

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 850**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)

**A61K 39/23** (2006.01)

**C07K 16/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2015 PCT/EP2015/058221**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015 WO15158798**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2015 E 15717159 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3132026**

54 Título: **Parvovirus porcino**

30 Prioridad:

**17.04.2014 EP 14165255**

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

**07.07.2020**

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)  
Wim de Körverstraat 35  
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**GUELEN, LARS;  
GROOF, AD;  
SCHRIER, CARLA CHRISTINA;  
DEIJS, MARTIN y  
HOEK VAN DER, CORNELIA MARIA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 771 850 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

## Parvovirus porcino

- 5 La presente invención se refiere a una vacuna basada en una proteína de un parvovirus porcino. La invención también se refiere a una prueba de diagnóstico para la detección del virus.

10 En las últimas décadas, en todo el mundo se observa un fuerte aumento en el consumo de carne de cerdo. Como consecuencia, se observa un aumento en el número y el tamaño de las granjas, con el fin de satisfacer las crecientes necesidades del mercado. Como se sabe por la cría de animales en general, un gran número de animales que viven juntos son vulnerables a todo tipo de enfermedades, incluso enfermedades apenas conocidas o vistas o incluso desconocidas antes de los días de la agricultura comercial a gran escala.

15 Una de las enfermedades en los cerdos que se conoce desde hace más de 60 años es el síndrome hemorrágico intestinal (SHI). Esta enfermedad se conoce como síndrome debido al hecho de que la causa de la enfermedad no está clara y la consistencia de los diversos signos clínicos no siempre está completamente clara.

20 El SHI es una enfermedad que ocurre en epidemias infrecuentes y explosivas. Los cerdos de rápido crecimiento de 4-6 meses de vida se ven afectados principalmente. En la mayoría de los casos, la enfermedad se observa en cerdos de engorde. Los cerdos mueren repentinamente sin evidencias de diarrea, aunque el grado de mortalidad varía <sup>(1-3)</sup>. Los datos de autopsias suizas, basados en más de 16000 cerdos, mostraron una incidencia de SHI del 2,66 %. En Estados Unidos, se ha documentado que el SHI causa el 0,5 % - 7 % de todas las muertes durante la fase de crecimiento-finalización <sup>(3)</sup>.

25 El síndrome hemorrágico del intestino no debe verse como una enfermedad única con una sola causa.

30 El síntoma más prominente del SHI son las hemorragias intestinales, a menudo acompañadas de vólvulo intestinal (torsiones del intestino). Sin embargo, estos síntomas también son una indicación de úlceras gástricas e ileítis, lo que complica el diagnóstico del SHI. Puede darse una rotación de todo el intestino, lo que provoca que la sangre se acumule y se estanque. El vólvulo intestinal puede observarse en hasta el 80 % de los casos de SHI<sup>(1-3)</sup>. Otros síntomas frecuentes de la enfermedad son las paredes intestinales delgadas y el líquido sanguinolento en los intestinos.

35 La etiología precisa del SHI no está clara. Tal como se ha indicado anteriormente, en lugar de tener una sola causa, La etiología del síndrome es probablemente multifactorial. El estrés, varios aspectos ambientales y de gestión pueden desempeñar un papel. Los factores de predisposición pueden incluir ejercicio vigoroso, la manipulación, las peleas, el apilamiento o la alimentación irregular. No hay evidencia concluyente de que un agente infeccioso (bacteriano o vírico) pueda causar SHI<sup>(1,3)</sup>, aunque *Clostridium sp.* y *E. coli* se han aislado de animales que padecen SHI. Los intentos de reproducir la enfermedad administrando contenido intestinal filtrado de animales que padecen SHI, por vía intravenosa u oral, a animales sanos fracasaron. Los intentos de reproducir la enfermedad por inoculación oral de *E. coli* y *Clostridium perfringens* tipo A aislados de cerdos infectados igualmente fracasaron. Por otro lado, se sabe que la frecuencia de la enfermedad se puede reducir en cierta medida mediante la administración de antibióticos en el alimento. Esto fortalece la idea de que la enfermedad es de hecho multifactorial: un efecto combinado de, por ejemplo, estrés y uno o más patógenos.

45 Es un objetivo de la presente invención proporcionar una vacuna para combatir el parvovirus porcino asociado al SHI. Además, es un objetivo de la presente invención proporcionar medios para detectar e identificar el agente infeccioso asociado a la enfermedad.

50 Recientemente, los cerdos diagnosticados de SHI fueron recolectados de varias granjas durante una epidemia de la enfermedad en México. Los cerdos afectados no tenían síntomas previos de enfermedad y murieron repentinamente, entre 2 y 6 horas después de los primeros síntomas de la enfermedad.

55 En la necropsia, los cerdos presentaron anomalías en el intestino delgado, entre otros, síntomas hemorrágicos, una pared intestinal delgada y fluidos con sangre en los intestinos. No se encontraron anomalías en otros órganos, a excepción de las observaciones de ganglios linfáticos rojos, agrandados e hinchados. La enfermedad se confirmó como SHI.

60 Se analizaron muestras de cerdos afectados necropsiados de varias granjas para detectar la presencia de virus y, sorprendentemente, se descubrió un nuevo virus en el 76 % de los animales. El hecho de que el virus no se detectase en todos los animales puede tener que ver con la cantidad de tiempo transcurrido entre la muerte de los animales y el momento en que fueron sometidos a la sección post mortem. Esto se puede concluir, entre otras cosas, del hecho de que las cantidades de virus encontradas por animal variaron en gran medida. Los inventores contemplan que en los cerdos en los que el virus aparentemente está ausente, esto probablemente se deba al hecho de que la cantidad de virus presente estaba en esos cerdos por debajo del nivel de detección en el momento del análisis. Además, el sitio de inicio de replicación del virus no se conoce para este nuevo virus y, por lo tanto, el sitio primario de replicación del virus después de la infección puede no haber sido muestreado.

- Dado que el nuevo virus se detectó en estos cerdos diagnosticados con SHI, el virus se denominará además virus asociado a SHI. El síndrome hemorrágico de intestino ahora se puede caracterizar por la presencia del nuevo virus en algún momento durante la enfermedad en órganos de animales que padecen SHI, en combinación con los siguientes síntomas clínicos: hemorragias intestinales, a menudo acompañadas de vólvulo intestinal, paredes intestinales delgadas y líquidos sanguinolentos en los intestinos.
- La secuencia del genoma vírico se analizó y reveló que el nuevo virus tiene algo, aunque un nivel relativamente bajo de semejanza con un género recientemente identificado de la subfamilia *Parvovirinae* dentro de *Parvoviridae*. Los parvovirus son virus de ADN monocatenario lineal no segmentado, con un tamaño promedio del genoma de 5000 nucleótidos y un tamaño en el intervalo de 18-26 nm de diámetro.
- La secuencia de ADN casi completa de un representante del nuevo parvovirus porcino se presenta en la SEQ ID NO: 10.
- El nuevo virus comprende dos grandes marcos de lectura abierta (ORF): el ORF1 que codifica la proteína no estructural 1 (NS1) que consta de 662 aminoácidos se encuentra en la posición 0134-2122 de la SEQ ID NO: 10 y ORF2 que codifica la proteína de la cápside (CP) que consta de 1189 aminoácidos se encuentra en la posición 2130-5699 de la SEQ ID NO: 10.
- Un ejemplo de la secuencia de ADN del ORF2, el gen que codifica la proteína de la cápside, se representa en la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 2 representa la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside. Un ejemplo de la secuencia de ADN del ORF1 que codifica la proteína no estructural NS1 se representa en la SEQ ID NO: 3. La SEQ ID NO: 4 representa la secuencia de aminoácidos de la proteína no estructural NS1.
- La subfamilia de Parvovirinae comprende actualmente 7 géneros <sup>(15)</sup>:
- 1) virus similar a PARV4
  - 2) Erythrovirus
  - 3) Bocavirus
  - 4) Dependovirus
  - 5) Amdovirus
  - 6) Parvovirus
  - 7) Un clado de parvo recientemente propuesto
- En este momento, se han identificado seis parvovirus diferentes que infectan a los cerdos:
- a) Parvovirus porcino clásico tipo 1 (PPV1), un miembro del género Parvovirus
  - b) Parvovirus porcino tipo 2 (PPV2), un miembro del género tipo virus PARV4
  - c) Parvovirus porcino tipo 3 (PPV3, también conocido como PARV4 porcino, hokovirus o partetravirus), también es miembro del género similar al virus PARV4
  - d) parvovirus porcino tipo 4 (PPV4), miembro del clado recientemente propuesto
  - e) parvovirus porcino tipo 5 (PPV5), también miembro del clado recientemente propuesto
  - f) bocavirus porcino (PBoV), un miembro del género Bocavirus
- Se sabe que PPV1 es el agente causal de SMEDI, un síndrome relacionado con la muerte fetal, momificación, muerte embrionaria e infertilidad. <sup>(4,5)</sup>
- No se sabe que PPV2 cause enfermedad como tal, pero se sugiere que sea un cofactor en el desarrollo de la enfermedad asociada al circovirus porcino (PCVAD) <sup>(6,7)</sup>.
- PPV3 tampoco se sabe que cause la enfermedad como tal, pero posiblemente también sea un cofactor en el desarrollo de la enfermedad asociada al circovirus porcino (PCVAD) <sup>(8-11)</sup>.
- PPV4 se aisló originalmente del tejido pulmonar de los cerdos. El tejido parecía estar coinfectado con circovirus porcino. No se sabe que cause enfermedad y tampoco se ha asociado de manera convincente con una enfermedad causada por otro patógeno <sup>(12-14)</sup>.
- Tampoco se sabe que PPV5 cause síntomas o lesiones y no está asociado con una enfermedad causada por otro patógeno <sup>(15-16)</sup>.
- El bocavirus porcino es un tipo relativamente nuevo de parvovirus porcino para el que la importancia clínica y la epidemiología aún no han sido exploradas <sup>(17)</sup>.
- Las secuencias de aminoácidos de ORF1 y ORF2 del nuevo virus se usaron para hacer árboles filogenéticos basados en el método de máxima verosimilitud, el modelo de corrección de Poisson y el análisis bootstrap (500 repeticiones).
- Estos árboles se hicieron usando el programa MEGA, versión 5, utilizando la configuración estándar. (MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Koichiro Tamura, Daniel Peterson, Nicholas Peterson, Glen Stecher, Masatoshi Nei y Sudhir Kumar. Mol. Biol. Evol. 28(10): 2731-2739. 2011 doi: 10.1093/molbev/msr121 Publicación de acceso anticipado 4 de

mayo de 2011).

El árbol filogenético de ORF1 se presenta en la figura 1, el de ORF2 en la figura 2. El porcentaje de soporte de bootstrap se especifica en los nodos. Las barras de distancia indican el número de sustituciones de nucleótidos por sitio.

Como se desprende de estos árboles filogenéticos, el nuevo parvovirus porcino está más relacionado con el parvovirus porcino 5 (PPV5) y el parvovirus porcino 4 (PPV4) que con el PPV1, 2 o 3, o los Bocavirus. Se descubrió que tanto la secuencia de codificación NS1 como la secuencia de codificación de la proteína de la cápside muestran un cierto ajuste en esa parte del árbol filogenético de *Parvovirinae* que también comprende los virus no relacionados PPV4 y PPV5.

Por esta razón, los inventores decidieron colocar tentativamente el nuevo virus en el grupo de los virus del nuevo clado. Sin embargo, la identidad de secuencia con los parvovirus porcinos existentes, incluso dentro del grupo de los virus del nuevo clado, es relativamente baja. Por esta razón, incluso es concebible que el nuevo virus pertenezca a un nuevo género dentro de la familia *Parvovirinae*.

Las SEQ ID NO: 1 y 3 muestran ejemplos típicos de la secuencia de nucleótidos de los genes que codifican la proteína de la cápside y la proteína no estructural NS1 del virus.

Se entenderá que para estas proteínas pueden existir variaciones naturales entre representantes individuales del virus asociado al SHI. Existen variaciones genéticas que llevan a cambios menores en, por ejemplo, la secuencia de la proteína de la cápside. Esto es igualmente cierto para el gen NS1. En primer lugar, existe el llamado "bamboleo en la segunda y tercera base" que explica que pueden ocurrir cambios de nucleótidos que pasan desapercibidos en la secuencia de aminoácidos que codifican: por ejemplo, todos los tripletes TTA, TTG TCA, TCT, TCG y TCC codifican leucina. Además, pueden verse pequeñas variaciones entre los representantes del nuevo parvovirus porcino en la secuencia de aminoácidos. Estas variaciones pueden reflejarse por (una) diferencia(s) de aminoácidos en la secuencia general o por deleciones, sustituciones, inserciones, inversiones o adiciones de (un) aminoácido(s) en dicha secuencia. Las sustituciones de aminoácidos que no alteran esencialmente las actividades biológicas e inmunológicas, se han descrito, por ejemplo, por Neurath et al en "The Proteins" Academic Press Nueva York (1979). Las sustituciones de aminoácidos entre aminoácidos relacionados o las sustituciones que han tenido lugar con frecuencia en la evolución son, entre otros, Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asn, Ile/Val (véase Dayhof, M.D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D.C., 1978, vol. 5, supl. 3). Otras sustituciones de aminoácidos incluyen Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Leu/Ile, Leu/Val y Ala/Glu. Basándose en esta información, Lipman y Pearson desarrollaron un método para la comparación rápida y sensible de proteínas (Science 227, 1435-1441, 1985) y para determinar la similitud funcional entre proteínas homólogas. Dichas sustituciones de aminoácidos de las realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención están dentro del alcance de la invención.

Esto explica por qué la proteína de la cápside y la proteína no estructural NS1, cuando se aísla de diferentes representantes de un parvovirus porcino, pueden tener niveles de homología significativamente inferiores al 100 %, mientras sigue representando la proteína de la cápside y la proteína no estructural NS1 del parvovirus porcino. Esto se refleja claramente, por ejemplo, en el árbol filogenético en la figura 1 de un artículo de Xiao et al.<sup>(6)</sup> donde se muestra que incluso dentro de un solo género, el género de virus similar a PARV4 que consiste en parvovirus altamente relacionados tiene sin embargo secuencias de nucleótidos genómicas globales significativamente diferentes, así como secuencias de nucleótidos del gen NS1 significativamente diferentes.

Por lo tanto, se describe el virus, entre otros, como un virus aislado que es miembro de la subfamilia *Parvovirinae* de la familia de los *Parvoviridae*, siendo dicho virus

- a) un virus asociado al SHI y
- b) el virus tiene un genoma vírico que comprende un gen que codifica una proteína de la cápside (CP), en donde la secuencia de nucleótidos del gen de CP tiene un nivel de identidad de al menos el 80 % con respecto a la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 1.

Para los fines de la presente descripción, un nivel de identidad debe entenderse como el nivel de identidad de la secuencia de SEQ ID NO: 1 y la región correspondiente que codifica la proteína de la cápside de un parvovirus porcino del cual debe determinarse el nivel de identidad.

Un programa adecuado para la determinación de un nivel de identidad es el programa blast de nucleótidos (blastn) de la herramienta de búsqueda de alineación local básica del NCBI, utilizando la opción "Alinear dos o más secuencias" y la configuración estándar (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A efectos de la presente invención, aislado significa: liberado del tejido con el que el virus está asociado en la naturaleza. Un ejemplo de un virus aislado es el virus presente en el cultivo celular.

Por el presente documento, se describe un virus que tiene un gen de la proteína de la cápside que tiene un nivel de identidad de al menos el 82 %, más preferentemente el 84 %, 86 %, 88 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %.

96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso el 100 %, en ese orden de preferencia, con la secuencia de nucleótidos de la proteína de la cápside tal como se representa en la SEQ ID NO: 1.

Una forma alternativa de describir el virus se relaciona con la secuencia del gen NS1 del virus.

5 La SEQ ID NO: 3 muestra un ejemplo típico de la secuencia de nucleótidos del gen NS1 del virus. Como se ha explicado anteriormente, sin embargo, se encuentran variaciones naturales que llevan a cambios menores en la secuencia de NS1.

10 Por lo tanto, el virus también se puede describir como un virus aislado que es miembro de la subfamilia *Parvovirinae* de la familia de los *Parvoviridae*, siendo dicho virus

a) un virus asociado al SHI y

15 b) el virus tiene un genoma vírico que comprende un gen que codifica una proteína no estructural 1 (NS1), en el que la secuencia de nucleótidos del gen NS1 tiene un nivel de identidad de al menos el 80 % de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 3.

También se describe un virus que tiene un gen NS1 que tiene un nivel de identidad de al menos el 82 %, más preferentemente el 84 %, 86 %, 88 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso el 100 %, en ese orden de preferencia, con la secuencia de nucleótidos del gen NS1 tal como se representa en la SEQ ID NO: 3.

Por lo tanto, en resumen, el virus es un virus aislado que es miembro de la subfamilia *Parvovirinae* de la familia de los *Parvoviridae*, siendo dicho virus

25 a) un virus asociado al SHI y

30 b) el virus tiene un genoma vírico que comprende un gen que codifica una proteína de la cápside (CP) y un gen que codifica una proteína no estructural 1 (NS1), en donde la secuencia de nucleótidos del gen de la CP tiene un nivel de identidad de al menos el 80 % con la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 1 o la secuencia de nucleótidos del gen NS1 tiene un nivel de identidad de al menos el 80 % con la secuencia de nucleótidos tal como se representa en la SEQ ID NO: 3.

También se describe un virus aislado que es miembro de la subfamilia *Parvovirinae* de la familia de los *Parvoviridae*, siendo dicho virus

35 a) un virus asociado al SHI y

40 b) el virus tiene un genoma vírico que comprende un gen que codifica una proteína de la cápside (CP) y un gen que codifica una proteína no estructural 1 (NS1), en donde la secuencia de nucleótidos del gen de la CP tiene un nivel de identidad de al menos el 80 % con la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de nucleótidos del gen NS1 tiene un nivel de identidad de al menos el 80 % con respecto a la secuencia de nucleótidos tal como se representa en la SEQ ID NO: 3.

Otra forma alternativa más de caracterizar el virus depende de una prueba de PCR utilizando conjuntos de cebadores específicos para la secuencia del gen de la proteína de la cápside o la secuencia del gen NS1 de un virus. Se eligieron dos conjuntos de cebadores diferentes de los cuales la secuencia se representa en las SEQ ID NO: 5-6 y SEQ ID NO: 7-8 por su especificidad para el virus. La prueba de PCR que usa el primer conjunto de cebadores (SEQ ID NO: 5-6) que reacciona específicamente con el gen de la proteína de la cápside del virus usa los dos cebadores `Bowl_Q_ORF2_FW: CTACATCTGCGCCTGAC` y `Bowl_Q_ORF2_REV: GTGGTGAGAAGGCAAGAC`,  
 50 Para experimentos con PCR cuantitativa (Q), la sonda de PCR `Bowl_Q_ORF2_PROBE: 6FAM-CACGAGCTAGAGCGT-GCTAAACAG-BHQ1` como se representa en la SEQ ID NO.: 9 se usa además de estos dos cebadores.

