SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-199500- -00000-0000
Fecha: 2013-08-22 16:36:48 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

TITULO: **NUEVOS NUEVA CEPA DEL PRRSV EUROPA**

SOLICITANTE: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, [illegible].

DIRECCIÓN: Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein, Alemania

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 22 de Agosto de 2013

P2013/000122

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & A:

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-199500- -00000-0000

Fecha: 2013-08-22 16:36:48 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

PETITORIO - FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2013/000122**

SOLICITUD DE:

(1) [X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) **SOLICITANTE (71)**

Nombre: **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH**
Dirección: Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE)
Nacionalidad o Domicilio: Alemania
Lugar de Constitución: Alemania
Teléfono: **Fax:**
E-mail:

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual
Número

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá, Colombia
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual
Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/EP2012/052475 Fecha Febrero 14, 2012

Publicación Internacional No. WO 2012/110489 A2 Fecha Agosto 23, 2012

(6) **Título (54)** **NUEVA CEPA DEL PRRSV EUROPEA.**

Clasificación Internacional (51) A61K 39/12; C12N 7/00.

Prioridad **SI** [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Febrero 17, 2011	61/444,074

(9) **Comprobante de pago No.** 13- **Fecha**

ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso.
- [x] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [x] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12 x 12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/EP2012/052475

Kim BURGARD
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Jeremy KROLL
2621 North Belt Highway,
St. Joseph, Missouri 64506
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Sarah M. LAYTON
2621 North Belt Highway,
St. Joseph, Missouri 64506
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Volker OHLINGER
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim Am Rhein
Alemania
Nacionalidad: Alemania

Francois-Xavier ORVEILLON
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim Am Rhein
Alemania
Nacionalidad: Francés

Stefan PESH
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim Am Rhein
Alemania
Nacionalidad: Alemania

Michael Dennis PIONTKOWSKI
2621 North Belt Highway,
St. Joseph, Missouri 64506
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Michael B. ROOF
2621 North Belt Highway, St.
Joseph Missouri 64506
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Phillip Dennis UTLEY
502 8th Avenue, Slater,
Iowa 50244
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Eric Martin VAUGHN
2621 North Belt Highway,
St. Joseph, Missouri 64506
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0083187

Bogotá D.C., Agosto 21 de 2013 - 15:53:17

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	522598823	21/08/2013	14.035.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	500.000.00	500.000.00
				$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-199500- -00000-0000

Fecha: 2013-08-22 16:36:48 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: 2023 / 8 / 22 (AAAA / MM / DD)	Recorrido:
2020		

Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador: | Planilla:

ID	*No. Radicación*	*Consecutivo*	*Item*
1	13 - 199500 -	0	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	*Unidad de Conservación*
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	**Otro**
Item	***Soporte Documental***
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	**Otro**

Observaciones:

Anexan CD

Path

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-199500- -00000-0000

Fecha: 2013-08-22 16:36:48 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO D

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

REPÚBLICA DE COLOMBIA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
LEGALIZACION

País: ***REPUBLICA DE COLOMBIA***
(Country: - Pays:)

El presente documento público
(This public document - Le présent acte public)

Ha sido firmado por: ***OLARTE GARCIA ROBERTO MARIO***
(Has been signed by: - A été signé par:)

Actuando en calidad de: ***TRADUCTOR OFICIAL***
(Acting in the capacity of: - Agissant en qualité de:)

Lleva el sello/estampilla de: ***TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL***
(Bears the seal/stamp of: - Est revétu du sceau de / timbre de:)

Certificado
(Certified - Attesté)

En: ***BOGOTA D.C***
(At: - Á:)

El: ***2/2/2012 10:54:35 a.m.***
(On: - Le:)

Por: ***APOSTILLA Y LEGALIZACIÓN***
(By: The Ministry of Foreign Affairs of Colombia - Par: Ministère des Affaires Étrangères de la Colombie)

No: ***LMCC105434895***
(Under Number: - Sous le numéro:)

Nombre del Titular: ***2059/2011***
(Name of the holder of document: - Nom du titulaire:)

Tipo de documento: ***TRADUCCION APOSTILLA***
(Type of document: - Type du document:)

Número de hojas: ***3***
(Number of pages: - Nombre de pages:)

01304100116643800902

Firmado Digitalmente por: (Digitally Signed by:)
Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia
AMPARO DE LA CRUZ TAMAYO RODRIGUEZ
Reason: DOCUMENT AUTHENTICITY
BOGOTA - COLOMBIA

