac 1980  
 tatgcgtccg cctgtggact tgatttgtgt ttgttccatt cacactttca tcaaacctgc 2040  
 ccagtcaactc tgagctgtgg ccaccatgcc ggttcaaagg aatgttcgca gtgtcagtca 2100  
 cctgtcgggg ctggcaaatc cccccttgac gctgtgctga aacaaatccc gtacaaacct 2160  
 cctcgtacca ttatcatgaa ggtggacaac aaaacaacga cccttgacct gggaagatat 2220  
 cagtcccgtc gaggtcttgt tgcagtcaaa agaggtattg caggtaatga ggttgatctt 2280  
 tctgatggag actaccaagt ggtgcctctt ttgccgactt gcaaagacat aaacatggtg 2340  
 aaggtggctt gcaacgtact actcagcaag tttatagtag ggccgccagg ttccggaaaa 2400  
 accacctggc tactgaacca agtccaggac gatgatgtca tttacacacc tactcatcag 2460  
 acaatgtttg acatagtcag tgctcttaaa gtttgcaggt attccatccc aggagcctca 2520  
 ggactccctt ttccaccacc tgccaggtcc gggccgtggg ttaggctcat cgccagcggg 2580  
 catgtccctg gccgagtgtc atatctcgat gaggcaggat attgcaatca tctagacatt 2640  
 ctaaggtgc tttccaaaac accccttgtg tgtttgggtg accttcagca acttcacccg 2700  
 gtcggctttg attcctattg ttatgtgttc gatcagatgc ctcagaagca gctgaccacc 2760  
 atttatagat ttggccctaa catctgtgca gccatccagc cttgttacag ggagaaactt 2820  
 gaatccaagg ccaggaacac cagagtgggt ttcaccaccc ggctgtggc ctttggtcag 2880  
 gtcctgacac cgtaccacaa agatcgtacc ggctctgcaa taactataga ttcattccag 2940  
 ggggcgacct tcgacattgt gacattgcat ctaccatgc caaagtccct aaacaaatcc 3000  
 cgagcacttg tagccatcac tgggcaaga catgggttgt tcatttatga ccctcatgac 3060  
 caactccag agtttttcaa cttaaccccc gagcgcactg attgtaacct tgcgttcagc 3120  
 cgtggggatg agctggttgt tttgaatgtg gataatgctg tcacaactgt agcgaaggcc 3180  
 ctagagacag gttcaccocg atttcgagta tcggaccoga ggtgcaagtc tctcttagcc 3240  
 gcttgttcgg ccagtctaga agggagctgc atgccactac cacaagtagc acataacctg 3300  
 gggttttact tttcccggga cagcccagct tttgcacccc tgccaaaaga gctggcgcca 3360  
 cattggccag tggtcaccca ccagaataat cgagcgtggc ctgatcgact tgtcgctagt 3420  
 atgcgccc aa ttgatgccc ctacagcaag ccaatggtcg gtgcaggta tgtggtcggg 3480  
 ccaccattt ttcttggcac tcctggtgtg gtgtcactat atctcacatt atacatcggg 3540  
 ggcgagcctc aggccttgc agaaacactc gtttcaacag gacgtatagc cacagattgt 3600

ES 2 692 809 T3

cgggaatata tcgacgcggc tgaggaagag gcagcgagag aacttcccca cgcatttatt 3660  
 ggcgatgtca aaggcactac gatcgggggg tgtcaccaca ttacatcgaa atacctacct 3720  
 aggtccctgc ctaaagactc tgttgctgtg gttggggtga gttcgcccgg tagggctgct 3780  
 aaagccgtgt gactctcac cgatgtgtac ctccccgaac tccgaccata tttgcaaccg 3840  
 gagacggcat caaaatgctg gaaacttaa ctggatttca gggatgttcg actgatggtc 3900  
 tggaaaggcg ccacagccta tttccagttg gaagggtga catggtcagc gctgcccgat 3960  
 tatgctaggt tcattcagct acccaaggat gccgttgtgt acatcgatcc gtgtataggg 4020  
 ccggcaacag ccaatcgcaa gggtgtgcga accacagact ggcgggccga cctggcagtg 4080  
 acaccgtatg attacggtgc tcaggctatt ttgacaacag cctggttcga ggaccttggg 4140  
 ccgcagtgga agatthtggg gttgcagcct ttcagacgaa catttggctt tgagaacact 4200  
 gaagattggg caattctcgc acgccgatg aatgacggca aagattacac tgactataat 4260  
 tggcattgtg tacgagaacg cccacacgca atttacgggc gcgccctga ccatacgtat 4320  
 cttttgccc ttggcactga actgcaagta gagctgggca gaccccggt gcctcctgag 4380  
 caagtgccgt ga 4392

<210> 21  
 <211> 750  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Nucleótido que codifica el ORF1 DE PRRSV 94881 atenuado

<400> 21

atgcaatggg tttactgtgg agtaaaatca gtcagttggt cgtggatgcc ttcactgagt 60  
 tccttgttag tgtggttgac attgtcatct ttctcgccat attgthtggg ttcactgttg 120  
 caggctgggt attggtcttc cttctcagag tggthtgcct cgcgthtctc cgttcgcgct 180  
 ctgccattca ctcttccgaa ctatcgaagg tcctatgagg gcttgctacc caactgcaga 240  
 ccggatgtcc cacaattcgc agttaagcac ccgttgggta tactthtggca tatgcgagtc 300  
 tcccaccta ttgacgaaat ggtctctcgc cgcatttacc ggaccatgga acattcgggt 360  
 caagcggcct ggaagcaggt tgttagtgaa gccactctca caaaactgtc aaggcttgac 420  
 gtagtcactc atttccaaca cctggccgca gtggaggctg attottgccg ottccttagc 480  
 tcacgactcg cgatgctgaa aaaccttgcc gttggcaatg tgagcctgga gtacaacact 540  
 actthtggacc cgttgagct catctthtccc acaccaggta cgaggcccaa gttgaccgat 600  
 thtaggcaat ggcttatcag cgtgcacgct tccatcttct cctctgtggc thcgtctggt 660  
 acctgttca cagtgccttg gcttcgaatt ccagctctac gctatgttht tggthtccat 720  
 tggcccacgg caacacatca thcgaactaa 750

<210> 22  
 <211> 798  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 692 809 T3

<223> Nucleótido que codifica el ORF3 DE PRRSV 94881 atenuado

<400> 22

```

atggcttata agcgtgcacg cttccatctt ctctctgtg gcttcgtctg ttaccttggt      60
cacagtgctt tggcttcgaa ttccagctct acgctatggt tttggtttcc attggcccac      120
ggcaacacat cattogaact aactatcaat tacactatat gtaagccatg ccctaccagt      180
caagctgccc aacaaagact cgagcctggc cgtaacgtgt ggtgcaaaat agggcacgac      240
aggtgtgagg aacgtgacca tgatgagttg tcaatgtcca ttccgtccgg gtacgacaac      300
ctcaaacttg agggttatta tgcttggtg gcttttttgt ccttttccta cgcggcccaa      360
ttccatccgg agctgttcgg aataggaaac gtgtcgcgcg tctttgtgga taagcgacac      420
cagttcattt gcgccgagca tgatggacaa aattcaacca tatctgccag acacaacatc      480
tccgcgtcgt atgcggtgta ttaccatcat caaatagacg ggggcaattg gtttcatttg      540
gaatggctgc gaccattctt ttctcctgg ctggtgctca acatctcatg gtttctgagg      600
cgttcgctg caagccctgc ttctcgacgc atctatcaga tattaagacc aacacgaccg      660
cggctgcggg tttcatggtc cttcagaaca tcaattgttt ccaatctcac agggcctcaa      720
cagcgcaagg taccactccc ctcaggaggt cgtcccaatg tcgtgaagcc gtcggcattc      780
5  cccagtacat cacgataa                                                    798

```

<210> 23

<211> 552

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Nucleótido que codifica el ORF4 DE PRRSV 94881 atenuado

15 <400> 23

```

atggctgcga ccattctttt cctcctggct ggtgctcaac atctcatggt ttctgaggcg      60
ttcgcctgca agccctgctt ctcgacgcat ctatcagata ttaagaccaa cacgaccgcg      120
gctgcccgtt tcatggtcct tcagaacatc aattgtttcc aatctcacag ggcctcaaca      180
gcgcaaggta ccaactcccct caggaggtcg tcccaatgtc gtgaagccgt cggcattccc      240
cagtacatca cgataacggc taatgtgacc gatgaatcgt atttgtacaa cgcggacttg      300
ctgatgcttt ccgcgtgcct tttctacgcc tcggaatga gcgagaaag cttcaaagtc      360
atctttggga atatttctgg cgttgtttcc gcttgtgta atttcacaga ttatgtggcc      420
catgtgaccc aacacactca gcagcaccat ttgtaattg atcacattcg gttactacac      480
ttcttgacac cgtctacgat gaggtgggct acaaccattg cttgtttgct tgccattctt      540
ttggcggtat ga                                                            552