La prueba de PCR que usa el segundo conjunto de cebadores (SEQ ID NO: 7-8) reacciona específicamente con el gen NS1 del virus y usa los dos cebadores `Bowl_ORF1_774_F: TGTTGAGTGTGGTGGATTGG` y `Bowl_ORF1_1626_R: AAG-GAAGCTGGACCGAGAG`.

Las pruebas, que se describen con más detalle en la sección de Ejemplos, son pruebas de PCR estándar.

60 Si un miembro de la subfamilia *Parvovirinae* dentro de *Parvoviridae* se analiza utilizando los conjuntos de cebadores descritos anteriormente, se puede decir lo siguiente: si un análisis del producto de PCR del primer conjunto de cebadores revela un producto de PCR de aproximadamente 140 pares de bases o si el análisis del producto de PCR del segundo conjunto de cebadores revela un producto de PCR de aproximadamente 853 pares de bases, esto demuestra inequívocamente que el virus analizado pertenece al virus que se describe en el presente documento.

65 Simplemente como un ejemplo: un producto de PCR de aproximadamente 853 pares de bases es un producto de PCR con una longitud de entre 853 + 10 y 853 -10 pares de bases. Un producto de PCR de aproximadamente 140

pares de bases es un producto de PCR con una longitud de entre 140 + 10 y 140 - 10 pares de bases.

También se describe un virus aislado que es miembro de la subfamilia *Parvovirinae* dentro de *Parvoviridae*, en donde:

- 5 a) el virus es un virus asociado al SHI y  
 b) el ADN genómico vírico reacciona en una reacción de PCR con un conjunto de cebadores tal como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y 6 para dar un producto de PCR de 140 +/- 10 pares de bases o reacciona en una reacción de PCR con un conjunto de cebadores como se representa en la SEQ ID NO: 7 y 8 para dar un producto de PCR de 853 +/- 10 pares de bases.

15 También se describe un virus en el que el ADN genómico vírico reacciona en una reacción de PCR con un conjunto de cebadores como se representa en las SEQ ID NO: 5 y 6 para dar un producto de PCR de 140 +/- 10 pares de bases y reacciona en una reacción de PCR con un conjunto de cebadores tal como se representa en las SEQ ID NO: 7 y 8 para dar un producto de PCR de 853 +/- 10 pares de bases.

20 También se describe un virus en el que el virus tiene un genoma vírico que comprende un gen que codifica una proteína de la cápside (CP) y un gen que codifica una proteína no estructural 1 (NS 1), en el que la secuencia de nucleótidos del gen de la CP tiene un nivel de identidad de al menos el 80 % con la secuencia de nucleótidos tal como se representa en la SEC ID NO: 1 o la secuencia de nucleótidos del gen NS1 tiene un nivel de identidad de al menos el 80 % con la secuencia de nucleótidos tal como se representa en la SEQ ID NO: 3 y en donde el ADN genómico vírico reacciona en una reacción de PCR con un conjunto de cebadores tal como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y 6 para dar un producto de PCR de 140 +/- 10 pares de bases y reacciona en una reacción de PCR con un conjunto de cebadores como se representa en la SEQ ID NO: 7 y 8 para dar un producto de PCR de 853 +/- 10 pares de bases.

El virus puede estar en forma viva, atenuada o inactivada.

30 Tal como se ha indicado anteriormente, ahora se han caracterizado las secuencias de ADN de los genes que codifican la CP y la NS1 del virus. La identificación de estos genes es muy útil, dado que ahora se puede usar, entre otros, como base para vacunas de ADN, para su uso en la preparación de vacunas de subunidades basándose en estas proteínas o con fines de diagnóstico, tal como se explicará ampliamente a continuación.

35 Se describe un fragmento de ADN que comprende un gen que codifica una proteína de la cápside, caracterizado porque ese gen tiene un nivel de identidad de al menos el 80 % con la secuencia de nucleótidos del gen de la CP tal como se representa en la SEQ ID NO: 1.

40 Tal fragmento de ADN puede comprender un gen que tiene un nivel de identidad de al menos el 82 %, más preferentemente el 84 %, 86 %, 88 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso el 100 %, en ese orden de preferencia, con la secuencia de nucleótidos de la CP tal como se representa en la SEQ ID NO: 1.

45 Se describe un fragmento de ADN que comprende un gen que codifica una NS1 en donde el gen tiene un nivel de identidad de al menos el 80 % con respecto a la secuencia de nucleótidos del gen NS1 tal como se representa en la SEQ ID NO: 3.

50 Tal fragmento de ADN puede comprender un gen que tiene un nivel de identidad de al menos el 82 %, más preferentemente el 84 %, 86 %, 88 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso el 100 %, en ese orden de preferencia, con la secuencia de nucleótidos del NS1 tal como se representa en la SEQ ID NO: 3.

También se describe una CP en donde esta CP está codificada por un fragmento de ADN que codifica una CP.

55 Tales CP del virus son muy adecuadas porque son adecuadas para su uso en vacunas, más específicamente en vacunas de subunidades, se pueden usar para generar anticuerpos y hacen posibles las pruebas de diagnóstico, tal como se explica a continuación.

Se describe una CP que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en la SEQ ID NO: 2.

60 También se describe una NS 1, en donde la NS 1 está codificada por un fragmento de ADN que codifica una NS 1.

Tales NS1 del virus son altamente adecuadas, entre otras cosas porque hacen posibles las pruebas de diagnóstico, tal como se explica a continuación.

65 se describe una NS1 que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en la SEQ ID NO: 4.

Uno de los méritos de la presente invención es que ahora es posible por primera vez seguir el trascurso de una infección vírica y analizar la presencia o ausencia del nuevo virus en los diversos órganos y fluidos corporales de los cerdos que padecen SHI. Esto ayudó a obtener más información sobre el desarrollo de la enfermedad.

Se sabe que en las semanas o incluso días antes de que un cerdo individual muestre síntomas clínicos completos del SHI, no se encuentran anomalías. El tiempo promedio entre los primeros síntomas y la muerte de los animales es de aproximadamente 2-6 horas. Poco antes de la muerte, los animales parecen sufrir distensión abdominal y algunos de ellos gritan antes de morir. Los animales en las granjas que desarrollaron signos clínicos fueron sacrificados antes de morir de la enfermedad.

En las diversas granjas mexicanas de las que se recolectaron cerdos con SHI, la incidencia del SHI varió entre el 1-2 %.

Se analizó un total de 33 animales diagnosticados con SHI sacrificados recolectados de diferentes granjas, un grupo de 17 semanas de edad entre 18-27 semanas (Ejemplo 1) y un grupo de 16 semanas de edad entre 12-26 semanas (Ejemplo 2). Las reacciones de PCR con los conjuntos de cebadores tal como se describieron anteriormente revelaron que en el grupo 1, 5 de 14 sueros (faltaban 3 sueros de la colección) resultaron positivos para el virus y un frotis rectal resultó positivo. Un total de 8 muestras de sangre completas resultaron ser positivas, y 12 de 15 ganglios linfáticos resultaron ser positivos. En el grupo 2, 5 de 16 sueros fueron positivos para el virus y un frotis rectal fue positivo. A partir de un animal representativo de cada grupo (animal 2, grupo 1, animal 10, grupo 2), se analizó la presencia del virus en los órganos. Se descubrió que todos los órganos muestreados, incluidos los ganglios linfáticos, el pulmón, el bazo, el intestino, el riñón y el hígado, así como las heces dieron positivo para el virus.

Se describe para infectar cerdos sanos con el nuevo virus y para examinar la vía de la infección vírica. Con este objetivo, el material de los órganos y las heces de los animales con SHI se homogeneizaron en medio de cultivo tisular. Los homogeneizados se congelaron y descongelaron una vez (-70 °C), se centrifugaron y se filtraron en filtros de 5 µm, 0,45 µm y 0,22 µm para eliminar el material tisular restante.

Se hizo un inóculo A del siguiente material de un animal representativo: heces, ganglios linfáticos, pulmón, bazo e intestino del animal 10 del grupo 2.

Se hizo un inóculo B del siguiente material de otro animal representativo: heces, ganglios linfáticos, pulmón, riñón e hígado del animal 2 del grupo 1. Los detalles completos de estos experimentos se dan en la sección de Ejemplos a continuación (Ejemplo 3).

Los inóculos (A o B) se administraron como una dosis IM de 4 x 2 ml y una dosis oral de 20 ml a un total de 4 verracos y 8 cerdas (Landrace / alto estado de salud / SPF) de 12-14 semanas de vida a tiempo de inoculación de la siguiente manera:

Grupo 1: cinco animales, de los cuales tres animales recibieron el inóculo A, dos sirvieron como controles de contacto.

Grupo 2: cuatro animales, de los cuales tres animales recibieron el inóculo B, uno sirvió como control de contacto.

Grupo 3: tres animales, todos los cuales recibieron inóculo B. Un animal (macho) fue sacrificado antes de la inoculación y sirvió como control negativo. Los animales fueron examinados para detectar la presencia del nuevo virus en suero, heces, frotis nasales y frotis oculares antes de la inoculación.

Se tomaron muestras de sangre, frotis nasal/rectal/ocular en varios puntos temporales. Los detalles completos de los experimentos con animales se dan en la sección de Ejemplos a continuación.

Se descubrió que en 6 de los 6 animales inoculados, el virus podía detectarse en el suero y en frotis rectal, nasal y ocular a los 7 días después de la inoculación. En los 3 animales no inoculados, los controles, el virus pudo detectarse en el suero 14 días después de la inoculación de los otros animales. Los frotis rectales/nasales y oculares de todos los animales de control fueron positivos en el día 7 después de la inoculación (Ejemplo 3, grupos 1,2). En 3 de 3 sueros de animales inoculados el día 3 después de la inoculación, se detectó el virus (Ejemplo 3, grupo 3).

Por lo tanto, aunque es cierto que se informa de que la incidencia del SHI es relativamente baja, dada la naturaleza altamente contagiosa del virus en combinación con su alta velocidad de infección, cabe esperar que, con mucho, la mayoría, si no en todos, los cerdos en granjas donde se produce el SHI experimentarán una infección con el virus.

Por lo tanto, es muy recomendable vacunar a todos los animales en granjas donde se produce el SHI, contra la infección con el parvovirus porcino asociado al SHI. Dicha vacunación erradicaría al menos un componente vírico del síndrome multifactorial. Y esto a su vez evitaría o al menos disminuiría la gravedad de la enfermedad.

También es uno de los méritos de la presente invención que, dado que el nuevo parvovirus porcino ahora se ha aislado y asociado con el SHI, la subunidad protectora del virus puede utilizarse como material de partida para fines de vacunación.

Por lo tanto, también se describen vacunas para combatir el SHI en cerdos, en donde tales vacunas comprenden el virus y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para su uso en una vacuna según la invención son agua estéril, solución salina, tampones acuosos tales como PBS y similares. Además, una vacuna

según la invención puede comprender otros aditivos tales como adyuvantes, estabilizantes, antioxidantes y otros, tal como se describe a continuación.

5 La lucha a este respecto debe interpretarse en un sentido amplio: se considera que la lucha contra el SHI comprende la vacunación para prevenir los síntomas de la enfermedad, así como la vacunación para disminuir los síntomas de la enfermedad tal como se describe anteriormente.

La vacunación terapéutica una vez que se diagnostica el virus en un animal infectado que aún no padece el síndrome es, por supuesto, igualmente eficaz. La vacunación terapéutica después de que se diagnostique el síndrome parecería no eficaz, dado el muy corto tiempo entre los primeros síntomas clínicos y la muerte.

10 Una vacuna tal como se describe puede comprender el virus en forma viva atenuada o inactivada.

15 Las vacunas de virus vivos atenuados, es decir, las vacunas que comprenden el virus en una forma viva atenuada, tienen la ventaja sobre las vacunas inactivadas de que imitan mejor la forma natural de infección. Además, sus capacidades de replicación permiten la vacunación con bajas cantidades de virus; su número aumentará automáticamente hasta que alcance el nivel de activación del sistema inmunitario. A partir de ese momento, el sistema inmunitario se activará y finalmente eliminará los virus.

20 Un virus vivo atenuado es un virus que tiene un nivel de virulencia reducido en comparación con el virus aislado del campo. Un virus que tiene un nivel de virulencia reducido se considera un virus que, incluso en combinación con otros factores involucrados en el SHI, no induce mortalidad en los cerdos.

Por lo tanto, se describe una vacuna que comprende un virus en el que dicho virus está en una forma viva atenuada.

25 Los virus atenuados pueden obtenerse, por ejemplo, haciendo crecer los virus en presencia de un agente mutagénico, seguido de una selección de virus que muestra una disminución en el nivel de progenie y/o en la velocidad de replicación. Muchos de estos agentes se conocen en la materia.

30 Otro método muy utilizado es el traspaso seriado *in vitro*. Los virus luego se adaptan a la línea celular utilizada para el traspaso seriado, para que se comporten atenuados cuando se transfieren al hospedador natural nuevamente como una vacuna. Otra forma más de obtener virus atenuados es someterlos al crecimiento a temperaturas que se desvían de la temperatura de su hábitat natural. Los métodos de selección para mutantes sensibles a la temperatura (mutantes Ts) son bien conocidos en la técnica. Dichos métodos comprenden el crecimiento de virus en presencia de un mutágeno seguido de crecimiento a una temperatura subóptima y a la temperatura óptima, la titulación del virus de la progenie en las capas celulares y selección visual de aquellas placas que crecen más lentamente a la temperatura óptima. Dichas placas pequeñas comprenden virus vivos atenuados de crecimiento lento y, por lo tanto, deseados.

35 Se han descrito vacunas vivas atenuadas para combatir el parvovirus porcino tipo PPV, entre otros, por Paul y Mengeling<sup>(32)</sup>, por Paul y Mengeling<sup>(33)</sup> y por Fujisaki y Murakami<sup>(34)</sup>.

40 Sin embargo, una posible desventaja del uso de virus vivos atenuados podría ser que inherentemente queda un cierto nivel de virulencia. Esto no es una desventaja real siempre que el nivel de virulencia sea aceptable, es decir, mientras la vacuna al menos evite que los cerdos mueran. Por supuesto, cuanto menor es la virulencia en reposo de la vacuna de virus vivo atenuado, menos influencia tiene la vacuna sobre el aumento de peso durante/después de la vacunación.

45 Las vacunas inactivadas son, en contraste con sus homólogos de vivos atenuados, inherentemente seguras, porque no queda virulencia. A pesar de que generalmente comprenden una dosis algo más alta de virus en comparación con las vacunas de virus vivos atenuados, pueden ser, por ejemplo, la forma preferida de vacuna en cerdos que ya padecen otras enfermedades. Cerdos que se mantienen en condiciones subóptimas, tales como una nutrición incompleta o un enjaulado subóptimo también se beneficiarían de las vacunas inactivadas.

Por lo tanto, también se describe una vacuna que comprende un virus en el que dicho virus está en forma inactiva.

55 Se sabe que los parvovirus inactivados enteros en general, ya sea parvovirus porcinos o caninos, son una base muy eficaz y segura para las vacunas. Simplemente como un ejemplo: MSD AH (Boxmeer, Países Bajos) produce una vacuna PPV de tipo parvovirus porcino inactivado disponible comercialmente: Porcilis Parvo. Hipra (España) también produce una vacuna PPV de tipo parvovirus porcino inactivado disponible comercialmente: PARVOSUIN® MR/AD. Zoetis produce una vacuna de parvovirus canino inactivado: PARVAC y una vacuna de parvovirus porcino inactivado de tipo PPV: Porcine PARVAC. Novartis proporciona métodos para la inactivación de parvovirus en la patente de EE.UU. US4193991.

60 Dichas vacunas de virus completos inactivados pueden prepararse igualmente para el nuevo parvovirus porcino. Como es el caso de las vacunas contra el parvovirus conocidas, la producción comprende básicamente las etapas de desarrollar el nuevo parvovirus en células porcinas susceptibles, recolectar el virus, inactivar el virus y mezclar el virus inactivado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La forma estándar de inactivación es un tratamiento clásico con formaldehído. Otros métodos bien conocidos en la técnica para la inactivación son la radiación UV, la

radiación gamma, el tratamiento con etilenimina binaria, timerosal y similares. La persona experta sabe cómo aplicar estos métodos. Preferentemente, el virus se inactiva con  $\beta$ -propiolactona, glutaraldehído, etilenimina o formaldehído. No hace falta decir que también se describen en el presente documento otras formas de inactivar el virus.

5 Tal como se ha indicado anteriormente, el virus puede crecer en cultivo celular en células porcinas susceptibles o líneas celulares.

Por lo tanto, también se describe un cultivo celular que comprende un parvovirus porcino asociado al SHI. Los ejemplos de células y líneas celulares son SK6, PK15, células renales porcinas primarias o inmortalizadas, macrófagos pulmonares alveolares porcinos primarios o inmortalizados.

Prácticamente se ha determinado todo el genoma vírico del nuevo parvovirus porcino y la secuencia de ADN de un representante del nuevo virus se presenta en la SEQ ID NO: 10. Las repeticiones terminales invertidas (RTI) del genoma no se presentan en el presente documento. Dado que los parvovirus, por definición, pertenecen a los virus más pequeños conocidos, todo el ADN monocatenario que codifica el parvovirus se puede generar fácilmente de forma sintética. Por este motivo, el parvovirus se puede generar fácilmente *in vivo* utilizando el ADN vírico como material de partida. Las repeticiones terminales invertidas (RTI) del genoma de otro parvovirus conocido, tal como, entre otros, el descrito por Qiu et al. <sup>(37)</sup> y por Wang et al. <sup>(38)</sup> se puede usar para completar el genoma vírico tal como se presenta en la SEQ ID NO: 10. Las RTI simplemente desempeñan un papel en la replicación del genoma vírico y, como tales, no son relevantes desde el punto de vista inmunológico. Por lo tanto, con el fin de producir un virus, las RTI son intercambiables.

La clonación de ADN parvovírico de longitud completa en un plásmido tal como, por ejemplo, Bluescript II SK, y la generación posterior de parvovirus completo a través de la transfección de células porcinas con un plásmido de expresión que codifica el nuevo parvovirus porcino, entre otros, se describe por Qiu et al. <sup>(37)</sup> y por Wang et al. <sup>(38)</sup>. Una línea celular permisiva como SK6, PK15, células renales porcinas primarias o inmortalizadas, los macrófagos pulmonares alveolares porcinos primarios o inmortalizados serían la línea celular preferida para este propósito. No obstante, si se desea, también se pueden usar líneas celulares no permisivas: el genoma del nuevo parvovirus se puede replicar en células no permisivas con la ayuda de genes de adenovirus tal como se describe por Guan et al. <sup>(39)</sup>.