La autenticidad de este documento puede ser verificada en el Registro Electrónico que se encuentra en la siguiente página
The authenticity of this document may be verified by accessing the e-Register on the following web site:
L'authenticité de cette document peut être vérifiée en accédant l'e-Registre sur le site web suivant:

www.cancilleria.gov.co/legalizaciones

Este documento público es una traducción al español de un documento en idioma inglés presentado ante mí.
ROBERTO M. OLARTE GARCÍA
Traductor e Intérprete Oficial
Ministerio de Justicia
Licencia 0041/1996

PODER

(texto en español)

Firma: **Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH**

(ilegible)
Dr. Heinz HAMMANN

(ilegible)
Dr. Heinz-Gerd KLAES

Firmas autorizadas

Fecha: 8 de octubre de 2011

Ciudad, País: Ingelheim am Rhein, Alemania

UR Nr. 2824/2011

Por medio de la presente se certifica que las anteriores rúbricas de:

- **Dr. Heinz Hammann**
  nacido el 25 de noviembre de 1949,
  con domicilio en 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173,

- **Dr. Heinz-Gerd Kläs**,
  nacido el 9 de febrero de 1952,
  con domicilio en 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173,

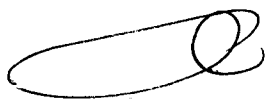
conocidos de manera personal,
fueron suscritas en presencia mía.

Por medio de la presente se certifica que **Boehringer Ingelheim Vetmedica Gesellschaft mit beschränkter Haftung** es una sociedad debidamente organizada y existente bajo las leyes de la República Federal de Alemania con domicilio principal en Binger Straße 173, Ingelheim am Rhein, Alemania.
La sociedad fue registrada en el Registro Comercial de la Corte Distrital de Mainz bajo el No. HR 2 21491.

Adicionalmente, certifico que el Dr. Heinz Hammann y el Dr. Heinz-Gerd Kläs estaban autorizados para suscribir el anterior documento y aún están debidamente autorizados para firmar en nombre de **Boehringer Ingelheim Vetmedica Gesellschaft mit beschränkter Haftung** como representantes autorizados.

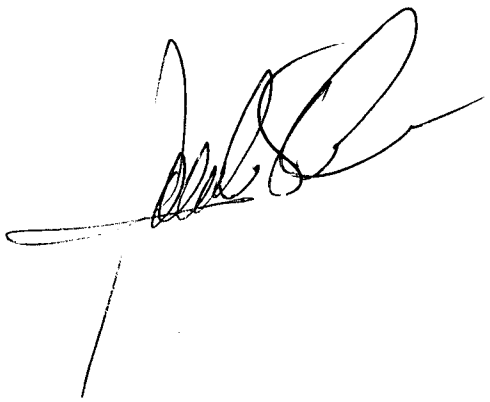
Ingelheim am Rhein, 8 de diciembre de 2011/Ge

(firma ilegible)
Notario Público



APOSTILLA
(Convención de la Haya, del 5 de octubre de 1961)

1. País: República Federal de Alemania
Este documento público
2. está firmado por Horst Heintskill
3. en su calidad de Notario
4. está provisto con el timbre/sello de Horst Heintskill – Notario en Ingelheim am Rhein
Confirmado
5. en Mainz 6. el 12.12.2011
7. por la presidente de la audiencia provincial
8. bajo el número 2059/2011
9. sello: ilegible
10. Firma
(ilegible)
Marliese Dicke



Cálculo de costos
Derechos para la obtención de la legalización
Valor: 50.000,00 €
JVKostO del 26.7.1957
según § 45 orden de costos
Derechos: 33,00€

Mainz, 12.12.11
(firma ilegible)
Beyer

OLARTEMOURE
OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Carlos R. Ola
Juan G. Mou

Alexander Agud
Carlos A. Pa
Gina Ar
Juan Felipe Aco
Andres Rinc
Monica Guev
Andres Alvara
Margarita Solo
Ricardo Velas

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

domiciled in

domiciliado en

Binger Straße 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or Juan Guillermo Moure** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's **Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right** in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications, collect refunds, desist, settle, conciliate or negotiate. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o Juan Guillermo Moure** poder amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las **Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual** de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir, transigir, y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma: Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH

ppa. Dr. Heinz HAMMANN

ppa. Dr. Heinz-Gerd KLAES

Authorized Signatories

Date/Fecha: 8th of October, 2011

City,Country/Ciudad,País: Ingelheim am Rhein, Germany

UR.Nr. 2824/2011
It is herewith certified that above signatures of:

- Dr. Heinz **H a m m a n n**,
  born 25th day of November 1949,
  with business address at 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173,

- Dr. Heinz-Gerd **K l ä s**,
  born 09th day of February 1952,
  with business address at 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173,

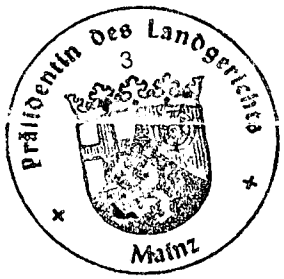
personally known,
were duly given in my presence.