```

20

<210> 24

<211> 606

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Nucleótido que codifica el ORF5 DE PRRSV 94881 atenuado

ES 2 692 809 T3

<400> 24

```

atgaaatggt cttgcaagtt ggggcatttc ttgactcctc actcttgctt ctggtggctt      60
tttttctgt gtaccggctt gtcttgggcc tttgtcgatg gcaacgacga cagctcgaca      120
tccaataca tatataattt gacgatatgc gagctgaatg ggaccgaatg gttgtccggt      180
cattttgatt gggcagtcga aacctttgtg ctttaccagc ttgccactca tatcatttca      240
ctgggttttc tcacaacaag ccatttcctt gatgcgctcg gtctcggcgc tgtgtccgcc      300
acaggattca ttggcgagcg gtatgtactt agcagcatgt acggcgtttg cgccttcgcg      360
gcgttcgtat gttttgtcat ccgtgctgct aaaaattgca tggcttgccg ctatgcccgc      420
acccggttta ccaacttcat cgtggacgac cggggaagaa tccatcgatg gaagtcttca      480
atagtggggg agaaattggg caaagctgaa gtcggtgggt accttgtcaa cattaagcat      540
gttgcctcgc aaggggttaa agctcaacct ttgacgagga cttcggctga gcaatgggaa      600
gcctag                                           606

```

5

<210> 25

<211> 522

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Nucleótido que codifica el ORF6 DE PRRSV 94881 atenuado

<400> 25

15

```

atgggaagcc tagacgactt ttgcaacgat cccaccgccg cacaaaaact cgtgctggcc      60
tttagcatca catatacacc cataatgata tacgccotta aggtgtcacg cggccgactc      120
ctggggctgt tgcacatctt gatatttctg aattgttctt ttacttttgg gtacatgaca      180
tatgtgcatt ttcaatccac caaccgtgtc gcattcactc tgggggctgt agtcgccctt      240
ttgtgggggtg tttacagcct cacagagtca tggaaagtca tcaactccag atgcagattg      300
tgttgcctag gccggcgata cattctggcc cctgcccatc acgtagaaag tgctgcaggc      360
ctccattcaa tcccagcgtc tggtaaccca gcatacgtg tgagaaagcc cggactaaca      420
tcagtgaacg gcaactctag acctgggctt cggagcctcg tgctggggcg caaacgagct      480
gttaaacgag gagtgggttaa cctcgtcaag tatggccggt aa                          522

```

20

<210> 26

<211> 431

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Nucleótido que codifica el ORF7 DE PRRSV 94881 atenuado

<400> 26

ES 2 692 809 T3

atggccggtg agaaccagag ccagaagaaa agaagaaatg cagctccgat ggggaaaggc 60  
 cagccagtca atcaactgtg ccagttgctg ggtacaatga taaagtcca gcgccagcaa 120  
 tctaggggag gacaggccaa aaagaagaag cctgagaagc cacattttcc cctagctgct 180  
 gaagatgaca ttcggcacca tctcaccag gccgaacgtt ccctctgctt gcaatcgatc 240  
 cagacggctt tcaatcaagg cgcaggaact gcgtcgcttt catccagcgg gaaggtcagt 300  
 ttccaggttg agttcatgct gccggttctg catacagtgc gcctgattcg cgtgacttct 360  
 acatccgcca gtcagggctg aaattaattt gacagtcagg tgaatggccg cgattgacgt 420  
 gtggcctcta a 431

<210> 27  
 <211> 7083  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Nucleótido que codifica el ORF1a DE PRRSV 94881 atenuado

10

<400> 27  
 atgtctggga tgttctcccg gtgcatgtgc accccggctg cccgggtatt ttggaacgcc 60  
 ggccaagtct attgcacacg gtgtctcagt gcacggctctc ttctctctcc agaacttcag 120  
 gacacggacc tcggtgcagt tggcttgttt cacaagccta aagacaagct ccattggaaa 180  
 gttcccattg gtatcccca ggtggaatgt tctccatctg ggtgttgctg gctgtcaacc 240  
 attttccctt tagcgcgcat gacctccggc aatcacaact tccttcaacg actcgtgaag 300  
 gttgctgacg tattgtaccg tgacggttgc ttaaccoccta gacacctccg tgaactccaa 360  
 gtttacgagc gtggttgcaa ttggtatccg attacggggc ctgtgcctgg gatggctgtg 420  
 tacgcgaact ccatgcacgt gtccgaccaa ccgttccctg gtgccactca tgtgttaaca 480  
 aattcccctt tgcctcaacg ggcttgtcgg cagccgttct gtccgttcga agaggcccat 540  
 tctagcatat acaggtggga aaaatttgta atttttatgg attcctcctc cgacggtcga 600  
 tctcgcata tgtggactcc ggaatccgat gactccacgg ctttgggaagt tctgccgccc 660  
 gagctagaac accaggtcaa ggtccttgtt cggagctttc ccgccatca ccttgtcgac 720



ES 2 692 809 T3

cttgccgatt gggagctcac tgagtcccct gagaacggtt ttccttcag cacgtcacat 780  
 ccttgccgct accttggtcg ggaccoggct gtatccgaag gcaagtgttg gctttcctgc 840  
 tttttgagcc agtcagccga agtgctcagt cgcgaggcgc atctggctac cgcctatggt 900  
 taccaaacca agtgggggtgt gcctggcaag tacatccagc gcagacttca agttcacggt 960  
 ctccgtgctg tggtcgaccc tgatggtccc attcacgttg aagcattgtc ttgccccag 1020  
 tcttgatca ggcacttgac cctgaatgat gatgtcacc cgggattcgt tcgcctaata 1080  
 tctcttgcga ttgtgccgaa cacagagcct accacacacc ggatctttcg ttttgagtg 1140  
 cacaagtggg atggtgccgc cggcaaacgg gcccggtgca agcgtgccgc caaaagtgag 1200  
 aaagactcgg cttccaccct caaggttgcc cgaccgactt ccaccagtgg aatcgtcacc 1260  
 tactccccac ctgccgacgg gtcttggtg tggcatgccc ttgccgccat actgaaccgg 1320  
 atgattaata atgacttcac gtcccctctg cctcggtaaca acaggccgga ggacgattgg 1380  
 gcttctgatg gtgacctgac tcagccatt caatgttgca aactacctgc cgccatagct 1440  
 cggaaccgcg cctgccctaa cgccaatac ctcgtaaac tcaacggagt tcattgggag 1500  
 gtagaggtga ggcctggaat ggctcctcgc tccctctctc gtgagtgcgt tgttgccgctc 1560  
 tgctctgaag gctgtgtcgc gtcgccttac cgggagcag ggtgcctaa acgtgcactt 1620  
 gaggcctcgg cgtctgctta tagactgcct tcagactgtg tttgtgatgg tattattgac 1680  
 ttcttgcca atccacctcc ccaggagttc tggactcttg acaaaatgtt gacttccccg 1740  
 tcaccggagc agtccggctt ctctagtctg tataaattgt tgttagaggt cttgccgcag 1800  
 aaatcgcatg ccacagaagg ggaattcacc tatactgttg agaggatgtt gaaggattgt 1860  
 ccgagctcca aacaggccat ggcctcctt gcaaaaatta aggtcccatc ctcaaaggcc 1920  
 ccatccgtga ctctgaacga gtgcttcccc acggatgttc cagtcaactc tgagttaata 1980  
 tcttggaag agcccaaaga ccctggcgct gctgttctcc tatgtccatc ggatgcaaaa 2040  
 gaatctaagg aaacagcccc tgaagaagct caagcgagaa accgtaaggt cctccaccct 2100  
 gtggtcctta ccgaggaact tagcgagcaa caggtgcagg tggttgaggg tgatcaggat 2160  
 atgccactgg atttgacttg gccaacctta accgctacgg cgaccctgt tagagggccg 2220  
 gtaccggaca atttgagctc tggcattggt gccagcccg ctaccgttca agaactcatt 2280  
 ctggcgaggc ctgcaccccg tcttggtgag cgctgtggca cggagtcgaa cggcagcagt 2340  
 tcatttctgg atttgcctga cgtgcagacc tggaccagc ctttagacct gtccctggcc 2400  
 gcgtggcctg taagggctac cgcgtctgac cccggttga tccacggtag gcgtgagcct 2460  
 gtctttgtga agcctcgagg tgttttctct gatggcgagt cggcccttca gttcggagag 2520  
 cttccgaag ccagttctgt cgtcgatgac cggacaaaag aagctccggt ggttgacgcc 2580