Aunque los parvovirus inactivados completos proporcionan una buena base para las vacunas, su producción puede ser costosa, en función, entre otros, del tipo de células hospedadoras utilizadas, del sustrato y del medio de cultivo celular utilizado. En el caso específico de parvovirus, una alternativa atractiva para el uso de virus completos es el uso de subunidades de CP de parvovirus, más preferentemente, subunidades en forma de las llamadas cápsides vacías.

Dichas cápsides vacías son básicamente partículas similares a virus que, sin embargo, no comprenden el genoma parvovírico. Como consecuencia, las partículas de cápside vacías parvovíricas no tienen que ser inactivadas antes de su uso en una vacuna, y por lo tanto tienen la ventaja adicional de que son intrínsecamente seguras.

40 Las cápsides vacías se pueden obtener por la simple expresión de ORF2 que codifica la proteína de la cápside, en un sistema de expresión adecuado. La proteína de la cápside así formada se autoensambla en partículas de virus vacías.

Las cápsides vacías parvovíricas se pueden preparar fácilmente en grandes cantidades y son altamente inmunogénicas.

45 Con mucho, la mayoría de los sistemas de expresión actualmente en uso para hacer cápsides vacías parvovíricas son sistemas de expresión basados en baculovirus.

Los métodos para la producción de cápsides vacías de parvovirus altamente inmunogénicas en sistemas de expresión basados en baculovirus se han descrito, por ejemplo, para el parvovirus porcino tipo PPV por Martinez <sup>(18)</sup>, Casal <sup>(19)</sup>, Zhou et al. <sup>(20)</sup> y por Hao Feng <sup>(21)</sup>. Para otros parvovirus, tales métodos se han descrito, por ejemplo, por Saliki <sup>(22)</sup> y por Brown <sup>(23)</sup>. Además, los sistemas de expresión de baculovirus y los vectores de expresión de baculovirus en general se han descrito ampliamente en libros de texto como O'Reilly et al. <sup>(24)</sup> y Murhammer <sup>(25)</sup>.

Los sistemas de expresión basados en baculovirus también están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California 92008, EE. UU.

Una alternativa para los sistemas de expresión basados en Baculovirus son los sistemas de expresión basados en levaduras. Los sistemas de expresión en levadura están descritos, por ejemplo, por Gellissen et al. <sup>(29)</sup>.

60 Los sistemas de expresión listos para usar están disponibles comercialmente de Research Corp. Technologies, 5210 East Williams Circle, Suite 240, Tucson, AZ 85711-4410 EE. UU. Los sistemas de expresión en células de levadura e insecto también están disponibles, por ejemplo, en Clontech Laboratories, Inc. 4030 Fabian Way, Palo Alto, California 94303-4607, EE. UU.

Por supuesto, la expresión de la proteína de la cápside también es posible en sistemas de expresión basados en células de mamífero tal como se conoce en la técnica, pero estos sistemas probablemente serían más caros de usar, en comparación con los sistemas de expresión basados en baculovirus.

Así, la invención se refiere a una vacuna para combatir el parvovirus porcino asociado a SHI en cerdos, caracterizado porque dicha vacuna comprende una cantidad inmunogénicamente eficaz de una proteína de la cápside y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Una forma preferida de esta realización se refiere a una vacuna para combatir el parvovirus porcino asociado al SHI en cerdos, caracterizado porque dicha vacuna comprende una cantidad inmunogénicamente eficaz de una proteína de la cápside en forma de cápsides vacías.

10 La cantidad de cápsides vacías en una vacuna y la vía de administración serían comparables con las partículas de virus enteros inactivados, ya que en términos de inmunogenicidad y similitud de la cápside, son comparables a las partículas de virus enteros inactivados.

15 Normalmente, una cantidad de entre 1 y 100 µg de las nuevas cápsides vacías de parvovirus sería muy adecuada como dosis de vacuna. Desde el punto de vista del coste, una cantidad preferida estaría en el intervalo de 1-50 µg de cápsides vacías, más preferentemente en el intervalo de 1-25 µg.

Casal<sup>(19)</sup> describe que tanto las dosis de parvovirus canino como la de parvovirus porcino tan bajas como 1-3 µg en presencia de adyuvantes convencionales confieren protección total al hospedador correspondiente contra la enfermedad.

20 Una vacuna según la invención basada en cápsides vacías comprende preferentemente un adyuvante. Los adyuvantes convencionales, bien conocidos en la materia son, por ejemplo, el adyuvante completo e incompleto de Freund, vitamina E, polímeros de bloque no iónicos, dipéptidos de muramilo, Quill A<sup>(R)</sup>, aceite mineral por ejemplo Bayol<sup>(R)</sup> o Markol<sup>(R)</sup>, aceite vegetal y Carbopol<sup>(R)</sup> (un homopolímero) o Diluvac<sup>(R)</sup> Forte. La vacuna también puede comprender un denominado "vehículo". Un vehículo es un compuesto al que se adhiere el polipéptido, sin estar covalentemente ligado a ello. Los compuestos de vehículos usados con frecuencia son, por ejemplo, hidróxido de aluminio, -fosfato u -óxido, sílice, caolín y bentonita.

25 Casal<sup>(19)</sup> usó con éxito el hidróxido de aluminio y Quill A en sus vacunas contra el parvovirus.

30 En principio, una vacuna según la invención puede administrarse solo una vez. Sin embargo, especialmente en el caso de vacunas de cápside vacías, preferentemente también se administra una primera y posiblemente una segunda vacuna de refuerzo. Un primer refuerzo generalmente se administraría al menos dos semanas después de la primera vacuna. Un momento muy adecuado para una vacuna de refuerzo es entre 3 y 16 semanas después de la primera vacunación. Un segundo refuerzo, si fuese necesario, generalmente se administraría entre 4 y 50 semanas después del primer refuerzo.

35 Una alternativa al enfoque de vacuna de virus completo inactivado y al enfoque de vacuna de cápside vacía es el uso de vectores no de parvovirus recombinantes vivos que tienen a los cerdos como su animal hospedador, como vehículos del nuevo gen de la proteína de la cápside parvovírica porcina.

Entre los vectores no de parvovirus recombinantes adecuados que tienen a los cerdos como su animal hospedador, dos vectores son especialmente adecuados como vehículos: el virus de la pseudorrabia (PRV) y el virus de la peste porcina clásica (CSFV).

40 El uso de tales virus recombinantes en vacunas tiene la ventaja adicional de que los animales vacunados se vacunan al mismo tiempo contra PRV y PPV o CSFV y PPV.

45 Chen y col.<sup>(27)</sup> describen la construcción y el uso de un vector recombinante de PRV atenuado vivo que expresa una proteína de la cápside de PPV de tipo parvovirus porcino. Este PRV recombinante se administró a lechones de ocho días de vida en una cantidad de  $5 \times 10^5$  de DICT<sub>50</sub> y esta cantidad de vacuna demostró ser segura y proporcionó una excelente inmunidad contra el PRV y el PPV.

50 Los vectores de CSFV vivos atenuados también son muy adecuados como vectores recombinantes vivos. Simplemente como ejemplo; el CSFV atenuado vivo del cual se ha delecionado el gen N<sup>Pro</sup>, se ha descrito por Mayer et al.<sup>(28)</sup>. Tal virus vivo atenuado permite, entre otros, en el sitio de deleción del gen N<sup>Pro</sup>, para la inserción del gen que codifica la proteína de la cápside. Tal vector de CSFV recombinante vivo forma igualmente un vehículo adecuado para el nuevo gen de proteína de cápside del parvovirus porcino.

55 La expresión del gen de la proteína de la cápside se puede poner bajo el control de cualquier promotor heterólogo adecuado que sea funcional en una célula de mamífero (véase más adelante). Un promotor heterólogo es un promotor que no es el promotor responsable de la transcripción del gen de la CP en la forma de tipo silvestre del nuevo parvovirus porcino. Puede ser un promotor parvovírico responsable de la transcripción de una CP o de una NS1 de otro parvovirus, que no pertenece al parvovirus como se describe o puede ser un promotor no parvovírico.

60 Por lo tanto, también se describe un fragmento de ADN que comprende un gen que codifica una CP, en donde dicho gen está bajo el control de un promotor heterólogo funcional.

65

Chen et al.<sup>(27)</sup> hizo uso del promotor del CMV para impulsar la expresión del gen de la proteína de la cápside, pero otros promotores adecuados que son funcionales en una célula de mamífero son conocidos en la técnica. Un promotor que es funcional en una célula de mamífero es un promotor que es capaz de dirigir la transcripción de un gen que se encuentra aguas abajo del promotor en una célula de mamífero.

5 Los ejemplos de promotores adecuados que son funcionales en una célula de mamífero incluyen promotores clásicos tales como el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (humano) (Seed, B. et al., Nature 329, 840-842, 1987; Fynan, E.F. et al., PNAS 90, 11478-11482, 1993; Ulmer, J.B. et al., Science 259, 1745-1748, 1993), la RTL del virus del sarcoma de Rous (RSV, Gorman, C.M. et al., PNAS 79, 6777-6781, 1982; Fynan et al., citado anteriormente; Ulmer et al., citado anteriormente), la Rtl del MPSV (Stacey et al., J. Virology 50, 725-732, 1984),  
10 promotor temprano inmediato de SV40 (Sprague J. et al., J. Virology 45, 773, 1983), el promotor de SV-40 (Berman, P.W. et al., Science, 222, 524-527, 1983), el promotor de metalotioneína (Brinster, R.L. et al., Nature 296, 39-42, 1982), el promotor de choque térmico (Voellmy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4949-53, 1985), el promotor tardío principal de Ad2 y el promotor de  $\beta$ -actina (Tang et al., Nature 356, 152-154, 1992). Las secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias terminadoras y de poliadenilación. Entre las secuencias que se  
15 pueden usar están la conocida secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina, la secuencia de poliadenilación del SV40, el terminador del citomegalovirus humano (hCMV) y las secuencias de poliadenilación.

Por lo tanto, también se describe una vacuna para combatir el parvovirus porcino asociado al SHI en cerdos, en donde dicha vacuna comprende un vector no de parvovirus vivo recombinante que comprende un fragmento de ADN  
20 que comprende un gen que codifica una CP bajo el control de un promotor funcional y un vehículo farmacéuticamente aceptable. No hace falta decir que el vector no de parvovirus vivo recombinante debería expresar una cantidad inmunogénicamente eficaz de la proteína de la cápside.

Una alternativa para la vacunación con una vacuna de virus completo inactivado, una vacuna de cápside vacía o un vector no de parvovirus vivo recombinante, es el uso de la vacuna de ADN.

Dicha vacuna de ADN se basa en la introducción de un fragmento de ADN que porta el gen que codifica la proteína de la cápside bajo el control de un promotor adecuado, en el animal hospedador. Una vez que el ADN es absorbido por las células del hospedador, el gen que codifica la proteína de la cápside se transcribe y el transcrito se traduce en proteína de la cápside en las células del hospedador. Esto imita de cerca el proceso de infección natural del  
30 parvovirus. Los promotores adecuados son promotores que son funcionales en células de mamífero, como se ha ejemplificado anteriormente.

Un fragmento de ADN que porta el gen que codifica la proteína de la cápside bajo el control de un promotor adecuado podría ser, por ejemplo, un plásmido. Este plásmido puede estar en forma circular o lineal.

35 Los ejemplos de vacunación exitosa con ADN de cerdos son, entre otros, la vacunación exitosa contra la enfermedad de Aujeszky como se describe en Gerdtts et al. (30), Journal of General Virology 78: 2139-2146 (1997). Describen una vacuna de ADN en la que se usa un fragmento de ADN que transporta la glucoproteína C bajo el control del principal promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano. La vacunación se realizó cuatro veces con intervalos de dos semanas con una cantidad de 50  $\mu$ g de ADN. Los animales vacunados desarrollaron  
40 anticuerpos séricos que reconocieron el antígeno respectivo en una inmunotransferencia y que exhibieron actividad neutralizante.

Otro ejemplo de vacunación exitosa de ADN de cerdos se da por Gorres et al. <sup>(31)</sup>. Describieron la vacunación exitosa de ADN de cerdos contra la gripe porcina pandémica clásica H1N1. Se vacunaron con una vacuna principal y  
45 2 refuerzos homólogos a las 3 y 6 semanas después del cebado, de una vacuna de ADN que comprende el gen HA de gripe H1N1 bajo el control de un promotor funcional.

Por lo tanto, también se describe una vacuna para combatir el parvovirus porcino asociado al SHI en cerdos, en donde dicha vacuna comprende un fragmento de ADN que comprende un gen que codifica una proteína de la cápside bajo el control de un promotor funcional y un vehículo farmacéuticamente aceptable.  
50 No hace falta decir que el fragmento de ADN que comprende un gen que codifica una proteína de la cápside debería expresar una cantidad inmunogénicamente eficaz de la proteína de la cápside.

Lo que constituye una "cantidad inmunogénicamente eficaz" para una vacuna según la invención que se basa en una cápside vacía depende del efecto deseado y del organismo diana.

La expresión "cantidad inmunogénicamente eficaz" tal como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad de parvovirus, cápside vacía, vacuna de ADN o vector recombinante de virus vivo que es necesaria para inducir una respuesta inmunológica en cerdos en la medida en que disminuya los efectos patológicos causados por  
60 la infección con un parvovirus porcino de tipo silvestre asociado al SHI, en comparación con los efectos patológicos causados por la infección con un parvovirus porcino de tipo silvestre asociado al SHI en cerdos no inmunizados. Está dentro de la capacidad del experto en la materia el determinar si un tratamiento es "inmunológicamente eficaz", por ejemplo, administrando una infección de exposición experimental a animales vacunados y luego determinando los síntomas clínicos de enfermedad o los parámetros serológicos de un animal diana o midiendo el nuevo  
65 aislamiento del patógeno, seguido de la comparación de estos hallazgos con los observados en cerdos infectados en el campo.

La cantidad de virus administrada dependerá de la vía de administración, de la presencia de un adyuvante y del momento de la administración.

5 Una cantidad preferida de una vacuna viva que comprende virus se expresa, por ejemplo, como la dosis infecciosa de cultivo tisular (DICT50). Por ejemplo, para un virus vivo, un intervalo de dosis entre  $10^7$  y  $10^9$  DICT50 por dosis animal se puede usar ventajosamente, dependiendo del resto de virulencia del virus. Preferentemente, se usa un intervalo de entre  $10^7$  y  $10^8$  DICT50.

Se pueden aplicar muchas formas de administración, todas conocidas en la materia. Las vacunas según la invención se administran preferentemente al animal mediante inyección (intramuscular o vía intraperitoneal) o por vía oral.

10 El protocolo para la administración se puede optimizar de acuerdo con la práctica estándar de vacunación. En todos los casos, La administración a través de un inyector intradérmico (IDAL) es una forma preferida de administración.

15 Si una vacuna comprende cápsides vacías, la dosis también se expresaría como el número de partículas a administrar. La dosis generalmente sería algo más alta en comparación con la administración de partículas de virus vivos, porque las partículas de virus vivos se replican hasta cierto punto en el animal diana, antes de que sean eliminados por el sistema inmunitario. Para las vacunas basadas en virus inactivados, una cantidad de partículas de virus en el intervalo de aproximadamente  $10^4$  a  $10^9$  partículas generalmente sería adecuada, dependiendo del adyuvante utilizado.

20 Si una vacuna comprende subunidades, por ejemplo, la CP, la dosis también podría expresarse en microgramos de proteína. Para las vacunas basadas en subunidades, una dosis adecuada generalmente estaría en el intervalo entre 5 y 500 microgramos de proteína, nuevamente dependiendo del adyuvante utilizado.

25 Si una vacuna comprende un fragmento de ADN que comprende un gen que codifica la proteína de la cápside, la dosis se expresaría en microgramos de ADN. Para las vacunas basadas en subunidades, una dosis adecuada generalmente estaría en el intervalo entre 5 y 500 microgramos de ADN, dependiendo, entre otros, de la eficacia del plásmido de expresión utilizado. En muchos casos, una cantidad de entre 20 y 50 microgramos de plásmido por animal sería suficiente para una vacunación eficaz.

30 Una vacuna de acuerdo con la invención puede tomar cualquier forma que sea adecuada para la administración en el contexto de la cría de cerdos, y que coincida con la ruta de aplicación deseada y el efecto deseado. La preparación de una vacuna según la invención se lleva a cabo por medios convencionales para el experto.

35 Se prefieren las vías orales cuando se trata de facilitar la administración de la vacuna. Para la administración oral, la vacuna se mezcla preferentemente con un vehículo adecuado para la administración oral, es decir, celulosa, alimentos o una sustancia metabolizable como alfa-celulosa o diferentes aceites de origen vegetal o animal.

40 En la práctica, los cerdos se vacunan contra una serie de virus o microorganismos patógenos. Por lo tanto, es muy atractivo, tanto por razones prácticas como económicas, combinar una vacuna según la invención para cerdos con, por ejemplo, un inmunógeno adicional de un virus o microorganismo patógeno para cerdos, o información genética que codifique un inmunógeno de dicho virus o microorganismo.

45 Por lo tanto, también se describe una vacuna, en donde esa vacuna comprende al menos otro microorganismo patógeno porcino o virus patógeno porcino y/o al menos otro componente inmunógeno y/o material genético que codifica dicho otro componente inmunógeno, de dicho microorganismo patógeno porcino o virus patógeno porcino. Un componente inmunógeno o inmunogénico es un compuesto que induce una respuesta inmunológica en un animal. Puede ser, por ejemplo, un virus o una bacteria completa, o una proteína o un resto de azúcar de ese virus o bacteria.

50 Los virus y microorganismos patógenos más comunes que son patógenos para los cerdos son *Brachyspira hyodysenteriae*, el virus de la peste porcina africana, virus Nipah, circovirus porcino, Torque Teno virus porcino, virus de la pseudorrabia, virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), virus de la fiebre aftosa, virus de gastroenteritis transmisible, rotavirus, *Escherichia coli*, *Erysipelo rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

60 Por lo tanto, también se describe una vacuna, en donde el virus o el microorganismo patógeno para los cerdos se selecciona del grupo de *Brachyspira hyodysenteriae*, el virus de la peste porcina africana, virus Nipah, circovirus porcino, Torque Teno virus porcino, virus de la pseudorrabia, virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), virus de la fiebre aftosa, virus de gastroenteritis transmisible, rotavirus, *Escherichia coli*, *Erysipelo rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

65

También se describe un método para la preparación de una vacuna, en donde el método comprende la mezcla de un virus y/o de una cápside vacía y/o de una CP y/o de un fragmento de ADN que codifica una CP y/o de un vector no de parvovirus vivo recombinante que codifica una CP, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 De nuevo, también se describe un virus y/o una cápside vacía y/o una CP y/o un fragmento de ADN que codifica una CP y/o un vector no de parvovirus vivo recombinante que codifica una CP, para uso en una vacuna.