It is herewith certified that **Boehringer Ingelheim Vetmedica Gesellschaft mit beschränkter Haftung** is a corporation duly organized and existing under the laws of the Federal Republic of Germany having its principal place of business at Binger Straße 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany.
It has been entered into the Commercial Register of the District Court of Mainz under HR B 2[illegible]491.

Furthermore, I certify that Dr. Heinz Hammann and Dr. Heinz-Gerd Kläs were authorized to sign the foregoing document and still are duly authorized to sign on behalf as Procurists of **Boehringer Ingelheim Vetmedica Gesellschaft mit beschränkter Haftung.**

Ingelheim am Rhein, the 08th day of December 2011 /Ge

Notary public



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland

Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von Horst Heintskill

3. in seiner Eigenschaft als Notar

4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel Horst Heintskill - Notar in Ingelheim am Rhein

Bestätigt

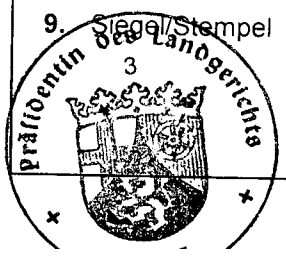
5. in Mainz 6. am 12.12.2011

7. durch die Präsidentin des Landgerichts

8. unter Nr. 2059/2011

9. Siegel/Stempel 10. Unterschrift

Marliese Dicke



Kostenrechnung:

Gebühr für die Erteilung der Legalisation
Wert: 50.000,00 €
JVKostO v. 26.7.1957
i.V.m. § 45 KostO
Gebühr: 33,00 €

Mainz, den 12.12.11
Beyer
Justizbeschäftigte

Assignment of Inventors and Priority Rights

For good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, the undersigned (the "Assignors")

Kim BURGARD, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Jeremy KROLL, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Sarah M. LAYTON, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Volker OHLINGER, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Francois-Xavier ORVEILLON, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of France
Stefan PESCH, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Michael Dennis PIONTKOWSKI, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Michael B. ROOF, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Philip UTLEY, 502 8th Avenue, Slater, IA 50244, USA – a citizen of the USA
Eric Martin VAUGHN, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA

inventor/s and applicant/s of an invention related to:

"NOVEL EUROPEAN PRRSV STRAIN"

for which a first application was filed in the **USA**
Serial No.: **US 61/444074**
Filing Date: **February 17, 2011**

do hereby assign, and transfer all my/our rights, title and interest in and to the same to

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
residing in
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany

to whom assignment has been made of all rights and title to the said invention for the following territories:

Argentina, Brazil, Canada, Chile, China, Colombia, Ecuador, Egypt, Georgia, India, Indonesia, Mexico, Nigeria, OAPI, Pakistan, Peru, South Africa, Taiwan, Thailand, Uruguay, Venezuela, Viet Nam, GCC Member States and the United Arabian Emirates

aforesaid without any restriction whatever.
Done and signed at

K. Burgard — 01/06/2012

Kim BURGARD — Date

Jeremy KROLL — Date

Sarah M. LAYTON — Date

Volker OHLINGER — Date

Francois-Xavier ORVEILLON — Date

Stefan PESCH — Date

Michael Dennis PIONTKOWSKI — Date

Michael B. ROOF — Date

Philip UTLEY — Date

Eric-Martin VAUGHN — Date

Dr. Jörg W. Britz
Dr. Dr. Ingo Ludwig
NOTARE

Poststraße 33, 66333 Völklingen
Im Völklinger Carré
(Ecke Poststraße/Bismarckstraße)
Postfach 10 15 65, 66305 Völklingen

Telefon: 0 68 98 / 91 35-0
Telefax: 0 68 98 / 91 35-10
Email: info@notare-voelklingen.de
Web: www.notare-voelklingen.de

Urkundenrolle Nummer: 30 **/ 2012 B**
23896, SP, 2011:01763

Attestation clause

I, Notary public Dr. Jörg W. Britz, certify that the signature under the document affixed and sealed hereto was duly given in my presence by:

Dr. Kim B u r g a r d née Hattermann,
born on March 22, 1974,
residing at: Zum Gürtel 15, 66787 Wadgassen,
identified by presentation of her valid Identity Card of the Federal Republic of Germany.