ES 2 692 809 T3

cccatcgatt tgacaacttc gaacgagacg ctctctgggt ctgaccctt tgaattcgcc 2640  
 aaattcaggc gcccgcggtt ctccgcgcaa gctttaatcg accgaggtgg tccgcttgcc 2700  
 gatgttcagc caaagataaa gagtcgggta tatgaacaat gccttcaagc ttgtgaacct 2760  
 ggtagtcgtg cgaccccgac caccaagaag tggctcgaca aaatgtggga caggggtggac 2820  
 atgaaaactt ggcgctgcac ctgcgagttc caagctggtc acattcttga gtccctcaaa 2880  
 ttctccctg acatgattca agacacaccg cctcctgttc ccaggaagaa ccgagctggt 2940  
 gacagtgccg gcctgaagca actggtggcg cagtgggata ggaaattgag tgtgacaccc 3000  
 cccacaaaac cggttggacc ggtgcttgac cagaccgtcc ctctgcctat ggacatccag 3060  
 caagaagatg ccatctccgc tgacaagcca cccattcgc aaaacccttc tagtcaagta 3120  
 gatgtgggtg gaggttgaa aagttttatg ctctccggca cccgtttcgc ggggtccgtt 3180  
 agtcagcgcc ttacgacatg ggtttttgag gttctctccc atctcccagc ttttatgctc 3240  
 acacttttct cgccacgggg ctctatggct ccaggtgatt ggctgtttc aggtgctggt 3300  
 ctacttgctc tcctgctctg ccgttcttac ccaatactcg gatgccttcc cttattgggt 3360  
 gtcttttctg gttctgtgcg gtgtgttcgt ttgggtggtt ttgggtcttg gatggctttt 3420  
 gctgtatttt tattctcgac tccaccgac ccagtcgggt cttcttctga ccacgattcg 3480  
 ccggagtgtc atgctgagct tttggctctt gagcagcgcc aactttggga acctgtgcgc 3540  
 agccttgttg tcgggccatc gggcctctta tgcgtcattc ttggcaagtt actcgggtggg 3600  
 tcacgttgtc tctggtttgt tctcctacgt atatgcatgc tcgcagattt ggcaatttct 3660  
 cttatttatg tgggtgcca agggcgttgt cacaagtgtt ggggaaagtg tataaggacg 3720  
 gctcctgcag aagtgaccct taatgtgttt cttttttcgc gcgccaccog ctcatctctt 3780  
 gtgtccttgt gtgatcgggt ccaagcgcca aaaggagtgg accccgtgca cttggcgaca 3840  
 ggctggcgcg ggtgctgggt tgggtgagagc cctattcatc aatcacacca aaaaccgata 3900  
 gcttatgcca acttggatga aaagaagata tccgccaga cgggtattgc tgtcccgat 3960  
 gatcccagtc aggccattaa atgcctgaaa gttttgcagg caggaggggc tattgtggac 4020  
 cagcctacgc ccgaggtcgt ccgtgtgtct gagattccct tctcggcccc attttttccg 4080  
 aaggtcccag tcaaccgaga ttgcagggtt gtggtagatt cggacacttt tgtggctgcg 4140  
 gtccgctgcg gttattcgac agcacaactg gtccctggtc ggggcaactt tgccaagcta 4200  
 aatcagaccc ccctcaggaa ctctgtcccc accaaaacaa ctgggtggggc ctcatacacc 4260  
 cttgcgctgg ccaggtatc tgtgtggact cttgttcatt tcatcctcgg cctttggtta 4320  
 acgtcacctc aagtgtgtgg tcgagggacc tctgaccctg ggtgttcgaa ccctttttcg 4380  
 taccctactt atggccccg agttgtgtgt tctctctgac tctgcgtgct tgcgcgagga 4440  
 gttaccctgc cattgttctc agccgttgcc catctttccg gtagagaggt ggggattttt 4500

ES 2 692 809 T3

attttggtgc ttgcctcctt gggcgcttta gccaccgct tggctcttaa ggcagacatg 4560  
 tcaatggtct ttttggcggt ttgtgcttac gcctggccca tgagctcctg gttaatttgc 4620  
 ttctttccta tgctcttgag gtgggtaacc cttcatcctc tcactatgct ttgggtgcac 4680  
 tcatttttgg tgttttgcct accagctgcc ggcgttctct cgctgggaat aaccggtcct 4740  
 ctttgggcag ttggccggtt caccaggtt gccggaatta tcacacctta tgacatccac 4800  
 cagtatacct ccggaccacg tggcgcagct gctgtagcaa cgctccaga aggtacttac 4860  
 atggcgccg ttoggagagc cgctttgact ggacggactt tgatcttcac accatctgca 4920  
 gtcgatccc ttcttgaag tgctttcaga actcaaaagc cctgccttaa caccgtgaat 4980  
 gtcgtaggct cttcccttgg ttctggagga gttttcacca ttgatggcag aagagtcatc 5040  
 gtcactgccca cccatgtgtt gaatggtaac acagccaggg tcactggtga ttcctacaac 5100  
 cgcatgcaca cgttcaatac taatggtgat tatgcctggt cccatgctga tgactggcaa 5160  
 ggcgttgccc ctatggttaa gatcgctaag gggtatcgcg gtcgtgccta ctggcaaacg 5220  
 tcaaccggag tcgaacctgg catcatgggg gaaggattcg ccttctgttt cactaactgt 5280  
 ggcgactcag ggtcacctgt catttcagaa gctggtgacc ttattggagt ccataccggt 5340  
 tcaaacaaac tcggttctgg tcttgtgaca acccctgaag gggagacctg ctccatcaag 5400  
 gaaactaggc tctctgacct ttctagacat tttgcaggtc caagcgtccc tcttggggac 5460  
 attaagtga gccagccat catccctgat gtgacaacta ttccgagtga cttggcatcg 5520  
 ctccctgctt ctgtccccgt gatggaagg tggcctctcaa ctgtccagct tttgtgcgtc 5580  
 tttttccttc tctggcgcat gatgggccat gcctggacac ccattgttgc cgtaggcttc 5640  
 tttttgctga atgaaattct cccagcagtc ttggccgag ctgtgttctc ttttgcactc 5700  
 tttgtacttg catgggccac cccctggctg gcacaagtgt tgatgattag actcctcacg 5760  
 gcggtctca accgcaacag gttgtccctg gcgttctacg cactcggagg tgcgttggc 5820  
 ctggccacag aaatcgggac ttttctggt ggatggcctg aactgtccca agccctctcg 5880  
 acatactgct tctgcccag gttccttgct gtgactagtt atgtcccac catcatcatc 5940  
 ggtgggctcc atgccctcgg cgtaattttg tggttattca aataccgatg cctccacaac 6000  
 atgctggttg tgatgggag tttctcaagc gctttcttcc tacggtattt tgctgagggt 6060  
 aatcttagga aaggcgtgtc gcagtcctgt ggcatgaata acgaatccct gacagctgct 6120  
 ttggcttgca agttgtcgca agctgacctt gattttttgt ccagtttaac gaacttcaag 6180  
 tgctttgtgt ccgcttcaaa catgaaaaat gcagctggcc aatacatcga ggcggcgtat 6240  
 gctagagctc tgcgctcagga gctggcctcc ttggttcagg ttgacaagat gaaaggagta 6300  
 ttggccaagc tcgaggcttt cgctgagacg gccactccgt cacttgacac aggtgacgtg 6360

ES 2 692 809 T3

attgttctgc ttgggcaaca ccccatgga tccatcctcg acattaatgt ggggggtgaa 6420  
 aggaaaactg tgtctgtgca agaaacacga tgcctgggtg gttccaaatt cagtgtctgc 6480  
 actgtcgtgt ccaacacgcc cgtggatacc ttgaccggca tcccacttca gacgccaaacc 6540  
 ccactttttg aaaatggccc ggcctatcgc agcgaggacg acgaccttaa agttgagaga 6600  
 atgaaaaaac actgtgtatc cctcggcttc cacaaaatca atggtaaagt ttactgcaaa 6660  
 atttgggaca agtctaacgg cgacaccttt tacacggatg attcccgata cactcaagac 6720  
 catgcttttc aggacaggtc aaccgactat agagacaggg attatgaagg tgtacagacc 6780  
 gcccccaac agggattcga tccaaagtcc gaagcccctg ttggcactgt tgtaatcggc 6840  
 ggcattacgt ataacaggca tctggcaca ggtaaggagg tcctagtcc caaacctgac 6900  
 aactgccttg aagctgccag actgtccctt gagcaagctc ttgctgggat gggccaaact 6960  
 tgtgacctta cagctaccga agtggagaaa ctaaagcgca tcattagtca actccaaggt 7020  
 ctgaccactg aacaggcttt aaactgctag ccgccagcgg cttgaccgcg tgtggccgcg 7080  
 gcg 7083

<210> 28  
 <211> 4392  
 <212> DNA  
 <213> Virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino

5

<400> 28

acaggcttta aactgctagc cgccagcggc ttgaccogct gtggccgcgg cggcctagtt 60  
 gtaactgaaa cggcggtaaa aatcgtaaaa taccacagca gaactttcac cttaggctct 120  
 ttagacctaa aagtcacctc cgaggtggag gtgaagaaat caactgagca ggggcacgct 180  
 gtcgtggcga acttatgttc cgggtgctgc ttgatgaggc ctcaccacc gtccttgtt 240  
 gacgttctcc tcaaaccgag acttgacaca acaccggca ttcaaccagg gcatggggcc 300  
 gggaaatagg gcgtgaacgg ttctatttgg gattttgaaa ctgcaccac aaagtagaa 360  
 ctagagttgt ccaagcaaat aatccaagca tgtgaagtca ggcgcgggga cggccctaac 420  
 ctccaactcc cctacaagct ttatcctgtc aggggggacc ccgagcggcg taaaggtcgc 480  
 cttgtcaaca ctaggtttgg agatttacct taaaaactc cccaagacac caagtccgca 540  
 attcatgagg cttgttgctt gcatcccaat ggggtcctcg tgtctgatgg taaatccacg 600  
 ctgggtacca ctcttcaaca tggtttcgag ctttatgtcc cactgtacc ttatagtgtc 660  
 atggaatacc ttgattcacg ccctgacacc ccttttatgt gtactaaca tggcacttcc 720  
 aaggctgctg cagaggacct caaaaatat gacctatcca ctcaagggtt tgtcttgctt 780  
 ggggtcctac gcctagtgcg caggttcatc tttagccatg ttggtaaggc gccaccactg 840  
 ttccttccat caacctacc tgccaagaac tccatggcag gggcfaatgg ccagaggttc 900

10

ES 2 692 809 T3

ccaacaaag atgtccagag catacctgaa attgatgaaa tgtgccccg tgcctcaag 960  
 gaaaattggc agactgtgac accttgacc ctcaaaaaac agtactgttc caaacctaaa 1020  
 actagaacca tcctaggtac caacaacttc atagccttgg ctcacaggtc agcactcagt 1080  
 ggtgtcacc aggcgttcat gaagaaggcc tggaaagccc caattgcctt ggggaaaaac 1140  
 aagtttaagg aattgcattg cactgtcgcc ggcagatgcc ttgaggctga cctggcttcc 1200  
 tgcgatcgca gcacccccgc cattgtgagg tggtttgttg ccaacctcct gtatgaactt 1260  
 gcaggatgtg aagagtactt gcctagctac gtgctcaact gttgccatga ccttgtggca 1320  
 acgcaggatg gcgctttcac aaaacgaggc ggcctgtcgt ccggggaccc cgtcaccagt 1380  
 gtgtccaaca ccgtctactc actgataatt tacgccagc acatggtgct ttcggccttg 1440  
 aagatgggtc atgaaattgg tctcaagttc cttgaggaac agctcaaatt tgaggacctt 1500  
 cttgaaatcc agccccatgt agtgtattct gatgacctcg tcttgtatgc ggaaagaccc 1560  
 acttttccca actaccattg gtgggtcgag catcttgacc tgatgttggg ctttaaaacg 1620  
 gacccaaaga aaactgtcat aactgataaa ccagttttc tcggctgcag aattgaagca 1680  
 ggacggcagt tagtcccaa tcgcgaccgt attctggctg ctcttgcata tcatatgaag 1740  
 gcgcagaacg cctcagagta ttatgcgtcc gctgccgcaa ttctgatgga ttcgtgtgct 1800  
 tgcattgacc atgacccccg gtggatgag gaccttatct gcggcatcgc ccggtgtgct 1860  
 cgccaggacg gttaccgttt tccagccccg gcatttttca tgtccatgtg ggagaagctg 1920  
 aaaagtcata acgaagggaa gaaatgccgt cactgcggca tctgcgacgc caaagccgac 1980  
 tatgcgtccg cctgtggact tgatttgtgt ttgttccatt cacactttca tcaaacctgc 2040  
 ccagtcactc tgagctgtgg ccaccatgcc ggttcaaagg aatgttcgca gtgtcagtca 2100  
 cctgtcgggg ctggcaaatc ccccttgac gctgtgctga aacaaatccc gtacaaacct 2160  
 cctcgtacca ttatcatgaa ggtggacaac aaaacaacga cccttgaccc ggaagatat 2220  
 cagtcctcgc gaggtcttgt tgcagtcaaa agaggattg caggtaatga ggttgcctt 2280  
 tctgatggag actaccaagt ggtgcctctt ttgccgactt gcaaagacat aaacatggtg 2340  
 aaggtggctt gcaacgtact actcagcaag tttatagtag ggccgccagg ttccggaaaa 2400  
 accacctgac tactgaacca agtccaggac gatgatgtca tttacacacc tactcatcag 2460  
 acaatgtttg acatagtcag tgctcttaaa gtttgcaggc attccatccc aggagcctca 2520  
 ggactccctt ttccaccacc tgccaggctc gggccgtggg ttaggctcat cgcagcggga 2580  
 catgtccctg gccgagtgtc atatctcgat gaggcaggat attgcaatca tctagacatt 2640  
 ctaaggctgc tttccaaaac accccttgtg tgtttgggtg accttcagca acttcaccgg 2700  
 gtcggctttg attcctattg ttatgtgttc gatcagatgc ctcagaagca gctgaccacc 2760  
 atttatagat ttggccctaa catctgtgca gccatccagc cttgttacag ggagaaactt 2820

ES 2 692 809 T3

gaatccaagg ccaggaacac cagagtggtt ttcaccaccc ggcctgtggc ctttggtcag 2880  
 gtcctgacac cgtaccacaa agatcgtacc ggctctgcaa taactataga ttcattcccag 2940  
 ggggagacct tcgacattgt gacattgcat ctaccatcgc caaagtccct aaacaaatcc 3000  
 cgagcacttg tagccatcac tcgggcaaga catgggttgt tcatttatga ccctcatgac 3060  
 caactccagg agtttttcaa cttaaccccc gagcgcactg attgtaacct tgcggtcagc 3120  
 cgtgggggatg agctggttgt tttgaatgtg gataatggcg tcacaactgt agcgaaggcc 3180  
 ctagagacag gttcaccocg atttcgagta tcggaccoga ggtgcaagtc tctcttagcc 3240  
 gcttgttcgg ccagtctaga agggagctgc atgccactac cacaagtagc acataacctg 3300  
 gggttttact tttccccgga cagcccagct tttgcacccc tgccaaaaga gctggcgcca 3360  
 cattggccag tggtcaccca ccagaataat cgagcgtggc ctgatcgact tgtcgctagt 3420  
 atgcgcccaa ttgatgcccg ctacagcaag ccaatggctg gtgcagggtg tgtggtcggg 3480  
 ccatccattt ttcttggcac tcttgggtgt gtgtcatact atctcacatt atacatcggg 3540  
 ggcgagcctc aggccctgcc agaaactctc gtttcaacag gacgtatagc cacagattgt 3600  
 cgggaatata tcgacgcggc tgaggaagag gcagcgagag aacttcccca cgcatttatt 3660  
 ggcgatgtca aaggcactac ggtcgggggg tgtcaccaca ttacatcgaa atacctacct 3720  
 aggtccctgc ctaaagactc tgttgctgtg gttggggtga gttcgcccgg tagggctgct 3780  
 aaagccgtgt gactctcac cgatgtgtac ctccccgaac tccgaccata tttgcaaccg 3840  
 gagacggcat caaatgctg gaaacttaa ctggatttca gggatgttcg actgatggtc 3900  
 tggaaaggcg ccacagccta tttccagttg gaagggtga catggtcagc gctgcccgat 3960  
 tatgctaggt tcattcagct acccaaggat gccgttgtgt acatcgatcc gtgtataggg 4020  
 ccggcaacag ccaatcgcaa ggttgtgcga accacagact ggcgggccga cctggcagtg 4080  
 acaccgtatg attacggtgc tcaggtcatt ttgacaacag cctggttcga ggaccttggg 4140  
 ccgcagtgga agatthtggg gttgcagcct ttcagacgaa catttggctt tgagaacct 4200  
 gaagattggg caattctcgc acgccgtatg aatgacggca aagattacac tgactataat 4260  
 tggcattgtg tacgagaacg cccacacgca atttacgggc gcgcccgtga ccatacgtat 4320  
 cattttgcc ttggcactga actgcaagta gagctgggca gacccccgct gcctcctgag 4380  
 caagtgccgt ga 4392