10 Como se ha mencionado anteriormente, el síndrome hemorrágico del intestino es un síndrome multifactorial. Es una compilación de factores que eventualmente desencadenan en el SHI. Esto significa que es importante saber si el parvovirus porcino asociado al SHI está presente en una determinada población de cerdos mucho antes de que se manifiesten los primeros síntomas clínicos. Por lo tanto, para una protección eficaz contra la enfermedad, es importante una detección rápida y correcta de la presencia del parvovirus porcino asociado al SHI.

15 Por lo tanto, otro objetivo de la presente invención es proporcionar herramientas de diagnóstico adecuadas para la detección de parvovirus porcino asociado al SHI.

20 Estas herramientas dependen en parte de la disponibilidad de anticuerpos contra el virus. Dichos anticuerpos se pueden usar, por ejemplo, en pruebas de diagnóstico para el parvovirus porcino asociado al SHI.

Los anticuerpos o antisueros que comprenden anticuerpos contra el parvovirus porcino asociado al SHI se pueden obtener rápida y fácilmente mediante la vacunación de, por ejemplo, cerdos, aves de corral o, por ejemplo, conejos con el virus seguido, después de unas cuatro semanas, por sangrado, centrifugación de la sangre coagulada y decantación de los sueros. Tales métodos son bien conocidos en la materia.

25 Otros métodos para la preparación de anticuerpos producidos contra el parvovirus porcino asociado al SHI, que puede ser policlonal, monoespecífico o monoclonal (o derivados de los mismos) también son bien conocidos en la técnica. Si se desean anticuerpos policlonales, las técnicas para producir y procesar sueros policlonales son bien conocidas en la técnica durante décadas, véase, por ejemplo, Mayer y Walter <sup>(35)</sup>.

30 Los anticuerpos monoclonales, reactivos contra el virus se pueden preparar inmunizando ratones consanguíneos mediante técnicas también conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, Kohler y Milstein <sup>(36)</sup>.

Por lo tanto, también se describen anticuerpos o antisueros que son reactivos con el virus.

35 Un kit de prueba de diagnóstico basado en la detección de un virus o material antigénico de ese virus y, por lo tanto, adecuado para la detección de infección por parvovirus porcino asociado al SHI puede comprender, por ejemplo, una prueba ELISA convencional. En un ejemplo de tal prueba, las paredes de los pocillos de una placa de ELISA están recubiertas con anticuerpos dirigidos contra el virus. Después de la incubación con el material a analizar, los anticuerpos marcados reactivos con el virus se agregan a los pocillos. Si el material a analizar realmente comprende el nuevo parvovirus porcino, este virus se uniría a los anticuerpos recubiertos en los pocillos del ELISA. Los anticuerpos marcados reactivos con el virus que posteriormente se agregarían a los pocillos a su vez se unirían al virus y una reacción de color revelaría la presencia de material antigénico del virus.

45 Por lo tanto, también se describen kits de prueba de diagnóstico para la detección de un virus o material antigénico del virus, que comprenden anticuerpos reactivos con un virus o con material antigénico del mismo. El material antigénico del virus debe interpretarse en un sentido amplio. Puede ser, por ejemplo, el virus en forma desintegrada, o material de la envoltura del virus que comprende proteínas de membrana externa del virus. Mientras el material del virus reaccione con el antisuero producido contra el virus, el material se considera un material antigénico.

50 Un kit de prueba de diagnóstico basado en la detección en suero de anticuerpos reactivos con el virus o material antigénico del virus y, por lo tanto, adecuado para la detección de infección por parvovirus porcino asociado al SHI también puede comprender, por ejemplo, una prueba ELISA convencional. En dicha prueba, las paredes de los pocillos de una placa ELISA pueden recubrirse, por ejemplo, con el virus o material antigénico del mismo después de la incubación con el material a analizar, por ejemplo, suero de un animal sospechoso de estar infectado con el nuevo parvovirus porcino, los anticuerpos marcados reactivos con el virus se agregan a los pocillos. Si los anticuerpos anti-parvovirus porcino asociados al SHI estuvieran presentes en el suero analizado, estos anticuerpos se unirían a los virus recubiertos en los pocillos del ELISA. Como consecuencia, los anticuerpos marcados añadidos posteriormente que reaccionan con el virus no se unirían y no se encontraría ninguna reacción de color. La falta de reacción de color revelaría la presencia de anticuerpos reactivos con el virus.

60 Por lo tanto, también se describen kits de prueba de diagnóstico para la detección de anticuerpos reactivos con el virus o con material antigénico del virus que comprende el virus o material antigénico del mismo.

65 El diseño del inmunoensayo puede variar. Por ejemplo, el inmunoensayo puede basarse en la competencia o reacción directa. Además, los protocolos pueden usar soportes sólidos o pueden usar material celular. La detección del complejo anticuerpo-antígeno puede implicar el uso de anticuerpos marcados; los marcadores pueden ser, por ejemplo, enzimas, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas o colorantes.

Los métodos adecuados para la detección de anticuerpos reactivos con un virus en la muestra incluyen, además del ELISA mencionado anteriormente, el ensayo inmunofluorescencia (EIF) y análisis por transferencia de Western.

5 Una prueba de diagnóstico alternativa pero rápida y fácil para diagnosticar la presencia o ausencia de un virus es una prueba de PCR como se mencionó anteriormente, que comprende un conjunto de cebadores de PCR reactivo con una región específica del gen de la CP o de la NS1 de parvovirus porcino asociado al SHI. Específico en este contexto significa único para, por ejemplo, el gen de la CP o de la NS1 del parvovirus porcino asociado al SHI, es decir, no está presente en otros miembros de la familia *Parvoviridae*.

10 Tal prueba usaría el conjunto de cebadores (SEQ ID NO: 5-6) que reacciona específicamente con la proteína de la cápside del virus o el conjunto de cebadores (SEQ ID NO: 7-8) específicamente reactivos con la NS1 del virus.

15 No hace falta decir, que se pueden usar más cebadores que los cebadores identificados anteriormente. La presente invención proporciona por primera vez la secuencia única del gen de la CP y de la NS1 del parvovirus porcino asociado al SHI. Esto permite que el experto en la materia seleccione, sin ningún esfuerzo adicional, otros cebadores selectivos. Mediante un simple análisis computacional de la secuencia génica de la CP o de la NS1 del parvovirus porcino asociado al SHI proporcionada por la presente invención con él, conocido, den de la CP o de la NS1 de otros miembros de la familia del parvovirus porcino *Parvoviridae* no asociados al SHI, el experto en la materia puede desarrollar otros cebadores de PCR específicos para pruebas de diagnóstico para la detección de un parvovirus porcino asociado al SHI y/o la discriminación entre un parvovirus porcino asociado al SHI y otros patógenos víricos (porcinos).

20 Se entiende que los cebadores de PCR que reaccionan específicamente con el ge de la CP o el gen de la NS1 del parvovirus porcino asociado al SHI son aquellos cebadores que reaccionan solo con el gen de la CP o el gen de la NS1 del parvovirus porcino asociado al SHI y no con el gen de la CP o el gen de la NS1 otro virus patógeno (porcino), o del grupo de virus patógenos (porcino).

25 Por lo tanto, también se describe un kit de prueba de diagnóstico para la detección de un virus, en donde dicho kit de prueba comprende un conjunto de cebadores de PCR que es específicamente reactivo con una región del gen de la CP o el gen de la NS1 del parvovirus porcino asociado al SHI.

30 La invención se refiere a un kit de prueba de diagnóstico para la detección de un virus, caracterizado porque dicha prueba comprende el conjunto de cebadores como se representa en la SEQ ID NO: 5-6 o el conjunto de cebadores como se representa en la SEQ ID NO: 7-8.

## 35 Ejemplos

### Ejemplo 1: Análisis del conjunto de muestras 1 de animales enfermos.

Descripción del conjunto de muestras 1

40 Conjunto de muestras 1: 17 animales, 16 cerdos machos / 1 hembra, de 18-27 semanas de edad. 7 granjas. Recibido el 31 de julio de 2013. Síntomas clínicos: Los animales de repente desarrollaron distensión abdominal, algunos gritaron antes de morir. No se observaron síntomas durante las semanas previas a la muerte. El tiempo entre la observación de los primeros síntomas y la muerte fue de 2-6 horas. Después del inicio de los síntomas, los animales fueron sacrificados por electrocución y se les realizó una necropsia.

45 Síntomas de los órganos: Anomalías en el intestino delgado. Síntomas hemorrágicos, pared intestinal delgada, líquido sanguinolento en los intestinos. No hay anomalías en otros órganos, salvo los ganglios linfáticos agrandados, edémicos y de aspecto rojo. Véase la figura 3.

50 Los órganos se congelaron a -70 °C. El suero se preparó a partir de sangre coagulada mediante centrifugación a 3000 xg y posterior almacenamiento a -70 °C.

Protocolos de PCR:

55 El ADN aislado se cribó por PCR usando cebadores derivados de las secuencias víricas (tabla 1). Las PCR se realizaron utilizando métodos estándar con una temperatura de hibridación de 58 °C para el conjunto de cebadores Bowl\_ORF1\_774\_F / 1626R, y de 52 °C para el conjunto de cebadores Bowl\_Q\_ORF2\_FW / REV. Se diseñó una sonda para la Q-PCR (tabla 1). La Q-PCR se realizó utilizando un método estándar con una temperatura de hibridación de 50 °C. Los datos de Q-PCR se analizaron utilizando Bio-Rad CFX Manager 2.0.

60

**Tabla 1: Secuencias del cebador Bowl**

Cebador/sonda:	Secuencia (5'-3'):
Bowl_ORF1_774_F	TGTTGAGTGTGGTGGATTGG
Bowl_ORF1_1626_R	AAGGAAGCTGGACCGAGAG

(continuación)

Cebador/sonda:	Secuencia (5'-3'):
Bowl_Q_ORF2_FW	CTACATCTGCGCCTGAC
Bowl_Q_ORF2_REV	GTGGTGAGAAGGCAAGAC
Bowl_Q_ORF2_PROBE	6FAM-CACGAGCTAGAGCGTGCTAAACAG-BHQ1

Resultados del análisis de PCR:

5 Los resultados del análisis por PCR se representan en la Tabla 2. En total, el 76 % de las muestras resultó ser positivo.

**Tabla 2: Análisis de resultados de muestras del conjunto 1. (+): positivo para el parvovirus nuevo. (-) negativo para el parvovirus nuevo**

	Número del animal																	puntuación total	porcentaje		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17				
<b>Sexo</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	F	M	M	M	M	M	M	M				
<b>Edad (semanas)</b>	19	23	23	18	20	19	18	23	26	18	23	20	23	18	25	22	27				
<b>Localización</b>	13-3A	13-3A	13-3A	10-3A	10-3A	3-3	3-3	13-3A	5-3	10-3A	13-3A	10-3A	12-3B	12-3B	12-33	8-3	11-3B				
suero	-	-	+	-	n/a	-	-	+	-	-	n/a	n/a	-	+	-	+	+			5/14	36
frotis rectal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			1/17	6
sangre	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+			8/17	47
ganglio linfático	-	+	-	+	-	n/a	n/a	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	12/15	80		
en conjunto	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13/17	76		

10

**Ejemplo 2: Análisis del conjunto de muestras 2 de animales enfermos.**

Descripción del conjunto de muestras 2

15 16 animales, 13 cerdos machos / 3 hembra, de 12-26 semanas de edad. 7 granjas, 4 granjas adicionales en comparación con el conjunto de muestras 1 (total de 11 granjas en el conjunto de muestras 1 + 2). Recibido el 22 de agosto de 2013.

20 Síntomas clínicos: Los animales de repente desarrollaron distensión abdominal, algunos gritaron antes de morir. No se observaron síntomas durante las semanas previas a la muerte. El tiempo entre la observación de los primeros síntomas y la muerte fue de 2-6 horas. Después del inicio de los síntomas, los animales fueron sacrificados por electrocución previa y se les realizó una necropsia.

25 Síntomas de los órganos: Anomalías en el intestino delgado. Síntomas hemorrágicos, pared intestinal delgada, líquido sanguinolento en los intestinos. No hay anomalías en otros órganos, salvo los ganglios linfáticos agrandados, edémicos y de aspecto rojo. Véase la figura 3. No se analizaron todos los ganglios linfáticos y muestras de sangre.

30 Los órganos se congelaron a -70 °C. El suero se preparó a partir de sangre coagulada mediante centrifugación a 3000 xg y posterior almacenamiento a -70 °C.

Protocolos de PCR:

35 El ADN aislado se cribó por PCR usando cebadores derivados de las secuencias víricas (tabla 1). Las PCR se realizaron utilizando métodos estándar con una temperatura de hibridación de 58 °C para el conjunto de cebadores Bowl\_ORF1\_774\_F / 1626R, y de 52 °C para el conjunto de cebadores Bowl\_Q\_ORF2\_FW / REV. Se diseñó una sonda para la Q-PCR (tabla 1). La Q-PCR se realizó utilizando un método estándar con una temperatura de hibridación de 50 °C. Los datos de Q-PCR se analizaron utilizando Bio-Rad CFX Manager 2.0.

Resultados del análisis de PCR:

40 Los resultados del análisis por PCR se representan en la Tabla 3. En total, el 25 % de las muestras resultó ser positivo. La sangre no fue analizada. Solo se analizaron dos ganglios linfáticos.

45 **Tabla 3: Análisis de resultados de muestras del conjunto 2. (+): positivo para el parvovirus nuevo. (-) negativo para el parvovirus nuevo**

	Número del animal																puntuación total	porcentaje
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
<b>Sexo</b>	M	F	F	F	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M		
<b>Edad (semanas)</b>	19	12	23	22	26	26	24	18	18	22	22	20	20	24	21	22		
<b>Localización</b>	17-E	9-3B	9-3B	9-3B	12-3B	12-3B	12-3B	13-3B	13-3B	13-3A	13-3A	3-3	3-3	1-3B	1-3B	1-3B		
suero	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	4/16	25
frotis rectal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1/16	6
sangre	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0/0	0
ganglio linfático	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	-	n/a	+	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1/2	50
en conjunto	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	4/16	25

**Ejemplo 3: Replicación de nuevos parvovirus en cerdos**

5 *Preparación del material animal:*

El material de órganos y las heces congeladas de los conjuntos de muestras 1 y 2 se almacenaron a -70 °C antes del análisis. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en hielo. Los órganos se descongelaron y posteriormente se homogeneizaron (10 % p/v) en medio de cultivo de tejidos. El homogeneizado se congeló y descongeló una vez (-70 °C). Posteriormente, homogeneizado se centrifugó y se filtró en filtros de 5 µm, 0,45 µm y 0,22 µm para eliminar el material tisular restante. El homogeneizado filtrado se almacenó a -70 °C hasta la inoculación.

15 Los inóculos (A o B) se administraron como una dosis IM de 4 x 2 ml (4 órganos diferentes, cuello izquierdo, cuello derecho, pierna izquierda, pierna derecha) y una dosis oral de 20 ml (homogeneizado de 10 heces + 4 x 2,5 ml de homogeneizado de diferentes órganos). Los inóculos se administraron a temperatura ambiente.

Inóculo A: Conjunto de muestras 2 de animal 10 (véase el Ejemplo 2)  
Heces, ganglios linfáticos, pulmón, bazo, intestino

20 Inóculo B: Conjunto de muestras 1 de animal 2 (véase el Ejemplo 1)  
Heces, ganglios linfáticos, pulmón, riñón, hígado

*Animales*

25 Se criaron y cebaron trece cerdos (5 verracos / 8 cerdas / raza local / alto estado de salud / SPF / 12-14 semanas de vida al momento de la inoculación) en la granja de MSD en Stevensbeek, en los Países Bajos y enjaulados de acuerdo con directrices institucionales. Los animales fueron examinados para detectar la presencia del nuevo parvovirus en suero, heces, frotis nasales y frotis oculares antes de la inoculación tal como se describe en el Ejemplo 1. Un animal macho fue sacrificado como animal control (no infectado). Los otros doce cerdos fueron enjaulados en 30 3 grupos separados.

*Tratamiento*

Grupo 1: Cinco animales

35 Tres animales recibieron el inóculo A, dos sirvieron como controles de contacto

Grupo 2: Cuatro animales

40 Tres animales recibieron el inóculo B, dos sirvieron como controles de contacto

Grupo 3: Tres animales

Tres animales recibieron el inóculo B

45

*Muestreo y necropsia*

Grupo 1, 2:

50 Muestras de sangre, frotis rectales/nasales/oculares los días -3, 0, 7, 14, 21, 28 después de la inoculación (si no se sacrificaron) Frotis rectales/nasales/oculares los días 3, 10, 17, 24 después de la inoculación (si no se sacrificaron)

Grupo 3:

Muestras de sangre, Frotis rectales/nasales/oculares el día -4, 0, 3, 6 después de la inoculación (si no se sacrifica)

5 Según los resultados de la PCR, los animales fueron programados para necropsia:

Grupo 1:

10 Inoculado: día 10 p.i.; día 25 p.i.; día 31 p.i.  
Control: día 18 p.i.; día 31 p.i.

Grupo 2:

15 Inoculado: día 14 p.i.; día 29 p.i. (2 animales)  
Control: día 22 p.i.

Grupo 3:

Inoculado: día 4 p.i. (1 animal); día 7 p.i. (2 animales).

## 20 Resultados

### PCR

25 Conjunto de muestras 2 del Animal 10 utilizado para el inóculo:  
Todos los órganos dieron positivo para el nuevo parvovirus: Heces, ganglios linfáticos, pulmón, bazo, intestino, riñón, hígado

30 Conjunto de muestras 1 del Animal 2 utilizado para el inóculo:  
Todos los órganos dieron positivo para el nuevo parvovirus: Heces, ganglios linfáticos, pulmón, riñón, hígado

### Experimento animal

Resultado de la PCR en frotis/sueros: Tabla 4A-BC

35 Se tomaron muestras de órganos para histología, para análisis de PCR y para aislamiento del virus. Los órganos para el aislamiento del virus se almacenaron a -70 ° C. Los ganglios linfáticos hepáticos (homogeneizados al 10 %) se analizaron mediante PCR.