Völklingen, January 06, 2012

Dr. Jörg W. Britz
Notary public
At the city of Völklingen
County of Saarland
Germany

Conformity of the above copy with the original is hereby certified.

Ingelheim am Rhein, the 04th day of June 2013 /Ge

Notary junior judge Mascha Diefenbach
as officially appointed representative of
the notary Horst Heintskill with his office in Ingelheim am Rhein

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland

Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von Notarassessorin Mascha Diefenbach
3. in ihrer Eigenschaft als amtlich bestellte Vertreterin des Notars Horst Heintskill mit dem Amtssitz in Ingelheim am Rhein
4. sie ist versehen mit dem Stempel/Siegel Horst Heintskill - Notar in Ingelheim am Rhein

Bestätigt

5. in Mainz
6. am 10. Jun. 2013
7. durch die Präsidentin des Landgerichts
8. unter Nr. 1094/2013
9. Siegel/Stempel
10. Unterschrift
In Vertretung:

Benno Henrich
Vizepräsident

Kostenrechnung:
Gebühr für die Erteilung der Legalisation
Wert 3.000,00 €
JVKostO v. 26.7.1957
i.V.m. § 45 KostO
Gebühr 10,00 €

Mainz, den 10. Jun. 2013

Justizsekretärin

Certified Copy

Assignment of Inventors and Priority Rights

For good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, the undersigned (the "Assignors")

Kim BURGARD, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Jeremy KROLL, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Sarah M. LAYTON, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Volker OHLINGER, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Francois-Xavier ORVEILLON, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of France
Stefan PESCH, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Michael Dennis PIONTKOWSKI, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Michael B. ROOF, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Philip UTLEY, 502 8th Avenue, Slater, IA 50244, USA – a citizen of the USA
Eric Martin VAUGHN, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA

inventor/s and applicant/s of an invention related to:

"NOVEL EUROPEAN PRRSV STRAIN"

for which a first application was filed in the **USA**
Serial No.: **US 61/444074**
Filing Date: **February 17, 2011**

do hereby assign, and transfer all my/our rights, title and interest in and to the same to

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
residing in
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany

to whom assignment has been made of all rights and title to the said invention for the following territories:

Argentina, Brazil, Canada, Chile, China, Colombia, Ecuador, Egypt, Georgia, India, Indonesia, Mexico, Nigeria, OAPI, Pakistan, Peru, South Africa, Taiwan, Thailand, Uruguay, Venezuela, Viet Nam, GCC Member States and the United Arabian Emirates

aforesaid without any restriction whatever.
Done and signed at

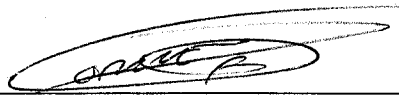
../2

Kim BURGARD — Date

Jeremy KROLL — Date

Sarah M. LAYTON — Date

Volker OHLINGER — Date



Francois-Xavier ORVEILLON — 09 JAN 2012 — Date

Stefan PESCH — Date

Michael Dennis PIONTKOWSKI — Date

Michael B. ROOF — Date

Philip UTLEY — Date

Eric-Martin VAUGHN — Date

UR.Nr. 34/2012
It is herewith certified that above signature of:

Mr. Francois-Xavier **O r v e i l l o n**,
born 07th day of October 1978,
with business address at 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173,

personally known,

was duly given in my presence.

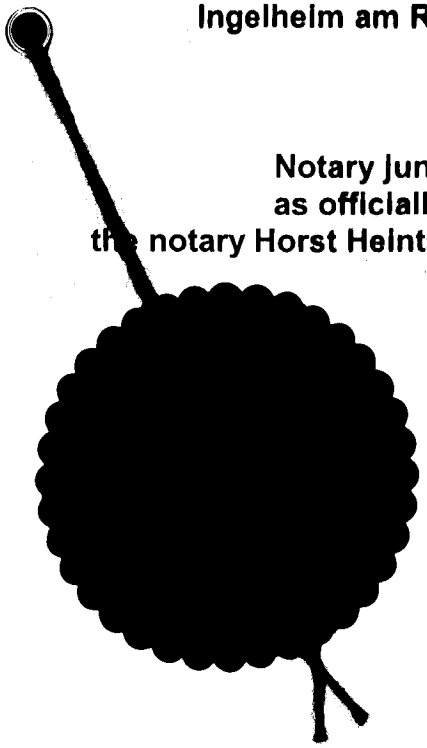
Ingelheim am Rhein, the 09th day of January 2012 /Ge

Notary junior judge Mascha Diefenbach
as officially appointed representative of
the notary Horst Heintskill with his office in Ingelheim am Rhein

Conformity of the above copy with the original is hereby certified.