<210> 29

<211> 750

5 <212> DNA

<213> Virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino

<400> 29

10 atgcaatggg ttcactgtgg agtaaaatca gtcagttggt cgtggatgcc ttcactgagt 60

ES 2 692 809 T3

tccttgtag tgtggtgac attgtcatct ttctcgccat attgtttggg ttcactgttg 120  
 caggctgggtt attggtcttc cttctcagag tggtttgctc cgcgtttctc cgttcgcgct 180  
 ctgccattca ctctcccga ctatcgaagg tcctatgagg gcttgctacc caactgcaga 240  
 ccggtatgcc cacaattcgc agttaagcac ccgttgggta tactttggca tatgcgagtc 300  
 tcccacctaa ttgacgaaat ggtctctcgc cgcatttacc ggaccatgga acattcgggt 360  
 caagcggcct ggaagcaggt tgtagtgaa gccactctca caaaactgtc aaggcttgac 420  
 gtagtcactc attccaaca cctggccgca gtggaggctg attcttgccg cttccttagc 480  
 tcacgactcg cgatgctgaa aaaccttgcc gttggcaatg tgagcctgga gtacaacact 540  
 actttggacc gcgttgagct catctttccc acaccaggta cgaggcccaa gttgaccgat 600  
 tttaggcaat ggcttatcag cgtgcacgct tccatcttct cctctgtggc ttcgtctggt 660  
 accttgttca cagtgccttg gcttcgaatt ccagctctac gctatgtttt tggtttccat 720  
 tggcccacgg caacacatca ttcgaactaa 750

<210> 30  
 <211> 798  
 <212> DNA  
 <213> Virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino

5

<400> 30

atggcttatc agcgtgcacg cttccatctt ctctctgtg gcttcgtctg ttaccttgtt 60  
 cacagtgctt tggtctcga ttccagctct acgctatggt tttggtttcc attggcccac 120  
 ggcaacacat cattcgaact aactatcaat tacaactat gtaagccatg ccctaccagt 180  
 caagctgccc aacaaagact cgagcctggc cgtaacgtgt ggtgcaaaat agggcacgac 240  
 aggtgtgagg aacgtgacca tgatgagttg tcaatgtcca ttccgtccgg gtacgacaac 300  
 ctcaaacttg agggttatta tgcttggtg gcttttttgt ccttttccta cgcggcccaa 360  
 ttccatccgg agctgttcgg aataggaaac gtgtcgcgcg tctttgtgga taagcgacac 420  
 cagttcattt gcgccgagca tgatggacaa aattcaacca tatctgccag acacaacatc 480  
 tccgcgtcgt atgcgggtga ttaccatcat caaatagacg ggggcaattg gtttcatttg 540  
 gaatggctgc gaccattctt ttctcctgg ctggtgctca acatctcatg gtttctgagg 600  
 cgttcgcctg caagccctgc ttctcgacgc atctatcaga tattaagacc aacacgaccg 660  
 cggctgcccg tttcatggtc cttcagaaca tcaattgtt ccaatctcac agggcctcaa 720  
 cagcgcaagg taccactccc ctcaggaggt cgtcccaatg tcgtgaagcc gtcggcattc 780  
 cccagtacat cacgataa 798

10

<210> 31  
 <211> 552  
 <212> DNA  
 <213> Virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino

15

<400> 31

ES 2 692 809 T3

atggctgga ccattctttt cctcctggct ggtgctcaac atctcatggt ttctgaggcg 60  
 ttcgcctgca agccctgctt ctcgacgcat ctatcagata ttaagaccaa cacgaccgcg 120  
 gctgccgggtt tcatggctcct tcagaacatc aattgtttcc aatctcacag ggcctcaaca 180  
 ggcgaagga ccaactcccct caggaggtcg tcccaatgtc gtgaagccgt cggcattccc 240  
 cagtacatca cgataacggc taatgtgacc gatgaatcgt atttgtacaa cgcggacttg 300  
 ctgatgcttt ccgcgtgcct tttctacgcc tcggaatga gcgagaaagg cttcaaagtc 360  
 atctttggga atatttctgg cgttgtttcc gcttgtgta atttcacaga ttatgtggcc 420  
 catgtgacc aacacactca gcagcaccat ttgtaattg atcacattcg gttactacac 480  
 ttcttgacac cgtctacgat gaggtgggct acaaccattg cttgtttgtt tgccattctt 540  
 ttggcggtat ga 552

<210> 32

<211> 606

5 <212> DNA

<213> Virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino

<400> 32

atgaaatggt cttgcaagtt ggggcatttc ttgactcctc actcttgctt ctggtggctt 60  
 tttttgctgt gtaccggctt gtcttggctc tttgtcgatg gcaacgacaa cagctcgaca 120  
 tcccaataca tatataatth gacgatatgc gagctgaatg ggaccgaatg gttgtccgggt 180  
 cttttgatt gggcagtcga aacctttgtg ctttaccag ttgccactca tatcatttca 240  
 ctgggttttc tcacaacaag ccatttcctt gatgcgctcg gtctcggcgc tgtgtccgcc 300  
 acaggattca ttggcgagcg gtatgtactt agcagcatgt acggcgtttg cgccttcgcg 360  
 gcgctcgtat gttttgtcat ccgtgctgct aaaaattgca tggcttgccg ctatgcccg 420  
 acccggttta ccaacttcat cgtggacgac cggggaagaa tccatcgatg gaagtcttca 480  
 atagtgggtg agaaattggg caaagctgaa gtcggtggtg accttgtcaa cattaagcat 540  
 gttgtcctcg aaggggttaa agctcaacct ttgacgagga cttcggctga gcaatgggaa 600  
 10 gcctag 606

<210> 33

<211> 522

<212> DNA

15 <213> Virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino; Nucleótido que codifica el ORF6 DE PRRSV 94881 atenuado

<400> 33

atgggaagcc tagacgactt ttgcaacgat cccaccgccg cacaaaaact cgtgctggcc 60

20



ES 2 692 809 T3

tttagcatca catatacacc cataatgata tacgccctta aggtgtcacg cggccgactc 120  
 ctggggctgt tgcacatcct gatatttctg aattgttcct ttacttttgg gtacatgaca 180  
 tatgtgcatt ttcaatccac caaccgtgtc gcaactcactc tgggggctgt agtcgccctt 240  
 ttgtggggtg tttacagcct cacagagtca tggaagttca tcaacttcag atgcagattg 300  
 tgttgccctag gccggcgata cattctggcc cctgcccac acgtagaaag tgctgcaggc 360  
 ctccattcaa tcccagcgtc tggttaaccga gcatacgtg tgagaaagcc cggactaaca 420  
 tcagtgaacg gcaactctagt acctgggctt cggagcctcg tgctgggcgg caaacgagct 480  
 gttaaacgag gagtgggtaa cctcgtcaag tatggccggt aa 522

<210> 34

<211> 387

5 <212> DNA

<213> Virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino

<400> 34

atggccggta agaaccagag ccagaagaaa agaagaaatg cagctccgat ggggaaaggc 60  
 cagccagtca atcaactgtg ccagttgctg ggtacaatga taaagtccca gcgccagcaa 120  
 tctaggggag gacaggccaa aaagaagaag cctgagaagc cacatthttcc cctagctgct 180  
 gaagatgaca ttcggcacca tctcaccag gccgaacggt ccctctgctt gcaatcgatc 240  
 cagacggctt tcaatcaagg cgcaggaact gcgtcgcttt catccagcgg gaaggtcagt 300  
 ttccaggttg agttcatgct gccggttgct catacagtgc gcctgattcg cgtgacttct 360  
 10 acatccgcca gtcaggggtgc aaattaa 387

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) de un tipo europeo, que es de la cepa depositada en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) con el número de acceso ECACC 11012502.
- 5 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho PRRSV se atenúa pasándolo al menos 36 veces por cultivo celular de forma que cuando el virus modificado se administre a un cerdo u otro mamífero propenso al PRRSV fracase en producir signos clínicos de enfermedad por PRRSV, pero pueda inducir una respuesta inmunitaria que inmunice al mamífero contra formas patógenas de PRRSV.
3. La composición según la reivindicación 1 o 2, que está en forma liofilizada.
- 10 4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha composición se formula para permitir la administración de  $10^1$  a  $10^7$  partículas virales por dosis, o en donde dicha composición comprende al menos aproximadamente  $10^7$  partículas virales.
5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende, además, uno o más patógenos atenuados o inactivados no PRRSV o material antigénico de los mismos.
- 15 6. La composición según la reivindicación 5, en la que dichos patógenos no PRRSV se seleccionan del virus de la seudorrabia, virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible, *Escherichia coli*, *Erysipelas rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
- 20 7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además un adyuvante, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en MCP-1,  $\alpha$ -tocoferol (por ejemplo, acetato de  $\alpha$ -tocoferol), fracciones de *Haemophilus sonnus*, carbopol y combinaciones de los mismos.
8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso como una vacuna.
9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en un método de
- 25 - tratamiento o reducción de la gravedad de la infección por virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV),
- prevención de la infección por PRRSV,
- inducción de la producción de una respuesta de anticuerpos al virus PRRS, y / o
- disminución de la gravedad de uno o más síntomas clínicos asociados con la infección por PRRSV, en donde dichos uno o más síntomas clínicos se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en lesiones pulmonares,
- 30 anorexia, decoloración de la piel, letargo, signos respiratorios, lechones momificados, tos, diarrea, y combinaciones de los mismos.
10. La composición según la reivindicación 7 para uso en un método de
- reducción del porcentaje de lesiones pulmonares en al menos 50% en comparación con los animales que no reciben la composición inmunogénica en combinación con dicho adyuvante,
- 35 - reducción de la viremia en animales en al menos 45% en comparación con los animales que no reciben la composición inmunogénica en combinación con dicho adyuvante.
11. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que dicho método incluye la etapa de administrar una cantidad terapéutica de un antígeno de PRRSV a
- un lechón de tres semanas de vida o menos,
- 40 - un cerdo de entre aproximadamente 3 semanas y 4 semanas de vida.
- un cerdo de entre aproximadamente cuatro semanas y dieciséis semanas de vida, en el que dicho cerdo tiene opcionalmente de cinco semanas a seis semanas de vida o de nueve semanas a quince semanas de vida o de siete semanas a diez semanas de vida, o
- un cerdo de más de dieciséis semanas, en el que dicho cerdo de más de dieciséis semanas es opcionalmente una
- 45 cerda joven o una cerda adulta.
12. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que la composición debe administrarse

- en dosis de 1 ml para cerdos y 2 ml para cerdas mediante inyección intramuscular, y / o
- en una sola dosis.