40 Grupo 1: suero de todos los animales inoculados + (positivo) el día 7  
Suero del control - (negativo) el día 7  
Frotis: véase la Tabla 4A  
Grupo 2: suero de todos los animales inoculados + el día 7  
Suero de control - el día 7  
Frotis: véase la Tabla 4B  
45 Grupo 3: suero de todos los animales inoculados + el día 4  
Frotis: véase la Tabla 4C

Órgano necropsiado	Resultados de PCR	
	d. 10 p.i. (inóculo A. grupo 1)	d. 14 p.i. (inóculo B. grupo 2)
Suero	positivo	positivo
Bazo	positivo	positivo
Ganglios linfáticos mesentéricos	positivo	positivo
Ganglio linfático hepático	positivo	positivo
Ganglio linfático inguinal	positivo	positivo
Pulmón	positivo	positivo
Amígdala	positivo	positivo
Riñón	positivo	positivo
Mucosa nasal	positivo	positivo
Intestino grueso	positivo	positivo
hígado	positivo	positivo
Intestino delgado	positivo	positivo
Estómago	positivo	positivo

(continuación)

Órgano necropsiado	d. 10 p.i. (inóculo A. grupo 1)	d. 14 p.i. (inóculo B. grupo 2)
Cerebro	positivo	positivo
Bilis	débilmente positivo	débilmente positivo
50 % de contenido de intestino delgado	no detectado	no detectado
25 % de contenido de intestino grueso	no detectado	no detectado
Orina	no detectado	no detectado

*Resultados de ganglios linfáticos*

5 Los ganglios linfáticos hepáticos de los 13 animales recolectados en el momento de la necropsia se homogeneizaron al 10 % (p/v) en medio de cultivo. El ADN se aisló del homogeneizado y la presencia de virus se analizó por PCR. El ganglio linfático de control fue negativo para el nuevo parvovirus, los 12 cerdos inoculados o de control fueron positivos para virus.

10 Conclusión:

Basándose en los datos presentados anteriormente, se puede concluir que el nuevo parvovirus se replica en los cerdos.

15 La vía de transmisión más probable es oral/nasal a través del contacto directo, pero la transmisión oral/fecal y la transmisión a través del aire no pueden excluirse. Sin embargo, la excreción fecal es limitada.

El virus se encuentra en múltiples órganos.

20 Basándose en los resultados combinados en el Ejemplo 1-3, se espera que en un subconjunto de animales; en aproximadamente el 1-2 % del total de animales infectados, la infección con el nuevo parvovirus causa la enfermedad en el momento de la aparición del virus en la sangre (viremia). La excreción en las heces es mínima, pero el virus permanece presente en la sangre > 30 días después de la infección. También los frotis nasales y oculares siguen siendo positivos para PCR > 30 días después de la infección.

25 En los cerdos infectados, tal como se describe en el Ejemplo 3, no se observó síndrome hemorrágico intestinal, pero esto era de esperar, basándose en una baja incidencia de la enfermedad; el 1-2% en la población general y en el hecho de que los animales utilizados en el Ejemplo 3 eran relativamente jóvenes y en excelentes condiciones. Además de los cerdos en una granja comercial, no tenían factores de riesgo predisponentes.

30 **Tabla 4A: Resultados del grupo 1: 3 animales infectados y 2 controles, Inóculo A**

		día después de la inoculación									
Animal	Muestra	-3	0	3	7	10	14	17	21	24	28
BOWL 1	R	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
BOWL 1	N	-	-	-	++	-	+	+	+	-	-
BOWL 1	O	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
BOWL 1	S	n/a	-	n/a	+	n/a	+	n/a	+	n/a	+
BOWL 2	R	-	-	-	+	-					
BOWL 2	N	-	-	-	+	+					
BOWL 2	O	-	-	-	+	-					
BOWL 2	S	n/a	-	n/a	+	+					
BOWL 3	R	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BOWL 3	N	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
BOWL 3	O	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
BOWL 3	S	n/a	-	n/a	+	n/a	+	n/a	+	n/a	+
control 1	R	-	-	-	-	-	-	-			
control 1	N	-	-	-	+	-	-	+			
control 1	O	-	-	-	+	-	-	+			
control 1	S	n/a	-	n/a	-	n/a	+	n/a			
control 2	R	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
control 2	N	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
control 2	O	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
control 2	S	n/a	-	n/a	-	n/a	+	n/a	+	n/a	+

El nuevo parvovirus porcino se conoce como "BOWL".

R: frotis rectal  
 N: frotis nasal  
 O: frotis ocular  
 S: suero  
 n/a: no analizado (no muestreado)

5

Tabla 4B: Resultados del grupo 2: 3 animales infectados y 1 control, Inóculo B

Animal	Muestra	día después de la inoculación									
		-3	0	3	7	10	14	17	21	24	28
BOWL 1	R	-	-	-	-	+	-				
BOWL 1	N	-	-	-	+	+	+				
BOWL 1	O	-	-	-	+	+	+				
BOWL 1	S	n/a	-	n/a	+	n/a	+				
BOWL 2	R	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BOWL 2	N	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
BOWL 2	O	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
BOWL 2	S	n/a	-	n/a	+	n/a	+	n/a	+	n/a	+
BOWL 3	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BOWL 3	N	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
BOWL 3	O	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
BOWL 3	S	n/a	-	n/a	+	n/a	+	n/a	+	n/a	+
control 1	R	-	-	-	-	+	-	-	-		
control 1	N	-	-	-	+	+	-	+	+		
control 1	O	-	-	-	+	-	+	+	-		
control 1	S	n/a	-	n/a	-	-	n/a	+	n/a	+	

10 El nuevo parvovirus porcino se conoce como "BOWL".

R: frotis rectal

N: frotis nasal

15

O: frotis ocular

S: suero

20

n/a: no analizado (no muestreado)

Tabla 4C: Resultados grupo 3: 3 animales infectados, Inóculo B

Animal	Muestra	día después de la inoculación			
		-4	0	3	6
BOWL 1	R	-	-	-	-
BOWL 1	N	-	-	-	+
BOWL 1	O	-	-	-	+
BOWL 1	S	-	-	+	+
BOWL 2	R	-	-	-	-
BOWL 2	N	-	-	-	-
BOWL 2	O	-	-	-	-
BOWL 2	S	-	-	+	-
BOWL 3	R	-	-	-	-
BOWL 3	N	-	-	-	+
BOWL 3	O	-	-	-	-
BOWL 3	S	-	-	+	+

25 El nuevo parvovirus porcino se conoce como "BOWL".

25

R: frotis rectal

N: frotis nasal

O: frotis ocular

S: suero

30

n/a: no analizado (no muestreado)

Leyenda de las figuras

- 5 Figura 1: árbol filogenético que indica la relación de la NS1 del nuevo parvovirus porcino, con la NS1 de otros parvovirus. El nuevo parvovirus porcino se conoce como "BOWL".  
 Figura 2: árbol filogenético que indica la relación de la proteína de la cápside del nuevo parvovirus porcino, con la proteína de la cápside de otros parvovirus. El nuevo parvovirus porcino se conoce como "BOWL".  
 Figura 3: ejemplo de síndrome hemorrágico del intestino como se ve en el conjunto de muestras 1 y 2

10 **Referencias bibliográficas**

- 1) [http://www.merckmanuals.com/vet/digestive\\_system/intestinal\\_diseases\\_in\\_pigs/hemorrhagic\\_bowel\\_syndrome\\_in\\_pigs.html](http://www.merckmanuals.com/vet/digestive_system/intestinal_diseases_in_pigs/hemorrhagic_bowel_syndrome_in_pigs.html)
- 2) Häni et al. (1993) Schweiz Arch Tierheilkd. 135:117-124
- 15 3) [http://www.pork.org/filelibrary/Factsheets/PIGFactsheets/NEWfactSheets/04-01-01\\_g.pdf](http://www.pork.org/filelibrary/Factsheets/PIGFactsheets/NEWfactSheets/04-01-01_g.pdf)
- 4) Streck et al., Journal of General Virology 92: 2628-2636 (2011)
- 5) Ren et al., Virus research 178: 392-397 (2013)
- 6) Xiao et al., Veterinary Microbiology 161: 325-330 (2013)
- 7) Opriessnig et al., Veterinary Microbiology 163: 177-183 (2013)
- 20 8) Chenbin Li et al., Archives of Virology 158: 1987-1991 (2013)
- 9) Xiao et al., Veterinary Microbiology 160: 290-296 (2012)
- 10) Cadar et al., Archives of Virology 156: 2233-2239 (2011)
- 11) Lau et al., Journal of General Virology 89: 1840-1848 (2008)
- 12) Cheung et al., Archives of Virology 155: 801-806(2010)
- 25 13) Huang et al., Virology Journal 7: 333-336 (2010)
- 14) Cheung et al., Archives of Virology 156: 2071-2078 (2011)
- 15) Xiao et al., PLoS One 8: e65312. (2013)
- 16) Xiao et al., Genome Announcements 1:e00021-12. (2013)
- 17) Cheng et al., PLoS One 5: e13583. (2010)
- 30 18) Martínez et al., Vaccine 10: 684-690 (1992)
- 19) Casal et al., Biotechnology and Applied Biochemistry 29: 141-150 (1999)
- 20) Zhou et al, Virology Journal 7: 366 (2010)
- 21) Hao Feng, PlosOne; 17 de enero de 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.007957
- 22) Saliki et al., Journ. Gen. Virol. 73: 369-74 (1992)
- 35 23) Brown et al., Journ. of Virol. 65: 2702 (1991)
- 24) Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual. por David R. O'Reilly, Lois K. Miller y Verne A. Luckow. Editorial: Oxford University Press, ISBN-10 de EE. UU.: 0195091310 (23 de septiembre de 1993), ISBN-13: 978-0195091311 (mayo de 1994).
- 25) Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols. En: Methods in Molecular Biology™, Volumen 388 (2007). Editores: David W. Murhammer. ISBN: 978-1-58829-537-8 (impresión) 978-1-59745-457-5 (en línea)
- 40 26) Fujisaki, Y., y Murikami, Y (1982). "Immunity to infection with porcine parvovirus in pigs inoculated with attenuated HT-strain". Natl Inst Anim Health (Tokyo) 22: 36-37
- 27) Chen et al., Virology Journal 8:307 (2011)
- 28) Mayer et al., Vaccine 22: 317-328 (2004)
- 45 29) Production of recombinant proteins: novel microbial and eukaryotic expression systems por Gerd Gellissen, ISBN: 3-527-31036-3
- 30) Gerdts et al, Journal of General Virology 78: 2139-2146 (1997)
- 31) Gorres et al., Clinical Vaccine Immunology 18: 1987-1995 (2011)
- 32) Paul y Mengeling, Am. J. Vet. Res.: 41: 2007-2011 (1980)
- 50 33) Paul y Mengeling, Am. J. Vet. Res.: 45: 2481-2485 (1984)
- 34) Fujisaki e y Murakami, Nat. Inst. of Animal Health quarterly (Tokyo) 22: 36-37 (1982)
- 35) Mayer y Walter, eds. Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology, Academic Press, Londres, 1987)
- 36) Kohler y Milstein, Nature, 256: 495-497 (1975)
- 55 37) Qiu et al., J. Virol. 79: 11035-11044 (2005)
- 38) Wang et al., J. Virol. Meth. 200: 41-46 (2014)
- 39) Guan et al., J. Virol. 83: 9541-9553 (2009)

LISTADO DE SECUENCIAS

- 60 <110> Intervet International B.V. <120> Nuevo parvovirus porcino
- <130> 23755 <160> 10
- 65 <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 771 850 T3

<210> 1  
 <211> 3570  
 <212> ADN  
 <213> Parvovirus porcino

5

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(3570)

10 <400> 1

```

atg agc cgt tct act caa aga gat ctt tgg tct ttg tta agg gag aga      48
Met Ser Arg Ser Thr Gln Arg Asp Leu Trp Ser Leu Leu Arg Glu Arg
1                               5                               10                               15

ctt gaa agg tat aag gat cga gtt aaa tat tat ggt att ttg gtg cca      96
Leu Glu Arg Tyr Lys Asp Arg Val Lys Tyr Tyr Gly Ile Leu Val Pro
20                               25                               30

gaa cgt cct tct acc tta gca tct tat ttt agt aaa gac cca cct cca      144
Glu Arg Pro Ser Thr Leu Ala Ser Tyr Phe Ser Lys Asp Pro Pro Pro
35                               40                               45

gat cct cca act gtt aaa ttt gat aaa ccc tat cag gat gta gat aga      192
Asp Pro Pro Thr Val Lys Phe Asp Lys Pro Tyr Gln Asp Val Asp Arg
50                               55                               60

ttc tgg ttt cca aca gac gat tat agt gac tgg tat gtc tgg cat gga      240
Phe Trp Phe Pro Thr Asp Asp Tyr Ser Asp Trp Tyr Val Trp His Gly
65                               70                               75

gag gac aga cct cct aga ttt acc gag cat tcc ggt gtt cag ggt ttt      288
Glu Asp Arg Pro Pro Arg Phe Thr Glu His Ser Gly Val Gln Gly Phe
85                               90                               95

aaa act agg tgt gag ggg ggg ctt cct tta atg ccc agt gat ccc aaa      336
Lys Thr Arg Cys Glu Gly Gly Leu Pro Leu Met Pro Ser Asp Pro Lys
100                              105                              110

ttt tgc ccc ata caa aat ttt tgg gat cag ttc gct aat ttt gat gag      384
Phe Cys Pro Ile Gln Asn Phe Trp Asp Gln Phe Ala Asn Phe Asp Glu
115                              120                              125

ggg tct ccg tcc acc cag atc ggt gag agt gtt tca tgg agt gat cat      432
Gly Ser Pro Ser Thr Gln Ile Gly Glu Ser Val Ser Trp Ser Asp His
130                              135                              140

ttt gga agt ccc gat ccc tct cat cat cag gag gtg agg gat gct gat      480
Phe Gly Ser Pro Asp Pro Ser His His Gln Glu Val Arg Asp Ala Asp
145                              150                              155                              160
    
```

ES 2 771 850 T3

gaa gtt act tcc gag cgg cag caa tat aaa aat agg att gtc acc tta	528
Glu Val Thr Ser Glu Arg Gln Gln Tyr Lys Asn Arg Ile Val Thr Leu	
165 170 175	
tta aga aaa gtt tat tgg gct aag cag tgg tct ggg aaa tta caa att	576
Leu Arg Lys Val Tyr Trp Ala Lys Gln Trp Ser Gly Lys Leu Gln Ile	
180 185 190	
aat gtt cct tcc ctc gaa agc ctt tat gag cag atc ccc tat atg cta	624
Asn Val Pro Ser Leu Glu Ser Leu Tyr Glu Gln Ile Pro Tyr Met Leu	
195 200 205	
gcc tat atg gac gct gat aat tgg cgt cag aat ttg tta gct gct aaa	672
Ala Tyr Met Asp Ala Asp Asn Trp Arg Gln Asn Leu Leu Ala Ala Lys	
210 215 220	
act ctg cga acc act ttg gaa gca ttt tcc tgt gtt cca gat cct tcc	720
Thr Leu Arg Thr Thr Leu Glu Ala Phe Ser Cys Val Pro Asp Pro Ser	
225 230 235 240	
acg tgc gat gtc aca atc tcc aca ccc cta tct ggt gaa acg gat ccc	768
Thr Cys Asp Val Thr Ile Ser Thr Pro Leu Ser Gly Glu Thr Asp Pro	
245 250 255	
gcc tct ttt gca aaa tac tta tgt tcc ctt gta tgc aac agg tct caa	816
Ala Ser Phe Ala Lys Tyr Leu Cys Ser Leu Val Cys Asn Arg Ser Gln	
260 265 270	
gaa aaa gaa cag gcg cag acg cct tct ttg tct cca tct aaa caa gaa	864
Glu Lys Glu Gln Ala Gln Thr Pro Ser Leu Ser Pro Ser Lys Gln Glu	
275 280 285	
ggg cag atg tca agt cct gat tct gca tcg atc tcc caa cct ccc cct	912
Gly Gln Met Ser Ser Pro Asp Ser Ala Ser Ile Ser Gln Pro Pro Pro	
290 295 300	
gaa agt cac aag gat aga ctg ctt cct aaa act gat ccc ctt cag gaa	960
Glu Ser His Lys Asp Arg Leu Leu Pro Lys Thr Asp Pro Leu Gln Glu	
305 310 315 320	
gca ggg ccc att ccc gct ccc ccc aca gct cag aag cct att atc tct	1008
Ala Gly Pro Ile Pro Ala Pro Pro Thr Ala Gln Lys Pro Ile Ile Ser	
325 330 335	
aag ggt gca ggc ggt gga ggg tct tct ggc ttc ata atc cct cca aaa	1056
Lys Gly Ala Gly Gly Gly Ser Ser Gly Phe Ile Ile Pro Pro Lys	
340 345 350	
cct cct agc ccc gat cac cct aaa gat ccc ccc cct cct cct ccc	1104
Pro Pro Ser Pro Asp His Pro Lys Asp Pro Pro Pro Pro Pro Pro	
355 360 365	
tct cca att cct cct tct aca tct gcg cct gac gca gaa aag cac gag	1152
Ser Pro Ile Pro Pro Ser Thr Ser Ala Pro Asp Ala Glu Lys His Glu	
370 375 380	
cta gag cgt gct aaa cag gag aaa caa gag gaa gat gag ctc atg cac	1200
Leu Glu Arg Ala Lys Gln Glu Lys Gln Glu Glu Asp Glu Leu Met His	
385 390 395 400	
aga atc aaa tca gga gaa gga gaa gga gaa cga gga ggc ctc gtc ttg	1248
Arg Ile Lys Ser Gly Glu Gly Glu Gly Glu Arg Gly Gly Leu Val Leu	
405 410 415	