Ingelheim am Rhein, the 04th day of June 2013 /Ge

Notary junior judge Mascha Diefenbach
as officially appointed representative of
the notary Horst Heintskill with his office in Ingelheim am Rhein





APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1.	Land:	Bundesrepublik Deutschland
	Diese öffentliche Urkunde	
2.	ist unterschrieben von	Notarassessorin Mascha Diefenbach
3.	in ihrer Eigenschaft als	amtlich bestellte Vertreterin des Notars Horst Heintskill mit dem Amtssitz in Ingelheim am Rhein
4.	sie ist versehen mit dem Stempel/Siegel	Horst Heintskill - Notar in Ingelheim am Rhein

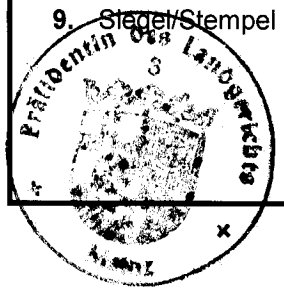
Bestätigt

5.	in	Mainz	**6.** am	10. Jun. 2013
7.	durch die	Präsidentin des Landgerichts		
8.	unter Nr.	1093/2013		
9.	Siegel/Stempel		**10.** Unterschrift In Vertretung: Benno Henrich Vizepräsident	

Kostenrechnung:
Gebühr für die Erteilung
der Legalisation
Wert: 3.000,00 €
JVKostO v. 26.7.1957
i.V.m. § 45 KostO
Gebühr: 10,00 €

Mainz, den 10. Jun. 2013

Justizsekretärin



Assignment of Inventors and Priority Rights

For good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, the undersigned (the "Assignors")

Kim BURGARD, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Jeremy KROLL, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Sarah M. LAYTON, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Volker OHLINGER, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Francois-Xavier ORVEILLON, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of France
Stefan PESCH, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Michael Dennis PIONTKOWSKI, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Michael B. ROOF, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Philip UTLEY, 502 8th Avenue, Slater, IA 50244, USA – a citizen of the USA
Eric Martin VAUGHN, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA

inventor/s and applicant/s of an invention related to:

"NOVEL EUROPEAN PRRSV STRAIN"

for which a first application was filed in the **USA**
Serial No.: **US 61/444074**
Filing Date: **February 17, 2011**

do hereby assign, and transfer all my/our rights, title and interest in and to the same to

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
residing in
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany

to whom assignment has been made of all rights and title to the said invention for the following territories:

Argentina, Brazil, Canada, Chile, China, Colombia, Ecuador, Egypt, Georgia, India, Indonesia, Mexico, Nigeria, OAPI, Pakistan, Peru, South Africa, Taiwan, Thailand, Uruguay, Venezuela, Viet Nam, GCC Member States and the United Arabian Emirates

aforesaid without any restriction whatever.
Done and signed at

../2

Kim BURGARD — Date

Jeremy KROLL — Date

Sarah M. LAYTON — Date

Volker OHLINGER — 01-12-2012 Date

Francois-Xavier ORVEILLON — Date

Stefan PESCH — 01-12-2012 Date

Michael Dennis PIONTKOWSKI — Date

Michael B. ROOF — Date

Philip UTLEY — Date

Eric-Martin VAUGHN — Date

NR 5 I 2012 des Notars Prof. Dr. Bernhard Grün
Vorstehende vor mir vollzogene Unterschrift des Herrn
Dr. Volker Ohlinger (geb. am 11.5.1954) Pieperfeld.
weg 131 in Havixbeck und des Herrn Stefan Pesch
(geb. 14.6.1965) Henrik-Dahl 6 in Münster
beglaubige ich hiermit. Die Unterschriftsleistenden
wiesen sich durch gültigen Personalausweis der BRD
aus. Auf Befragen verneinten sie eine Vorbefassung
nach § 3 Abs. 1 Nr. 7 BeurkG.
Münster, den 12. Januar 2012 Bernhard Grün
Notar

Conformity of the above copy with the original is hereby certified.