5 13. Un producto de vacuna, que comprende en recipientes separados una composición liofilizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un disolvente para reconstitución, y opcionalmente que contiene además un prospecto o etiqueta que comprende instrucciones de uso.

14. El producto de vacuna de la reivindicación 13, en el que

- el disolvente se selecciona del grupo que consiste en agua, solución salina fisiológica, o tampón, o un disolvente adyuvante, y/o

- en el que el disolvente contiene un adyuvante.

10 15. Una composición proteica que comprende

- una proteína que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 7,

o

- las proteínas que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

15 16. Un ácido nucleico aislado que comprende

- la secuencia de SEQ ID NO: 24,

o

- las secuencias de SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; y SEQ ID NO: 26.

20 17. Un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica

- (i) el ORF de PRRSV de la SEQ ID NO: 7 operativamente unido a un promotor,

o

- (ii) los ORF PRRSV de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, y SEQ ID NO: 9 operativamente unido a un promotor.

25 18. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 17, en el que

- (i) dicha secuencia de ácido nucleico que codifica dicho ORF es la SEQ ID NO: 24,

o

- (ii) dicha secuencia de ácido nucleico que codifica dichos ORF comprende la SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; y SEQ ID NO: 26.

30

FIG 1A

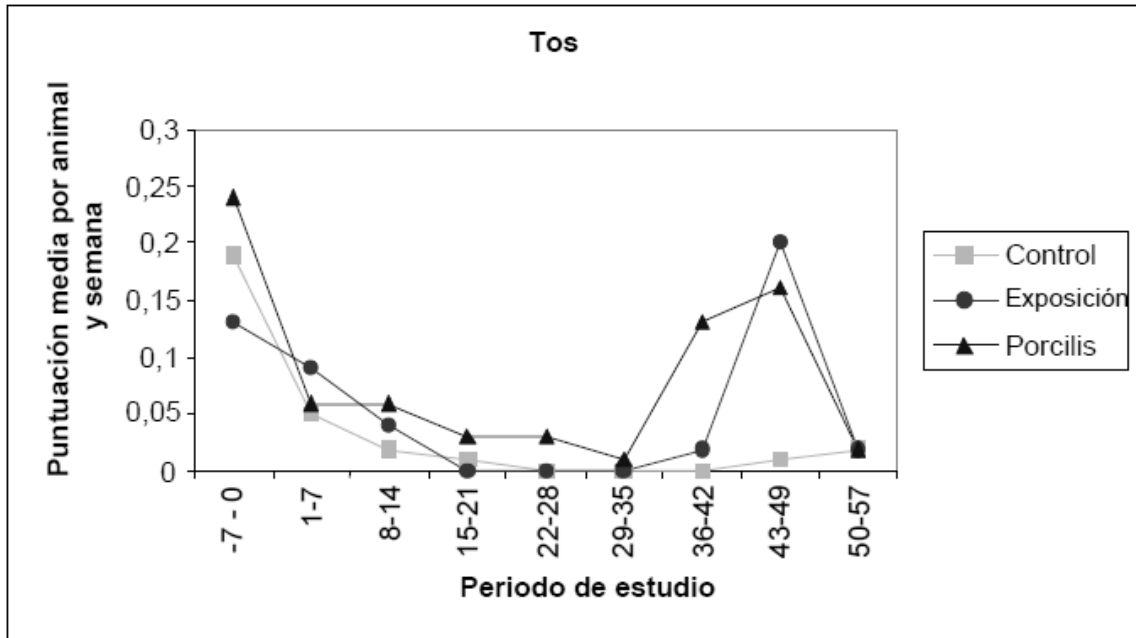


FIG 1B

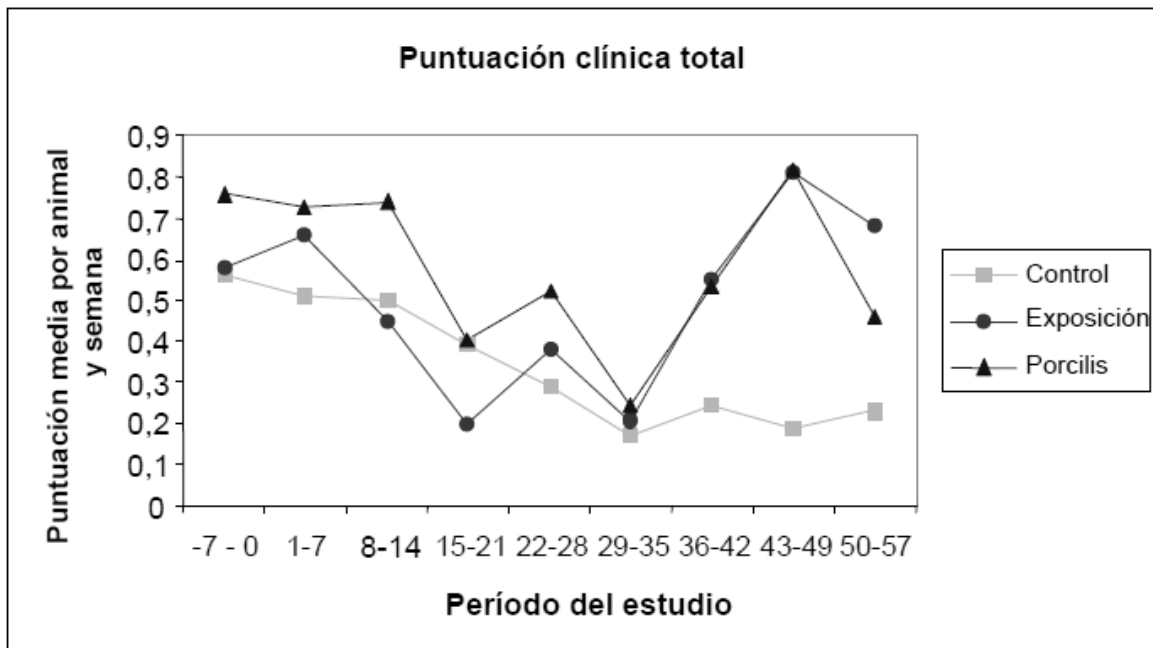


FIG 2

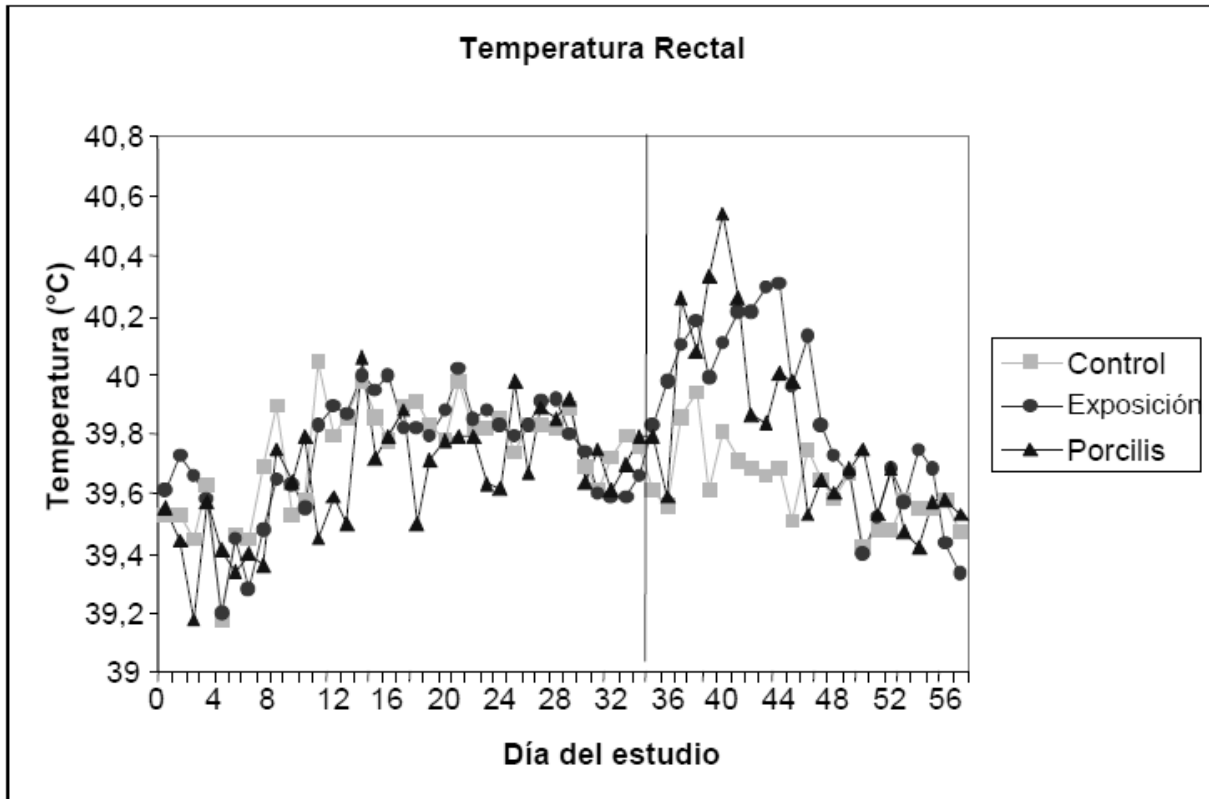


FIG 3

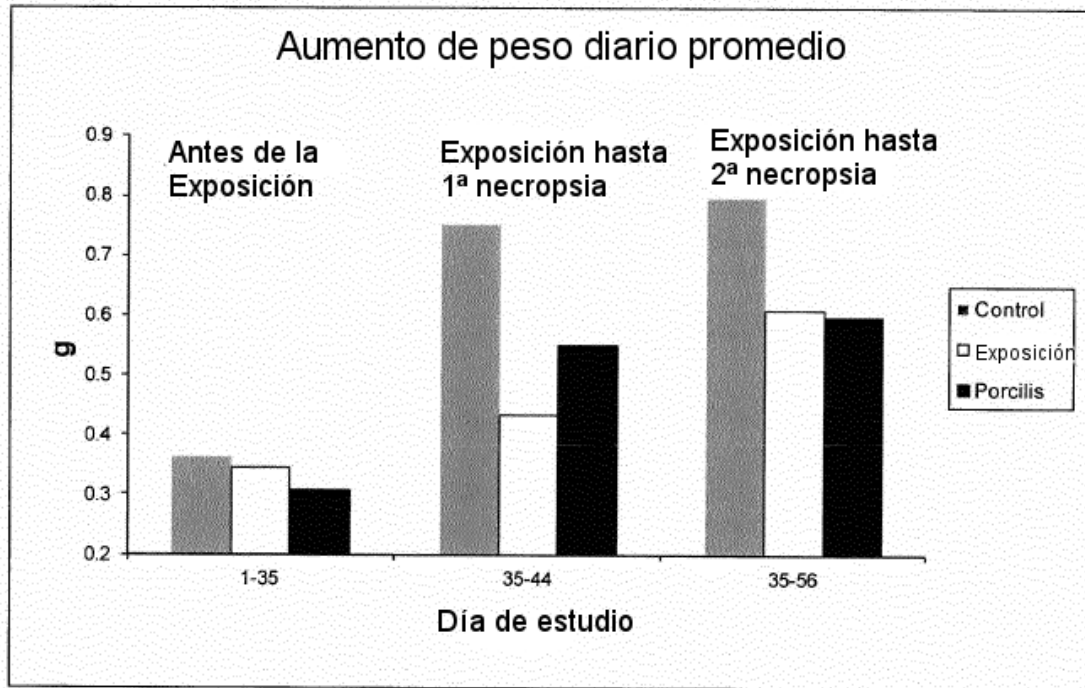


FIG 4

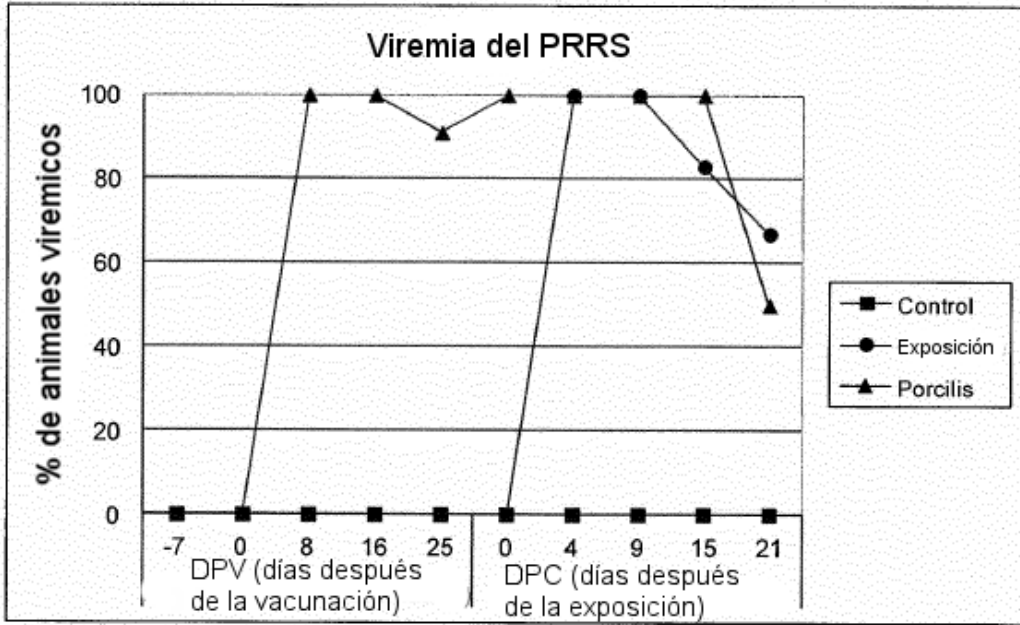


FIG 5

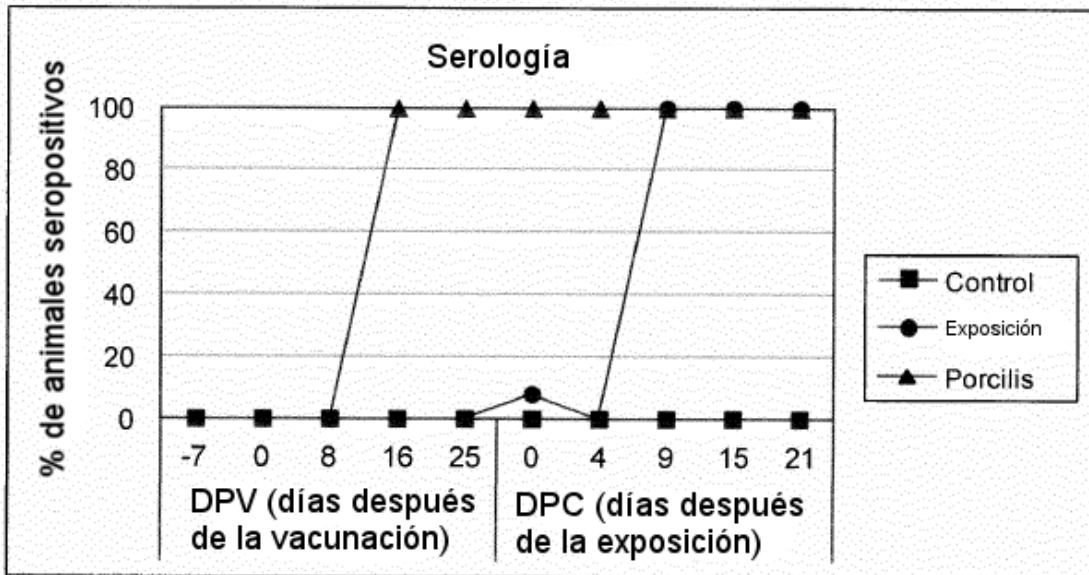


FIG 6

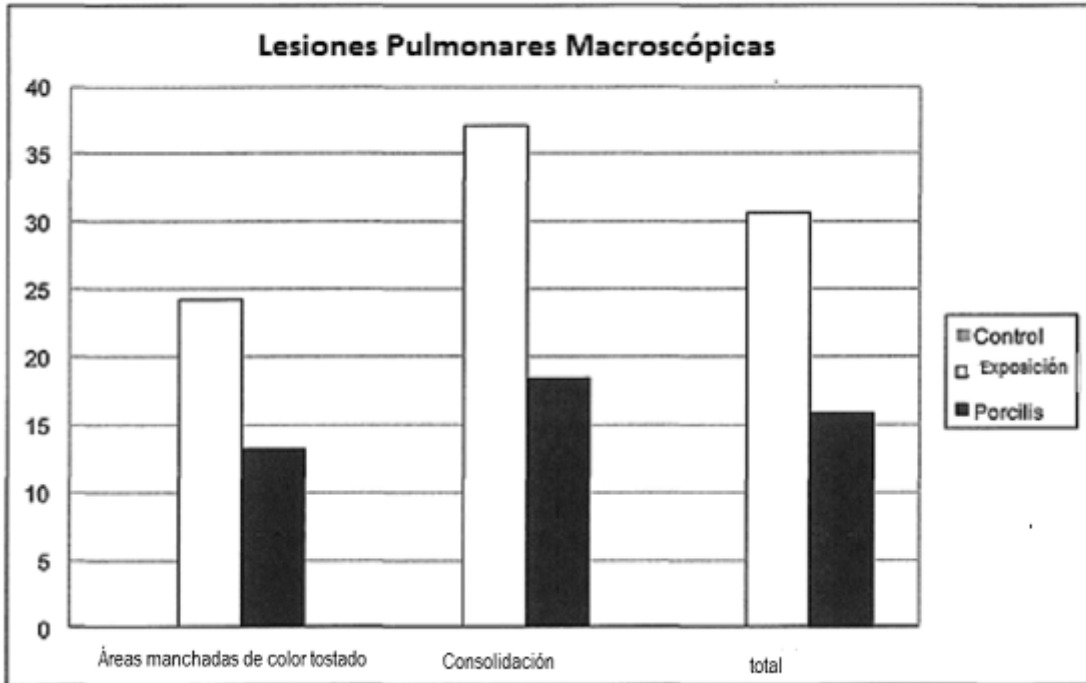




FIG 7A

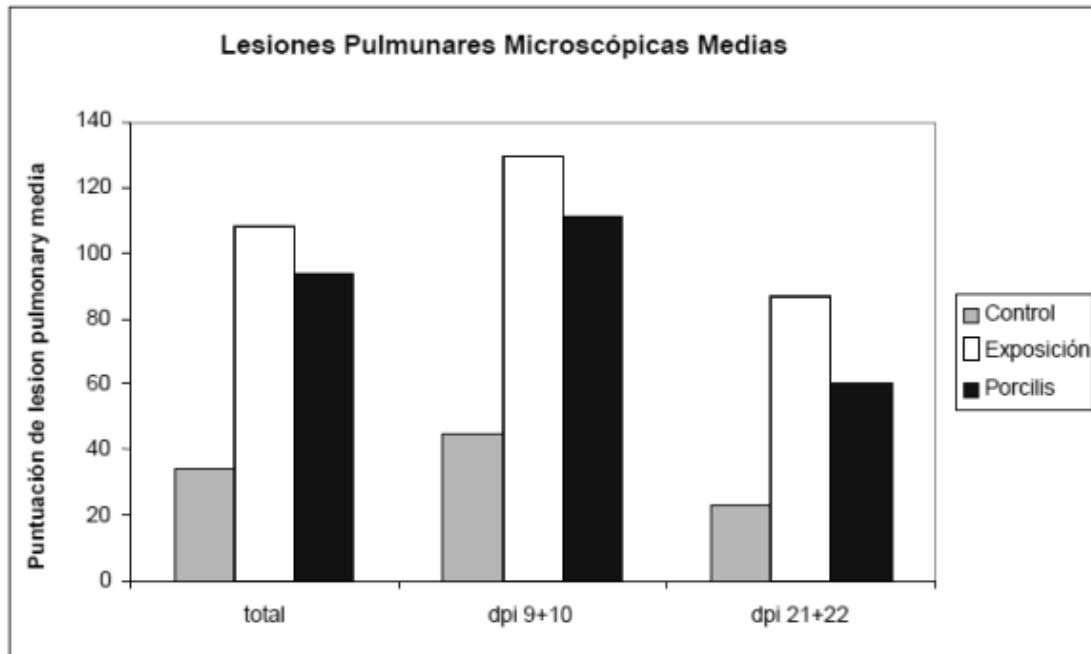


FIG 7B

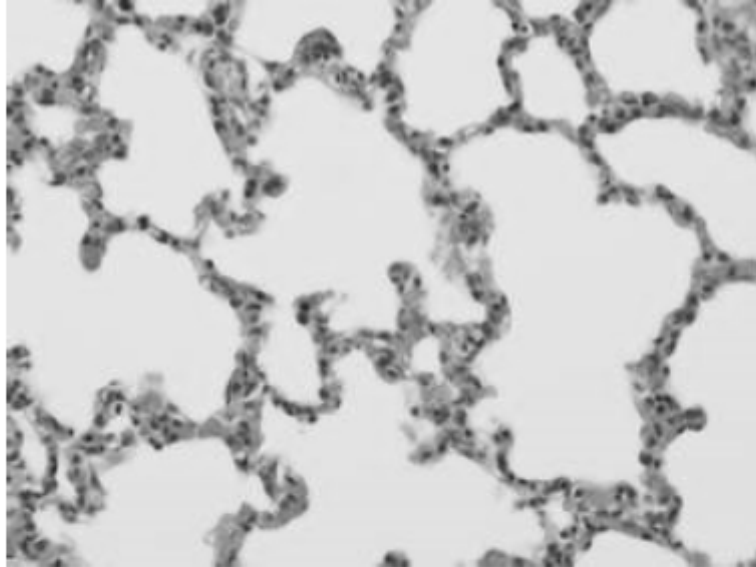


FIG 7C

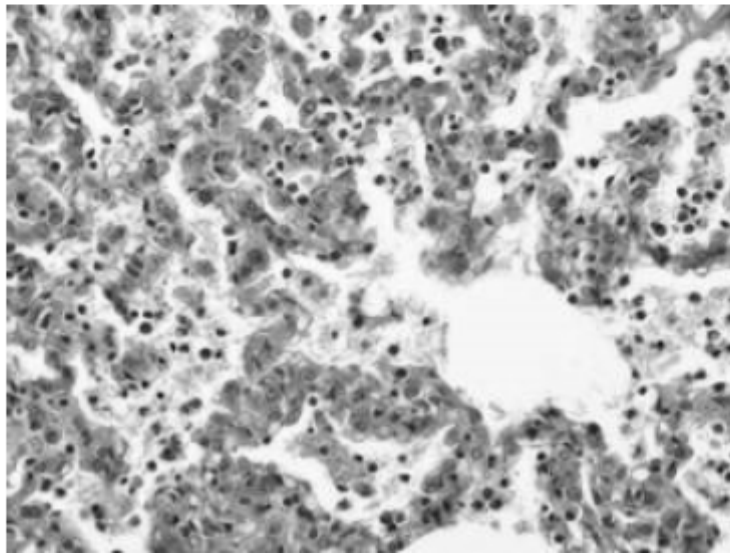


FIG 8

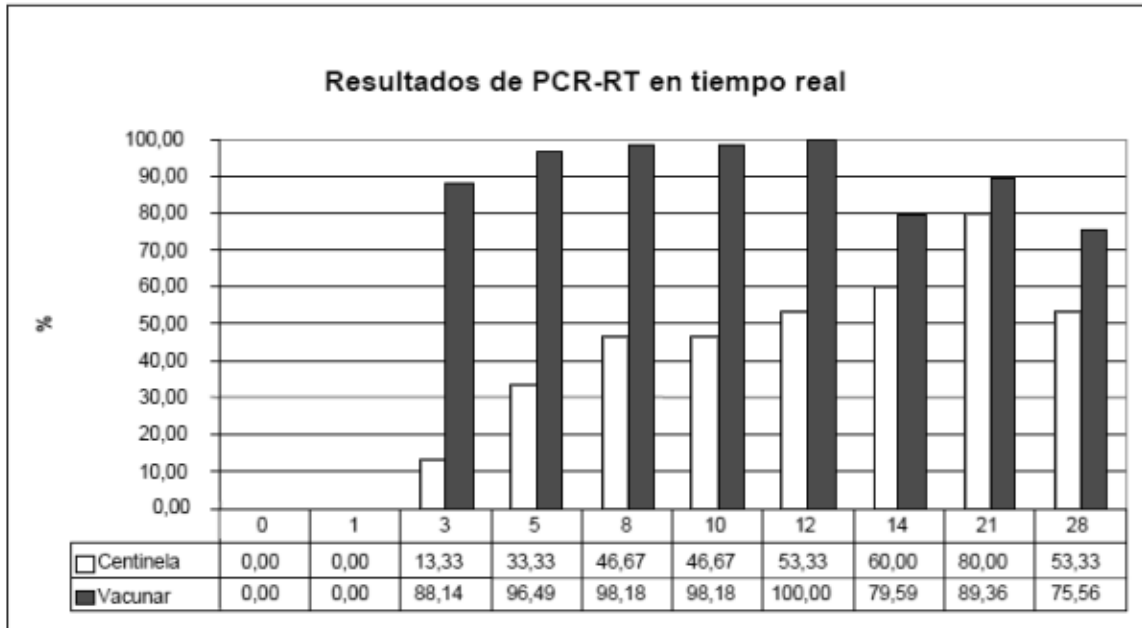


FIG 9