ES 2 771 850 T3

cct tct cac cac tac act ggt cct aga aat cct gtc cca gct ggc aag	1296
Pro Ser His His Tyr Thr Gly Pro Arg Asn Pro Val Pro Ala Gly Lys	
420 425 430	
cct gct gac ccc gtt gat gaa tct tct gcg aga cat gac atc agg tat	1344
Pro Ala Asp Pro Val Asp Glu Ser Ser Ala Arg His Asp Ile Arg Tyr	
435 440 445	
ggg caa cgt ctt aaa cat gga gac tgg cca tac ctg tgg ggg aag gac	1392
Gly Gln Arg Leu Lys His Gly Asp Trp Pro Tyr Leu Trp Gly Lys Asp	
450 455 460	
ttg gat aat gct cag cga gat gag att atc aaa gct ctt cat agt cat	1440
Leu Asp Asn Ala Gln Arg Asp Glu Ile Ile Lys Ala Leu His Ser His	
465 470 475 480	
gtc aaa gtg gga acc caa ttg gca ggg aat ata gtg agg agt att tgg	1488
Val Lys Val Gly Thr Gln Leu Ala Gly Asn Ile Val Arg Ser Ile Trp	
485 490 495	
aag gct aag gag ctc tta aca gaa cct gtg tat gag ctg tta aag tct	1536
Lys Ala Lys Glu Leu Leu Thr Glu Pro Val Tyr Glu Leu Leu Lys Ser	
500 505 510	
att ctc cct cct tca gat tta tct aaa gtt cct ctt cct cat tcc caa	1584
Ile Leu Pro Pro Ser Asp Leu Ser Lys Val Pro Leu Pro His Ser Gln	
515 520 525	
cag aca gac aga aca gaa gat cca gaa act cca ggg gag act aga gga	1632
Gln Thr Asp Arg Thr Glu Asp Pro Glu Thr Pro Gly Glu Thr Arg Gly	
530 535 540	
act gga tca gac agt cct cga tct cct cgg cct tct gga tca act gaa	1680
Thr Gly Ser Asp Ser Pro Arg Ser Pro Arg Pro Ser Gly Ser Thr Glu	
545 550 555 560	
gac ggg gga ggt cct tct tcc gag tcc aga tta cct ggg act aaa gtt	1728
Asp Gly Gly Gly Pro Ser Ser Glu Ser Arg Leu Pro Gly Thr Lys Val	
565 570 575	
cca gta gac cca tct gcc acc acg tcc gaa gca aag agg cag agg act	1776
Pro Val Asp Pro Ser Ala Thr Thr Ser Glu Ala Lys Arg Gln Arg Thr	
580 585 590	
gag gag ggg atg gac ata tct tct tgc tgt cca ggg ggg att tct gct	1824
Glu Glu Gly Met Asp Ile Ser Ser Cys Cys Pro Gly Gly Ile Ser Ala	
595 600 605	
tct ggg gct gct tca aat aac tct ggt ctt gct tgt ggg ggt ggg ggg	1872
Ser Gly Ala Ala Ser Asn Asn Ser Gly Leu Ala Cys Gly Gly Gly Gly	
610 615 620	
ggg act aat tta ggg aca gaa tct ctt gta tcc ggc tgt cag ttt ggt	1920
Gly Thr Asn Leu Gly Thr Glu Ser Leu Val Ser Gly Cys Gln Phe Gly	
625 630 635 640	
aaa aac tct gtg atc act tca tct ttt aga cga tgt ctc att tca ccc	1968
Lys Asn Ser Val Ile Thr Ser Ser Phe Arg Arg Cys Leu Ile Ser Pro	
645 650 655	
tgg cct gat aaa tac tgt tgt tct tct gct cac gat ctt att ccc gga	2016
Trp Pro Asp Lys Tyr Cys Cys Ser Ser Ala His Asp Leu Ile Pro Gly	

ES 2 771 850 T3

660					665					670						
gtg	gtc	tac	gag	acc	cct	tgg	tgc	tat	tat	gat	ctg	aac	gtc	atc	tca	2064
Val	Val	Tyr	Glu	Thr	Pro	Trp	Cys	Tyr	Tyr	Asp	Leu	Asn	Val	Ile	Ser	
		675					680					685				
gca	cat	ttt	tct	cct	tct	gct	tgg	cag	agg	ctt	ttg	gag	gat	tat	gat	2112
Ala	His	Phe	Ser	Pro	Ser	Ala	Trp	Gln	Arg	Leu	Leu	Glu	Asp	Tyr	Asp	
	690					695					700					
gcc	ttt	cga	cct	aaa	tcc	ctt	aaa	gtt	acc	atc	cag	tct	tta	gtt	ttt	2160
Ala	Phe	Arg	Pro	Lys	Ser	Leu	Lys	Val	Thr	Ile	Gln	Ser	Leu	Val	Phe	
	705				710					715					720	
aaa	gat	gtc	tgt	caa	ggt	gca	gaa	aaa	caa	act	aca	gtt	cag	gat	tcc	2208
Lys	Asp	Val	Cys	Gln	Gly	Ala	Glu	Lys	Gln	Thr	Thr	Val	Gln	Asp	Ser	
			725						730					735		
cag	tca	gcc	acc	att	gct	atc	ttt	gag	gat	aaa	gac	tat	gac	tac	ccc	2256
Gln	Ser	Ala	Thr	Ile	Ala	Ile	Phe	Glu	Asp	Lys	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Pro	
			740					745					750			
tat	gtg	atg	gga	ggg	ggt	caa	aaa	aca	gtt	ccg	ggt	cac	ttg	ccc	ggt	2304
Tyr	Val	Met	Gly	Gly	Gly	Gln	Lys	Thr	Val	Pro	Gly	His	Leu	Pro	Gly	
		755					760						765			
caa	cct	tat	aat	ctt	ccc	aag	tat	tct	tac	aga	acc	ctt	ggt	tca	gtc	2352
Gln	Pro	Tyr	Asn	Leu	Pro	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Thr	Leu	Gly	Ser	Val	
	770					775					780					
aaa	gaa	agt	aat	agg	gcc	agt	atg	ggc	ggt	tca	ggg	tac	act	ttc	aaa	2400
Lys	Glu	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Met	Gly	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	
	785				790					795					800	
tcc	aat	caa	gat	acg	gaa	ttg	ttt	ctg	ctt	gaa	aca	cat	gat	gcc	act	2448
Ser	Asn	Gln	Asp	Thr	Glu	Leu	Phe	Leu	Leu	Glu	Thr	His	Asp	Ala	Thr	
				805					810					815		
ctt	att	cga	ggc	ggg	ggt	act	ttt	gag	cag	tac	tat	gaa	ttt	cca	aac	2496
Leu	Ile	Arg	Gly	Gly	Gly	Thr	Phe	Glu	Gln	Tyr	Tyr	Glu	Phe	Pro	Asn	
			820					825					830			
gat	ctt	cct	ttc	gaa	aat	ttg	act	cag	tat	cct	tgg	gat	atc	cgc	cgt	2544
Asp	Leu	Pro	Phe	Glu	Asn	Leu	Thr	Gln	Tyr	Pro	Trp	Asp	Ile	Arg	Arg	
		835				840							845			
cag	gat	aac	ccc	ctc	tat	cag	cag	agg	atc	act	gtc	atg	tca	ggt	tct	2592
Gln	Asp	Asn	Pro	Leu	Tyr	Gln	Gln	Arg	Ile	Thr	Val	Met	Ser	Gly	Ser	
	850					855					860					
gac	aga	gat	acg	gta	ggc	att	tta	gat	gga	gat	ttt	tac	tct	cct	ttt	2640
Asp	Arg	Asp	Thr	Val	Gly	Ile	Leu	Asp	Gly	Asp	Phe	Tyr	Ser	Pro	Phe	
	865				870					875					880	
cgg	ttc	aaa	ggt	cat	gat	aga	ccc	gcc	atg	tgg	ctg	cca	gga	cag	agg	2688
Arg	Phe	Lys	Gly	His	Asp	Arg	Pro	Ala	Met	Trp	Leu	Pro	Gly	Gln	Arg	
			885						890					895		
ttg	att	cag	ggc	aaa	ttc	ata	gat	acg	cac	cca	ata	ccc	aat	aca	ggg	2736
Leu	Ile	Gln	Gly	Lys	Phe	Ile	Asp	Thr	His	Pro	Ile	Pro	Asn	Thr	Gly	
			900					905					910			
agg	agt	ggg	ggt	cat	cct	aat	gat	ttt	cac	aca	agg	ggc	gat	ggt	cat	2784



ES 2 771 850 T3

cag tct ggt cct gct ttc att ctc gat caa gat ggc tac tac cgt 3519  
 Gln Ser Gly Pro Ala Phe Ile Leu Asp Gln Asp Gly Tyr Tyr Arg  
 1160 1165 1170

ctc cca gaa cat gtc tgg tct gcc agg gaa cgt atc cgc agc aaa 3564  
 Leu Pro Glu His Val Trp Ser Ala Arg Glu Arg Ile Arg Ser Lys  
 1175 1180 1185

cgc tag 3570  
 Arg

<210> 2  
 <211> 1189  
 <212> PRT  
 <213> Parvovirus porcino

5

<400> 2

Met Ser Arg Ser Thr Gln Arg Asp Leu Trp Ser Leu Leu Arg Glu Arg  
 1 5 10 15

Leu Glu Arg Tyr Lys Asp Arg Val Lys Tyr Tyr Gly Ile Leu Val Pro  
 20 25 30

Glu Arg Pro Ser Thr Leu Ala Ser Tyr Phe Ser Lys Asp Pro Pro Pro  
 35 40 45

Asp Pro Pro Thr Val Lys Phe Asp Lys Pro Tyr Gln Asp Val Asp Arg  
 50 55 60

Phe Trp Phe Pro Thr Asp Asp Tyr Ser Asp Trp Tyr Val Trp His Gly  
 65 70 75 80

Glu Asp Arg Pro Pro Arg Phe Thr Glu His Ser Gly Val Gln Gly Phe  
 85 90 95

Lys Thr Arg Cys Glu Gly Gly Leu Pro Leu Met Pro Ser Asp Pro Lys  
 100 105 110

Phe Cys Pro Ile Gln Asn Phe Trp Asp Gln Phe Ala Asn Phe Asp Glu  
 115 120 125

Gly Ser Pro Ser Thr Gln Ile Gly Glu Ser Val Ser Trp Ser Asp His  
 130 135 140

Phe Gly Ser Pro Asp Pro Ser His His Gln Glu Val Arg Asp Ala Asp  
 145 150 155 160

Glu Val Thr Ser Glu Arg Gln Gln Tyr Lys Asn Arg Ile Val Thr Leu  
 165 170 175

ES 2 771 850 T3

Leu Arg Lys Val Tyr Trp Ala Lys Gln Trp Ser Gly Lys Leu Gln Ile  
 180 185 190

Asn Val Pro Ser Leu Glu Ser Leu Tyr Glu Gln Ile Pro Tyr Met Leu  
 195 200 205

Ala Tyr Met Asp Ala Asp Asn Trp Arg Gln Asn Leu Leu Ala Ala Lys  
 210 215 220

Thr Leu Arg Thr Thr Leu Glu Ala Phe Ser Cys Val Pro Asp Pro Ser  
 225 230 235 240

Thr Cys Asp Val Thr Ile Ser Thr Pro Leu Ser Gly Glu Thr Asp Pro  
 245 250 255

Ala Ser Phe Ala Lys Tyr Leu Cys Ser Leu Val Cys Asn Arg Ser Gln  
 260 265 270

Glu Lys Glu Gln Ala Gln Thr Pro Ser Leu Ser Pro Ser Lys Gln Glu  
 275 280 285

Gly Gln Met Ser Ser Pro Asp Ser Ala Ser Ile Ser Gln Pro Pro Pro  
 290 295 300

Glu Ser His Lys Asp Arg Leu Leu Pro Lys Thr Asp Pro Leu Gln Glu  
 305 310 315 320

Ala Gly Pro Ile Pro Ala Pro Pro Thr Ala Gln Lys Pro Ile Ile Ser  
 325 330 335

Lys Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Phe Ile Ile Pro Pro Lys  
 340 345 350

Pro Pro Ser Pro Asp His Pro Lys Asp Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro  
 355 360 365

Ser Pro Ile Pro Pro Ser Thr Ser Ala Pro Asp Ala Glu Lys His Glu  
 370 375 380

Leu Glu Arg Ala Lys Gln Glu Lys Gln Glu Glu Asp Glu Leu Met His  
 385 390 395 400

Arg Ile Lys Ser Gly Glu Gly Glu Gly Glu Arg Gly Gly Leu Val Leu  
 405 410 415

Pro Ser His His Tyr Thr Gly Pro Arg Asn Pro Val Pro Ala Gly Lys  
 420 425 430

ES 2 771 850 T3

Pro Ala Asp Pro Val Asp Glu Ser Ser Ala Arg His Asp Ile Arg Tyr  
435 440 445

Gly Gln Arg Leu Lys His Gly Asp Trp Pro Tyr Leu Trp Gly Lys Asp  
450 455 460

Leu Asp Asn Ala Gln Arg Asp Glu Ile Ile Lys Ala Leu His Ser His  
465 470 475 480

Val Lys Val Gly Thr Gln Leu Ala Gly Asn Ile Val Arg Ser Ile Trp  
485 490 495

Lys Ala Lys Glu Leu Leu Thr Glu Pro Val Tyr Glu Leu Leu Lys Ser  
500 505 510

Ile Leu Pro Pro Ser Asp Leu Ser Lys Val Pro Leu Pro His Ser Gln  
515 520 525

Gln Thr Asp Arg Thr Glu Asp Pro Glu Thr Pro Gly Glu Thr Arg Gly  
530 535 540

Thr Gly Ser Asp Ser Pro Arg Ser Pro Arg Pro Ser Gly Ser Thr Glu  
545 550 555 560

Asp Gly Gly Gly Pro Ser Ser Glu Ser Arg Leu Pro Gly Thr Lys Val  
565 570 575

Pro Val Asp Pro Ser Ala Thr Thr Ser Glu Ala Lys Arg Gln Arg Thr  
580 585 590

Glu Glu Gly Met Asp Ile Ser Ser Cys Cys Pro Gly Gly Ile Ser Ala  
595 600 605

Ser Gly Ala Ala Ser Asn Asn Ser Gly Leu Ala Cys Gly Gly Gly Gly  
610 615 620

Gly Thr Asn Leu Gly Thr Glu Ser Leu Val Ser Gly Cys Gln Phe Gly  
625 630 635 640

Lys Asn Ser Val Ile Thr Ser Ser Phe Arg Arg Cys Leu Ile Ser Pro  
645 650 655

Trp Pro Asp Lys Tyr Cys Cys Ser Ser Ala His Asp Leu Ile Pro Gly  
660 665 670

Val Val Tyr Glu Thr Pro Trp Cys Tyr Tyr Asp Leu Asn Val Ile Ser

ES 2 771 850 T3

675	680	685																				
Ala	His	Phe	Ser	Pro	Ser	Ala	Trp	Gln	Arg	Leu	Leu	Glu	Asp	Tyr	Asp							
690						695					700											
Ala	Phe	Arg	Pro	Lys	Ser	Leu	Lys	Val	Thr	Ile	Gln	Ser	Leu	Val	Phe							
705					710					715					720							
Lys	Asp	Val	Cys	Gln	Gly	Ala	Glu	Lys	Gln	Thr	Thr	Val	Gln	Asp	Ser							
				725					730					735								
Gln	Ser	Ala	Thr	Ile	Ala	Ile	Phe	Glu	Asp	Lys	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Pro							
			740					745					750									
Tyr	Val	Met	Gly	Gly	Gly	Gln	Lys	Thr	Val	Pro	Gly	His	Leu	Pro	Gly							
		755					760					765										
Gln	Pro	Tyr	Asn	Leu	Pro	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Thr	Leu	Gly	Ser	Val							
	770					775					780											
Lys	Glu	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Met	Gly	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys							
785					790					795					800							
Ser	Asn	Gln	Asp	Thr	Glu	Leu	Phe	Leu	Leu	Glu	Thr	His	Asp	Ala	Thr							
				805					810					815								
Leu	Ile	Arg	Gly	Gly	Gly	Thr	Phe	Glu	Gln	Tyr	Tyr	Glu	Phe	Pro	Asn							
			820					825					830									
Asp	Leu	Pro	Phe	Glu	Asn	Leu	Thr	Gln	Tyr	Pro	Trp	Asp	Ile	Arg	Arg							
		835					840					845										
Gln	Asp	Asn	Pro	Leu	Tyr	Gln	Gln	Arg	Ile	Thr	Val	Met	Ser	Gly	Ser							
	850					855					860											
Asp	Arg	Asp	Thr	Val	Gly	Ile	Leu	Asp	Gly	Asp	Phe	Tyr	Ser	Pro	Phe							
865					870					875					880							
Arg	Phe	Lys	Gly	His	Asp	Arg	Pro	Ala	Met	Trp	Leu	Pro	Gly	Gln	Arg							
				885					890					895								
Leu	Ile	Gln	Gly	Lys	Phe	Ile	Asp	Thr	His	Pro	Ile	Pro	Asn	Thr	Gly							
			900					905					910									
Arg	Ser	Gly	Val	His	Pro	Asn	Asp	Phe	His	Thr	Arg	Gly	Asp	Gly	His							
		915					920					925										

ES 2 771 850 T3

Gly Asp Thr His Arg Thr His Glu Glu Arg Ile Tyr Ser Leu Asp Thr  
930 935 940

Gly Leu Ala Ala Met Pro Arg Ala Ala His Arg Pro Thr Leu Gln Pro  
945 950 955 960

Gly Pro Arg Thr Leu Ser His Ala Val Arg Arg Pro Asp Gly Ser Thr  
965 970 975

Val Val Thr Ala Asn Ala Cys Ala Tyr Ala Tyr Thr Gln Glu Asn Pro  
980 985 990

His Gln Glu Pro Trp Ser Asp Leu Asn Val Arg His Thr Met Tyr Arg  
995 1000 1005

Leu Ala Tyr Gln Arg Gln Lys Gly Phe Gln Gln Pro Gly Asp Pro  
1010 1015 1020

Leu His Ile Arg Thr His Ala Cys Tyr Gly Asp Gly Asp Val Thr  
1025 1030 1035

Ile Pro Lys Glu Glu Ser Leu Trp Pro Thr Val Leu Gly Ser Cys  
1040 1045 1050

Thr Glu Lys Ser Pro Ala Cys Leu Glu Ser Gln Ile Trp Cys Lys  
1055 1060 1065

Thr Pro Asn Val Asp Met Val Tyr Gly Glu His Thr Pro Pro Leu  
1070 1075 1080

Ala Leu Trp Gly Met His Ala Pro Pro Pro His Val Phe Leu Arg  
1085 1090 1095

Met Leu Ala Gln Glu Gly Pro Pro Asn Val Ser Thr Cys Arg Pro  
1100 1105 1110

Ala Gln Ser Gly Gln Thr Phe Ile Asn Gln Tyr Gly Gln Phe Leu  
1115 1120 1125

Leu Cys Phe Thr Met Val Trp Glu Val Lys Pro Arg Pro Lys Ser  
1130 1135 1140

Ile Lys Gln Trp Asn Pro Arg Pro Pro Ile Ser Ile Pro Val Gly  
1145 1150 1155

Gln Ser Gly Pro Ala Phe Ile Leu Asp Gln Asp Gly Tyr Tyr Arg  
1160 1165 1170

ES 2 771 850 T3

Leu Pro Glu His Val Trp Ser Ala Arg Glu Arg Ile Arg Ser Lys  
 1175 1180 1185

Arg

5 <210> 3  
 <211> 1989  
 <212> ADN  
 <213> Parvovirus porcino  
 10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1989)  
 <400> 3

```

atg tct cag acc ttc tgg acg ggt att tgc agg ctt ttc cct gat att      48
Met Ser Gln Thr Phe Trp Thr Gly Ile Cys Arg Leu Phe Pro Asp Ile
1          5          10          15

ggg aag att cct ggg gtg act cct gag cgg tat att tat gct gta aac      96
Gly Lys Ile Pro Gly Val Thr Pro Glu Arg Tyr Ile Tyr Ala Val Asn
          20          25          30

gtg agt acc cgt aat ggg caa aag tgg ccg aaa gtt ggg acc gag ggg      144
Val Ser Thr Arg Asn Gly Gln Lys Trp Pro Lys Val Gly Thr Glu Gly
          35          40          45

cca ttg gct gca ggt gtc tta cag ggg gag gcc ctt ttc cgt gag acc      192
Pro Leu Ala Ala Gly Val Leu Gln Gly Glu Ala Leu Phe Arg Glu Thr
          50          55          60

ctt aaa gag gtc cgg aag gtg tgc cgg ctg ccg caa gac ccc cat ctt      240
Leu Lys Glu Val Arg Lys Val Cys Arg Leu Pro Gln Asp Pro His Leu
65          70          75          80

ttc ttt caa ttg gag aaa gtt gat tcc aaa ggg ggt ctt cac ctt cat      288
Phe Phe Gln Leu Glu Lys Val Asp Ser Lys Gly Gly Leu His Leu His
          85          90          95

ttt tgt att agt gtt gct gct ggc act cct aga gat gtg tct tcg atg      336
Phe Cys Ile Ser Val Ala Ala Gly Thr Pro Arg Asp Val Ser Ser Met
          100          105          110

ttt aaa gcc att gag cgt cga gtt tcc ttt tac tac ttt ggt gta gag      384
Phe Lys Ala Ile Glu Arg Arg Val Ser Phe Tyr Tyr Phe Gly Val Glu
          115          120          125

ggc ttg act ttt ttt act cct cat aaa aat aag cat ggt gct tgg aag      432
Gly Leu Thr Phe Phe Thr Pro His Lys Asn Lys His Gly Ala Trp Lys
          130          135          140

agt aat gat gag ggc ttt att gtg aat tat ctt ctt aaa aaa ttg cct      480
Ser Asn Asp Glu Gly Phe Ile Val Asn Tyr Leu Leu Lys Lys Leu Pro
145          150          155          160

ttg tct gag tgt gtg tat gcg tgg act aat atg gat ggg gtg att ggc      528
Leu Ser Glu Cys Val Tyr Ala Trp Thr Asn Met Asp Gly Val Ile Gly
          165          170          175
    
```

ES 2 771 850 T3

gat gcc tgt ctg aat gaa gat aag cgc agg gaa ttg ttg tct gag cgt Asp Ala Cys Leu Asn Glu Asp Lys Arg Arg Glu Leu Leu Ser Glu Arg 180 185 190	576
caa gat cag gga gtc att aaa gag ctc act gct cct act ttt aaa gct Gln Asp Gln Gly Val Ile Lys Glu Leu Thr Ala Pro Thr Phe Lys Ala 195 200 205	624
gct acg ggt gat aaa atg ttg agt gtg gtg gat tgg atg tgt gat aat Ala Thr Gly Asp Lys Met Leu Ser Val Val Asp Trp Met Cys Asp Asn 210 215 220	672
gat gtg act acg gag cgc cga tgg gag gaa ata tcg gct gcg tcc ctg Asp Val Thr Thr Glu Arg Trp Glu Glu Ile Ser Ala Ala Ser Leu 225 230 235 240	720
tac tct ttc ctt gct acc cca gct ggc act cat ttg gct aaa cag tgt Tyr Ser Phe Leu Ala Thr Pro Ala Gly Thr His Leu Ala Lys Gln Cys 245 250 255	768
ctt aga gct gcg aat cag cgt att gtg agc act aaa cct ctt ggt ttg Leu Arg Ala Ala Asn Gln Arg Ile Val Ser Thr Lys Pro Leu Gly Leu 260 265 270	816
agt ctc tgt aaa ttt gcc agt gaa aag gag ctt cgt gct ttt caa aat Ser Leu Cys Lys Phe Ala Ser Glu Lys Glu Leu Arg Ala Phe Gln Asn 275 280 285	864
ggg gat cct gag ttg tct tca gac aac aat agg atc tat tac tta ttt Gly Asp Pro Glu Leu Ser Ser Asp Asn Asn Arg Ile Tyr Tyr Leu Phe 290 295 300	912
gct atg aat aat tac tgc cct gat atg gcc agt atg att ttc ttt tgg Ala Met Asn Asn Tyr Cys Pro Asp Met Ala Ser Met Ile Phe Phe Trp 305 310 315 320	960
tgg tct atg cgc caa acg ggt aag aga aac agt att tgg ctg ttt gga Trp Ser Met Arg Gln Thr Gly Lys Arg Asn Ser Ile Trp Leu Phe Gly 325 330 335	1008
cct gct aca acc ggt aaa acc aat tta gca agt gct att gca cat act Pro Ala Thr Thr Gly Lys Thr Asn Leu Ala Ser Ala Ile Ala His Thr 340 345 350	1056
gct gcc agt tat ggg tgt gtt aac tgg aat aac gca aat ttc ccg ttt Ala Ala Ser Tyr Gly Cys Val Asn Trp Asn Asn Ala Asn Phe Pro Phe 355 360 365	1104
caa gac att gtg aat gtg caa ctg ggt tgg tgg gag gaa gga aag atg Gln Asp Ile Val Asn Val Gln Leu Gly Trp Trp Glu Glu Gly Lys Met 370 375 380	1152
aca gag gat gtg gtt gaa tgt gct aag gca ttg cta ggg gga agt aat Thr Glu Asp Val Val Glu Cys Ala Lys Ala Leu Leu Gly Gly Ser Asn 385 390 395 400	1200
gta aga gtt gac cgc aaa tgt atg caa tct gcg gaa gtg caa tct cct Val Arg Val Asp Arg Lys Cys Met Gln Ser Ala Glu Val Gln Ser Pro 405 410 415	1248
cct ttt att att aca tcc aat acg gat atg tgc ctt gtt tct caa ggc Pro Phe Ile Ile Thr Ser Asn Thr Asp Met Cys Leu Val Ser Gln Gly	1296

ES 2 771 850 T3

420			425			430			
agt tac atc	agt ttt gag cac	cag cag cct ctc	cag gat aga atg att					1344	
Ser Tyr Ile	Ser Phe Glu His	Gln Gln Pro Leu	Gln Asp Arg Met Ile	435	440	445			
aaa ttt gag ttt aac cat	gtt ctt cct ggc aat ttc	ggc ctc att tct						1392	
Lys Phe Glu Phe Asn His	Val Leu Pro Gly Asn Phe	Gly Leu Ile Ser		450	455	460			
gaa gat gaa gtc gtg gcc ttc ttc	aga aat ggt gct tat aat	gtg ttg						1440	
Glu Asp Glu Val Val Ala Phe Phe Arg Asn Gly Ala Tyr Asn Val Leu				465	470	475	480		
aag cat gcg tac atg aga aag gcc cag ctt ttt gct ctc ggt cca gct								1488	
Lys His Ala Tyr Met Arg Lys Ala Gln Leu Phe Ala Leu Gly Pro Ala				485	490	495			
tcc ttg cca tat aag ccc cct acg ggt gaa tta gtg tgt ata gac caa								1536	
Ser Leu Pro Tyr Lys Pro Pro Thr Gly Glu Leu Val Cys Ile Asp Gln				500	505	510			
gct aag tct cct tct ccc tct gct tct cgc cgc agt gtg aga aat tgg								1584	
Ala Lys Ser Pro Ser Pro Ser Ala Ser Arg Arg Ser Val Arg Asn Trp				515	520	525			
atg acg tgt ccc cct gat cct gtc cag gac gat ccc gct gaa ctg gac								1632	
Met Thr Cys Pro Pro Asp Pro Val Gln Asp Asp Pro Ala Glu Leu Asp				530	535	540			
gag tat ttt cct cca gat act cct cca gtg gat tgt cct tgt cct att								1680	
Glu Tyr Phe Pro Pro Asp Thr Pro Pro Val Asp Cys Pro Cys Pro Ile				545	550	555	560		
tct cct gtg agg gag tct tgt ccc tcg cca ggg cct tgc cct acc cct								1728	
Ser Pro Val Arg Glu Ser Cys Pro Ser Pro Gly Pro Cys Pro Thr Pro				565	570	575			
cct cgc aaa aaa caa cgg aag agc aag cat tgc tcc ttg tct gtc tct								1776	
Pro Arg Lys Lys Gln Arg Lys Ser Lys His Cys Ser Leu Ser Val Ser				580	585	590			
gcg ggt aaa gtt cct gtg gtg gtt gtg ggt gat tct gac tca gtc ccc								1824	
Ala Gly Lys Val Pro Val Val Val Val Gly Asp Ser Asp Ser Val Pro				595	600	605			
ccc gaa gaa aaa gaa aaa gag gaa gtt tcc gtg ggg gaa tcc cag gat								1872	
Pro Glu Glu Lys Glu Lys Glu Glu Val Ser Val Gly Glu Ser Gln Asp				610	615	620			
cca caa ctg tac tgg gac cta act ctc agt caa tcc gac gtt cct gtg								1920	
Pro Gln Leu Tyr Trp Asp Leu Thr Leu Ser Gln Ser Asp Val Pro Val				625	630	635	640		
cct gaa gac gag agt acc cag ttt cct gac gac gct gtg gac gct tct								1968	
Pro Glu Asp Glu Ser Thr Gln Phe Pro Asp Asp Ala Val Asp Ala Ser				645	650	655			
gat ctc att gct gaa cag tag								1989	
Asp Leu Ile Ala Glu Gln				660					

<210> 4  
 <211> 662  
 <212> PRT  
 <213> Parvovirus porcino

ES 2 771 850 T3

<400> 4

Met Ser Gln Thr Phe Trp Thr Gly Ile Cys Arg Leu Phe Pro Asp Ile  
 1 5 10 15

Gly Lys Ile Pro Gly Val Thr Pro Glu Arg Tyr Ile Tyr Ala Val Asn  
 20 25 30

Val Ser Thr Arg Asn Gly Gln Lys Trp Pro Lys Val Gly Thr Glu Gly  
 35 40 45

Pro Leu Ala Ala Gly Val Leu Gln Gly Glu Ala Leu Phe Arg Glu Thr  
 50 55 60

Leu Lys Glu Val Arg Lys Val Cys Arg Leu Pro Gln Asp Pro His Leu  
 65 70 75 80

Phe Phe Gln Leu Glu Lys Val Asp Ser Lys Gly Gly Leu His Leu His  
 85 90 95

Phe Cys Ile Ser Val Ala Ala Gly Thr Pro Arg Asp Val Ser Ser Met  
 100 105 110

Phe Lys Ala Ile Glu Arg Arg Val Ser Phe Tyr Tyr Phe Gly Val Glu  
 115 120 125

Gly Leu Thr Phe Phe Thr Pro His Lys Asn Lys His Gly Ala Trp Lys  
 130 135 140

Ser Asn Asp Glu Gly Phe Ile Val Asn Tyr Leu Leu Lys Lys Leu Pro  
 145 150 155 160

Leu Ser Glu Cys Val Tyr Ala Trp Thr Asn Met Asp Gly Val Ile Gly  
 165 170 175

Asp Ala Cys Leu Asn Glu Asp Lys Arg Arg Glu Leu Leu Ser Glu Arg  
 180 185 190

Gln Asp Gln Gly Val Ile Lys Glu Leu Thr Ala Pro Thr Phe Lys Ala  
 195 200 205

Ala Thr Gly Asp Lys Met Leu Ser Val Val Asp Trp Met Cys Asp Asn  
 210 215 220

ES 2 771 850 T3

Asp Val Thr Thr Glu Arg Arg Trp Glu Glu Ile Ser Ala Ala Ser Leu  
 225 230 235 240

Tyr Ser Phe Leu Ala Thr Pro Ala Gly Thr His Leu Ala Lys Gln Cys  
 245 250 255

Leu Arg Ala Ala Asn Gln Arg Ile Val Ser Thr Lys Pro Leu Gly Leu  
 260 265 270

Ser Leu Cys Lys Phe Ala Ser Glu Lys Glu Leu Arg Ala Phe Gln Asn  
 275 280 285

Gly Asp Pro Glu Leu Ser Ser Asp Asn Asn Arg Ile Tyr Tyr Leu Phe  
 290 295 300

Ala Met Asn Asn Tyr Cys Pro Asp Met Ala Ser Met Ile Phe Phe Trp  
 305 310 315 320

Trp Ser Met Arg Gln Thr Gly Lys Arg Asn Ser Ile Trp Leu Phe Gly  
 325 330 335

Pro Ala Thr Thr Gly Lys Thr Asn Leu Ala Ser Ala Ile Ala His Thr  
 340 345 350

Ala Ala Ser Tyr Gly Cys Val Asn Trp Asn Asn Ala Asn Phe Pro Phe  
 355 360 365

Gln Asp Ile Val Asn Val Gln Leu Gly Trp Trp Glu Glu Gly Lys Met  
 370 375 380

Thr Glu Asp Val Val Glu Cys Ala Lys Ala Leu Leu Gly Gly Ser Asn  
 385 390 395 400

Val Arg Val Asp Arg Lys Cys Met Gln Ser Ala Glu Val Gln Ser Pro  
 405 410 415

Pro Phe Ile Ile Thr Ser Asn Thr Asp Met Cys Leu Val Ser Gln Gly  
 420 425 430

Ser Tyr Ile Ser Phe Glu His Gln Gln Pro Leu Gln Asp Arg Met Ile  
 435 440 445

Lys Phe Glu Phe Asn His Val Leu Pro Gly Asn Phe Gly Leu Ile Ser  
 450 455 460

Glu Asp Glu Val Val Ala Phe Phe Arg Asn Gly Ala Tyr Asn Val Leu  
 465 470 475 480

ES 2 771 850 T3

Lys His Ala Tyr Met Arg Lys Ala Gln Leu Phe Ala Leu Gly Pro Ala  
 485 490 495

Ser Leu Pro Tyr Lys Pro Pro Thr Gly Glu Leu Val Cys Ile Asp Gln  
 500 505 510

Ala Lys Ser Pro Ser Pro Ser Ala Ser Arg Arg Ser Val Arg Asn Trp  
 515 520 525

Met Thr Cys Pro Pro Asp Pro Val Gln Asp Asp Pro Ala Glu Leu Asp  
 530 535 540

Glu Tyr Phe Pro Pro Asp Thr Pro Pro Val Asp Cys Pro Cys Pro Ile  
 545 550 555 560

Ser Pro Val Arg Glu Ser Cys Pro Ser Pro Gly Pro Cys Pro Thr Pro  
 565 570 575

Pro Arg Lys Lys Gln Arg Lys Ser Lys His Cys Ser Leu Ser Val Ser  
 580 585 590

Ala Gly Lys Val Pro Val Val Val Val Gly Asp Ser Asp Ser Val Pro  
 595 600 605

Pro Glu Glu Lys Glu Lys Glu Glu Val Ser Val Gly Glu Ser Gln Asp  
 610 615 620

Pro Gln Leu Tyr Trp Asp Leu Thr Leu Ser Gln Ser Asp Val Pro Val  
 625 630 635 640

Pro Glu Asp Glu Ser Thr Gln Phe Pro Asp Asp Ala Val Asp Ala Ser  
 645 650 655

Asp Leu Ile Ala Glu Gln  
 660

5 <210> 5  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Parvovirus porcino

10 <400> 5  
 ctacatctgc gcctgac 17

15 <210> 6  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Parvovirus porcino

20 <400> 6  
 gtggtgagaa ggcaagac 18

<210> 7  
 <211> 20

ES 2 771 850 T3

	<212> ADN	
	<213> Parvovirus porcino	
5	<400> 7 tgtagtggt ggtggattgg	20
10	<210> 8 <211> 19 <212> ADN <213> Parvovirus porcino	
15	<400> 8 aaggaagctg gaccgagag	19
20	<210> 9 <211> 24 <212> ADN <213> Parvovirus porcino	
25	<400> 9 cacgagctag agcgtgctaa acag	24
	<210> 10 <211> 5999 <212> ADN <213> Parvovirus porcino	
	<400> 10	
	ttaatggacc aataggattt acttctgctt tttagggat aaaagttcgt acttctgctt	60
	tttcctcat tctgtgcttg ggagctgac tgttagatc tttttgcttc tctgcccga	120
	aagcctctgt attatgtctc agacctctg gacgggtatt tgcaggcttt tccctgatat	180
	tggaagatt cctgggtga ctctgagcg gtatatatt gctgtaaacg tgagtaccg	240
	taatggcaa aagtggccga aagttgggac cgaggggcca ttggctgcag gtgtcttaca	300
	gggggaggcc cttttccgtg agacccttaa agaggtccgg aaggtgtgcc ggctgccgca	360
	agaccccat cttttctttc aattggagaa agttgattcc aaagggggtc ttcaccttca	420
	tttttgatt agtggtgctg ctggcactcc tagagatgtg tcttcgatgt ttaaagccat	480
	tgagcgtcga gtttcctttt actactttgg ttagagggc ttgacttttt ttactcctca	540
	taaaaataag catgggtgctt ggaagagtaa ttagagggc tttattgtga attatcttct	600
	taaaaaattg cctttgtctg agtgtgtgta tgcgtggact aatatggatg gggtgattgg	660
	cgatgcctgt ctgaatgaag ataagcgcag ggaattgtt tctgagcgtc aagatcaggg	720
	agtcattaaa gagctcactg ctctacttt taaagctgct acgggtgata aaatggtgag	780

ES 2 771 850 T3

tgtggtggat tggatgtgtg ataatgatgt gactacggag cgccgatggg aggaaatatic 840  
 ggctgcgtcc ctgtactctt tccttgctac cccagctggc actcatttgg ctaaacagtg 900  
 tcttagagct gcgaatcagc gtattgtgag cactaaacct cttggtttga gtctctgtaa 960  
 atttgccagt gaaaaggagc ttcgtgcttt tcaaaatggg gatcctgagt tgtcttcaga 1020  
 caacaatagg atctattact tatttgctat gaataattac tgccctgata tggccagtat 1080  
 gattttcttt tgggtgtcta tgcgccaaac gggtaagaga aacagtattt ggctgtttgg 1140  
 acctgtaca accggtaaaa ccaatttagc aagtgtatt gcacatactg ctgccagtta 1200  
 tgggtgtggt aactggaata acgcaaattt cccgtttcaa gacattgtga atgtgcaact 1260  
 ggggtgtgg gaggaaggaa agatgacaga ggatgtggtt gaatgtgcta aggcattgct 1320  
 agggggaagt aatgtaagag ttgaccgcaa atgtatgcaa tctgcggaag tgcaatctcc 1380  
 tccttttatt attacatcca atacggatat gtgccttggt tctcaaggca gttacatcag 1440  
 tttgagcac cagcagcctc tccaggatag aatgattaa tttgagtta accatgttct 1500  
 tcctggcaat ttcggcctca tttctgaaga tgaagtcgtg gccttcttca gaaatggtgc 1560  
 ttataatgtg ttgaagcatg cgtacatgag aaaggcccag ctttttgctc tcggtccagc 1620  
 tccttgcca tataagcccc ctacgggtga attagtgtgt atagaccaag ctaagtctcc 1680  
 ttctccctct gcttctcgcc gcagtgtgag aaattggatg acgtgtcccc ctgatcctgt 1740  
 ccaggacgat cccgctgaac tggacgagta ttttctcca gatactctc cagtggattg 1800  
 tcctgtcct atttctcctg tgagggagtc ttgtccctcg ccagggcctt gccctacccc 1860  
 tcctcgcaaa aaacaacgga agagcaagca ttgctccttg tctgtctctg cgggtaaagt 1920  
 tcctgtggtg gttgtgggtg attctgactc agtccccccc gaagaaaaag aaaaagagga 1980  
 agtttccgtg ggggaatccc aggatccaca actgtactgg gacctaactc tcagtcaatc 2040  
 cgacgttct gtgcctgaag acgagagtac ccagtttct gacgacgctg tggacgcttc 2100  
 tgatctcatt gctgaacagt agttaaggta tgagccgttc tactcaaaga gatctttggt 2160  
 ctttgtaag ggagagactt gaaaggtata aggatcgagt taaatattat ggtattttgg 2220  
 tgccagaacg tccttctacc ttagcatctt attttagtaa agaccacct ccagatcctc 2280  
 caactgttaa atttgataaa ccctatcagg atgtagatag attctggttt ccaacagacg 2340  
 attatagtga ctggtatgtc tggcatggag aggacagacc tcctagattt accgagcatt 2400  
 ccggtgttca gggttttaa actaggtgtg agggggggct tcctttaatg cccagtgatc 2460  
 ccaaattttg cccatacaa aatttttggg atcagttcgc taattttgat gaggggtctc 2520  
 cgtccacca gatcgtgag agtgtttcat ggagtgatca ttttgaagt cccgatccct 2580  
 ctcatcatca ggaggtgagg gatgctgatg aagtacttc cgagcggcag caatataaaa 2640  
 ataggattgt cacctatta agaaaagttt attgggctaa gcagtgtct gggaaattac 2700

ES 2 771 850 T3

aaattaatgt tccttcctc gaaagcctt atgagcagat cccctatatg cttagcctata 2760  
 tggacgctga taattggcgt cagaatttgt tagctgctaa aactctgcca accactttgg 2820  
 aagcattttc ctgtgttcca gatccttcca cgtgagatgt cacaatctcc acaccctat 2880  
 ctggtgaaac ggatccccgc tcttttgcaa aatacttatg ttcccttgta tgcaacaggt 2940  
 ctcaagaaaa agaacaggcg cagacgcctt ctttgtctcc atctaaacaa gaagggcaga 3000  
 tgtcaagtcc tgattctgca tcgatctccc aacctcccc tgaaagtcac aaggatagac 3060  
 tgcttcctaa aactgatccc cttcaggaag cagggcccat tcccgtccc cccacagctc 3120  
 agaagcctat tatctctaag ggtgcaggcg gtggagggtc ttctggcttc ataatccctc 3180  
 caaacctcc tagccccgat caccctaaag atccccccc tcctcctcct ccctctccaa 3240  
 ttctccttc tacatctgcg cctgacgcag aaaagcacga gctagagcgt gctaaacagg 3300  
 agaaacaaga ggaagatgag ctcatgcaca gaatcaaac aggagaagga gaaggagaac 3360  
 gaggaggcct cgtcttgccct tctcaccact acactggtcc tagaaatcct gtcccagctg 3420  
 gcaagcctgc tgaccccggt gatgaatctt ctgagagaca tgacatcagg tatgggcaac 3480  
 gtcttaacaa tggagactgg ccatacctgt gggggaagga cttggataat gctcagcgag 3540  
 atgagattat caaagctctt catagtcatg tcaaagtggg aacccaattg gcaggaata 3600  
 tagtgaggag tatttgaag gctaaggagc tcttaacaga acctgtgtat gagctgttaa 3660  
 agtctattct ccctcctca gatttatcta aagttcctct tcctcattcc caacagacag 3720  
 acagaacaga agatccagaa actccagggg agactagagg aactggatca gacagtcctc 3780  
 gatctcctcg gccttctgga tcaactgaag acgggggagg tccttcttcc gagtccagat 3840  
 tacctgggac taaagttcca gtagacccat ctgccaccac gtccgaagca aagaggcaga 3900  
 ggactgagga ggggatggac atatcttctt gctgtccagg ggggatttct gcttctgggg 3960  
 ctgcttcaaa taactctggt cttgcttgtg ggggtggggg gggactaat ttagggacag 4020  
 aatctcttgt atccggctgt cagtttggta aaaactctgt gatcacttca tcttttagac 4080  
 gatgtctcat ttcaccctgg cctgataaat actggtgttc ttctgctcac gatcttattc 4140  
 ccggagtggc ctacgagacc ccttggtgct attatgatct gaacgtcatc tcagcacatt 4200  
 tttctccttc tgcttggcag aggcttttgg aggattatga tgcctttoga cctaaatccc 4260  
 ttaaagttac catccagtct ttagttttta aagatgtctg tcaaggtgca gaaaaacaaa 4320  
 ctacagttca ggattcccag tcagccacca ttgctatctt tgaggataaa gactatgact 4380  
 acccctatgt gatgggaggg ggtcaaaaaa cagttccggg tcaactgccc ggtcaacctt 4440  
 ataatcttcc caagtattct tacagaacct ttggttcagt caaagaaagt aataggcca 4500  
 gtatggggcg ttcagggtac actttcaaat ccaatcaaga tacggaattg tttctgcttg 4560

ES 2 771 850 T3

aaacacatga tgccactcctt attcgaggcg ggggtacttt tgagcagtac tatgaatttc 4620  
 caaacgatct tcctttcgaa aatttgactc agtatccttg ggatatccgc cgtcaggata 4680  
 accccctcta tcagcagagg atcactgtca tgtcaggttc tgacagagat acggtaggca 4740  
 ttttagatgg agatTTTTac tctccttttc ggttcaaagg tcatgataga cccgccatgt 4800  
 ggctgccagg acagaggttg attcagggca aattcataga tacgcacca ataccaata 4860  
 caggaggag tggggttcat cctaattgatt ttcacacaag gggcgatggt catggtgaca 4920  
 cccatagaac acatgaagag aggatctaca gtctagatac aggtcttgct gctatgccac 4980  
 gtgccgctca tagaccacc cttcagcccg gacctaggac tctgtctcat gccgtacgca 5040  
 gaccgatgg ttccaccgtg gtcacggcta atgctgtgc ttacgcttac acccaggaga 5100  
 atcctcatca ggaaccctgg agtgatctca atgtcagaca taccatgtat aggttagcct 5160  
 atcaacgtca aaaaggTTTT cagcaaccgg gggaccctct tcatattcga acccatgctt 5220  
 gttatgggga cggggatggt accattcaa aagaagagtc cttatggcct actgttctgg 5280  
 gtagttgcac agaaaagtcc cctgcctggt tagagtccca gatttgggtg aaaaacacaa 5340  
 atgtggacat ggtctatgga gaacacacac ccctcttgc tttatggggg atgcatgctc 5400  
 cccaccccca tgtatttctc aggatgcttg ctcaagaggg tcctcctaata gtcagtactt 5460  
 gcagaccggc tcaatctggt cagaccttca tcaatcaata tggtcagttt ctcctctggt 5520  
 ttaccatggt atgggaagtt aagcctagac ccaagtccat caagcaatgg aatccacgtc 5580  
 cgcccatcag cattcctggt ggtcagtctg gtctctgctt cattctcgat caagatggct 5640  
 actaccgtct cccagaacat gtctggtctg ccaggaacg tatccgcagc aaacgctagt 5700  
 gccccagca atacacttac tacagtattg atgtgtcagg cattctggtt gattgtttta 5760  
 ttttggtcc gcctactgta tggcccatgt aaacgcatct attatgaaa taaaatacgt 5820  
 caattgctga tgtaattcgt gttgtaattc ttgtttgaaa agcgcatatt ttcttgccgg 5880  
 tctgagtaac accacctatg acatcatata aatttgatta cgtaacttcc tctttttact 5940  
 tcctcttttt tgattggatt tacgcaatat cacaattcta gcagttatct gagcgggct 5999

1

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una vacuna para combatir el parvovirus porcino asociado al SHI en cerdos, **caracterizado por que** dicha vacuna comprende una cantidad inmunogénicamente eficaz de una proteína de la cápside (CP) codificada por un fragmento de ADN que comprende un gen que codifica la CP, en donde la secuencia de nucleótidos de dicho gen tiene un nivel de identidad de al menos el 80 % con la secuencia de nucleótidos del gen de la CP tal como se representa en la SEQ ID NO: 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 2. Un kit de prueba de diagnóstico, **caracterizado por que** dicho kit de prueba comprende un conjunto de cebadores de PCR tal como se representa en las SEQ ID NO: 5 y 6 que es específicamente reactivo con una región del gen de la proteína de la cápside del parvovirus porcino asociado al SHI o un conjunto de cebadores tal como se representa en las SEQ ID NO: 7 y 8 que es específicamente reactivo con una región del gen de la NS1 del parvovirus porcino asociado al SHI.

Figura 1

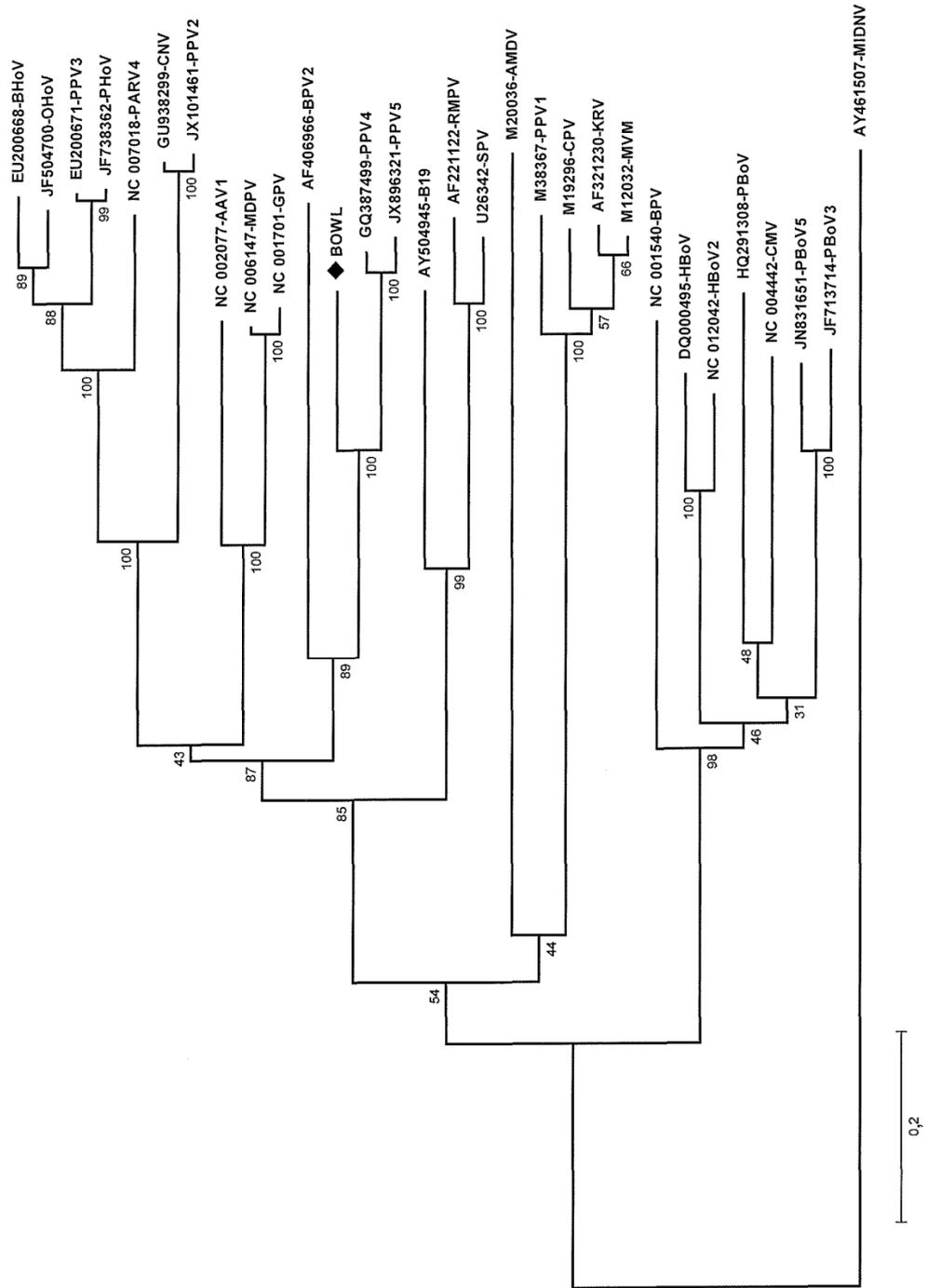
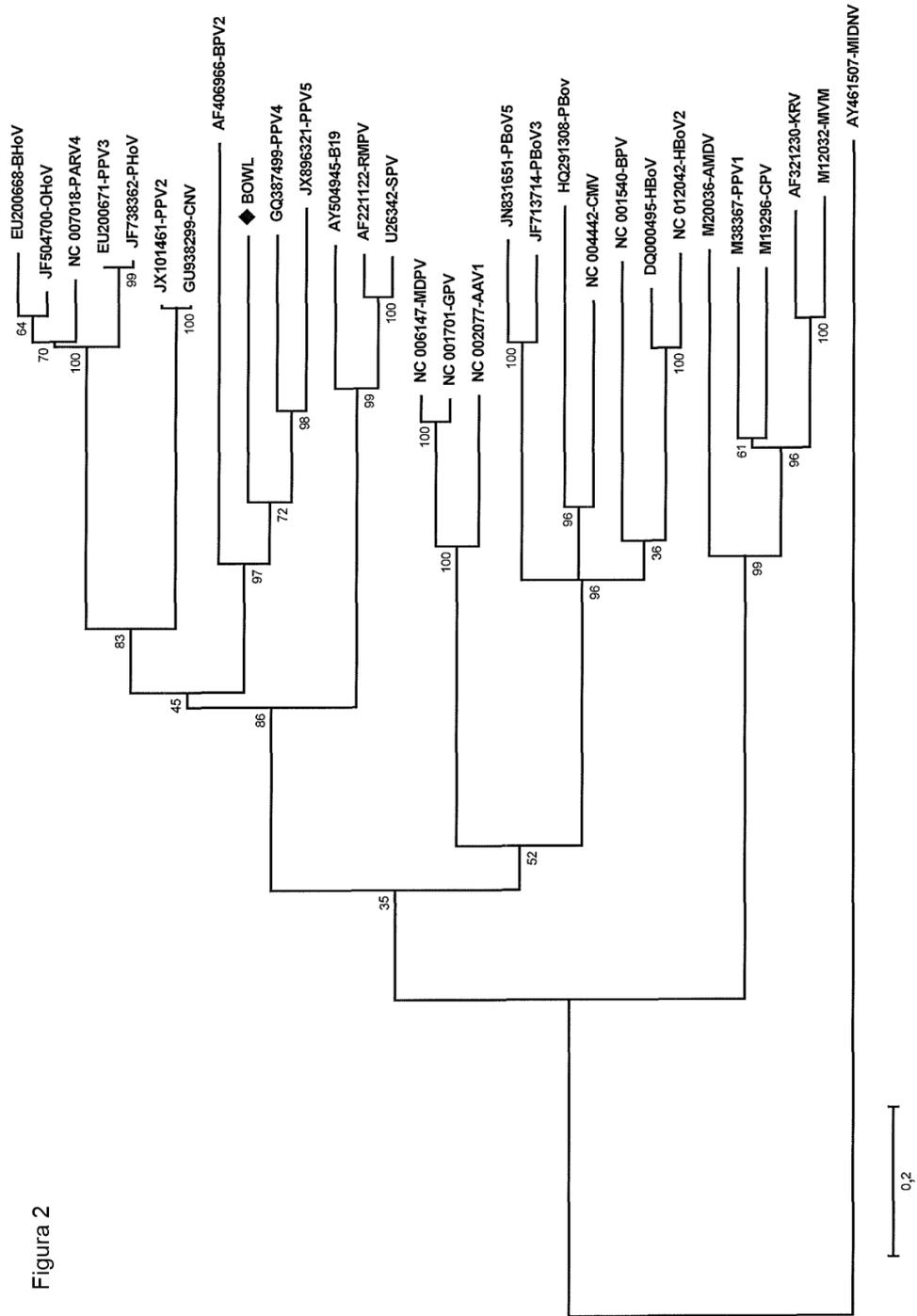


Figura 2



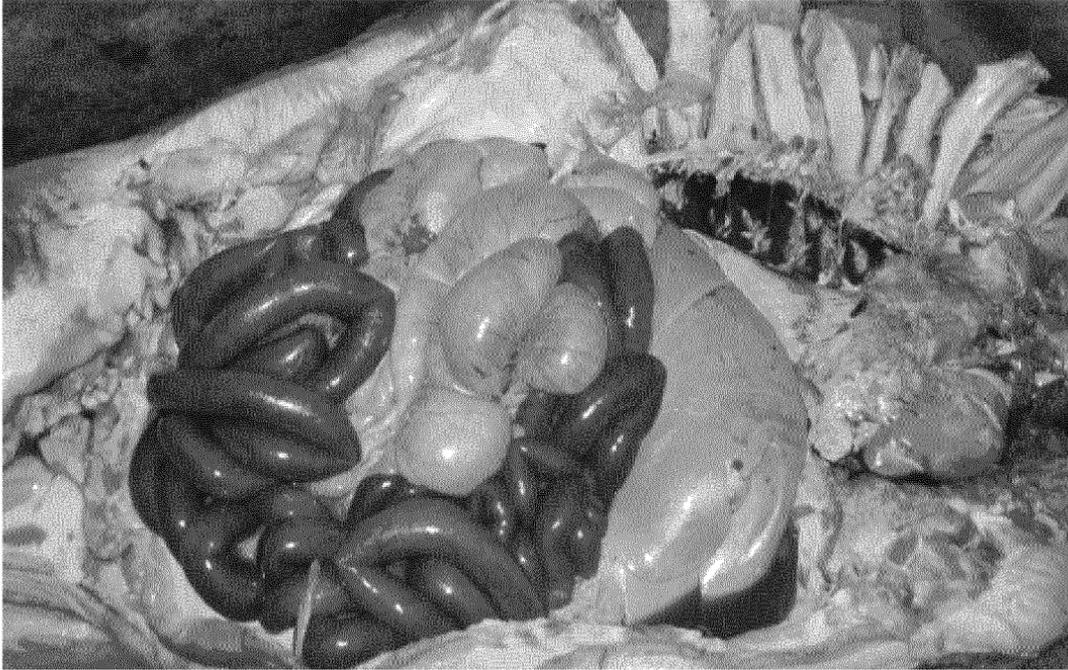


Figura 3