Ingelheim am Rhein, the 04th day of June 2013 /Ge

Notary junior judge Mascha Diefenbach
as officially appointed representative of
the notary Horst Heintskill with his office in Ingelheim am Rhein

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland

Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von Notarassessorin Mascha Diefenbach
3. in ihrer Eigenschaft als amtlich bestellte Vertreterin des Notars Horst Heintskill mit dem Amtssitz in Ingelheim am Rhein
4. sie ist versehen mit dem Stempel/Siegel Horst Heintskill - Notar in Ingelheim am Rhein

Bestätigt

5. in Mainz
6. am 10. Jun. 2013
7. durch die Präsidentin des Landgerichts
8. unter Nr. 1092/2013
9. Siegel/Stempel
10. Unterschrift
In Vertretung:

Benno Henrich
Vizepräsident

Kostenrechnung:
Gebühr für die Erteilung der Legalisation
Wert: 3.000,00 €
JVKostO v. 26.7.1957
i.V.m. § 45 KostO
Gebühr: 10,00 €

Mainz, den 10. Jun. 2013

Justizsekretärin

Certified Copy

Assignment of Inventors and Priority Rights

For good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, the undersigned (the "Assignors")

Kim BURGARD, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Jeremy KROLL, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Sarah M. LAYTON, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Volker OHLINGER, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Francois-Xavier ORVEILLON, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of France
Stefan PESCH, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Michael Dennis PIONTKOWSKI, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Michael B. ROOF, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Philip UTLEY, 502 8th Avenue, Slater, IA 50244, USA – a citizen of the USA
Eric Martin VAUGHN, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA

inventor/s and applicant/s of an invention related to:

"NOVEL EUROPEAN PRRSV STRAIN"

for which a first application was filed in the **USA**
Serial No.: **US 61/444074**
Filing Date: **February 17, 2011**

do hereby assign, and transfer all my/our rights, title and interest in and to the same to

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
residing in
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany

to whom assignment has been made of all rights and title to the said invention for the following territories:

Argentina, Brazil, Canada, Chile, China, Colombia, Ecuador, Egypt, Georgia, India, Indonesia, Mexico, Nigeria, OAPI, Pakistan, Peru, South Africa, Taiwan, Thailand, Uruguay, Venezuela, Viet Nam, GCC Member States and the United Arabian Emirates

aforesaid without any restriction whatever.
Done and signed at

../2

_____ _____

Kim BURGARD Date

_____ _____

Jeremy KROLL Date

State of _____)
County of _____)

On this ___ day of _____ in the year 20___ , before me, the undersigned notary public, personally appeared Jeremy Kroll , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

_____
_____, Notary Public
My Commission Expires: _____

_____ _____

Sarah M. LAYTON Date

State of _____)
County of _____)

On this ___ day of _____ in the year 20___ , before me, the undersigned notary public, personally appeared Sarah M. Layton , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that she executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

_____
_____, Notary Public
My Commission Expires: _____

_____ _____

Volker OHLINGER Date

_____ _____

Francois-Xavier ORVEILLON Date

_____ _____

Stefan PESCH Date

Michael Dennis PIONTKOWSKI

23 Jan 2012
Date

State of Missouri)
County of Buchanan)

On this 23 day of January in the year 2012, before me, the undersigned notary public, personally appeared Michael Dennis Piontkowski , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

Christina N. Ostorga, Notary Public
My Commission Expires: 2-14-2014

CHRISTINA N. OSTORGA
Notary Public - Notary Seal
STATE OF MISSOURI
Andrew County
My Commission Expires: 2-14-2014
Commission # 10839439

Michael B. ROOF

Date

State of _____)
County of _____)

On this ___ day of _____ in the year 20___ , before me, the undersigned notary public, personally appeared Michael B. Roof , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

_____, Notary Public
My Commission Expires: _____

Philip UTLEY

Date

State of _____)
County of _____)

On this ___ day of _____ in the year 20___ , before me, the undersigned notary public, personally appeared Philip Utley , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

_____, Notary Public
My Commission Expires: _____

_____ _____

Eric-Martin VAUGHN Date

State of _____)
County of _____)

On this ___ day of _____ in the year 20___ , before me, the undersigned notary public, personally appeared Eric Martin Vaughn , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

_____
_____, Notary Public
My Commission Expires: _____

Conformity of the above copy with the original is hereby certified.

Ingelheim am Rhein, the 04th day of June 2013 /Ge

Notary junior judge Mascha Diefenbach
as officially appointed representative of
the notary Horst Heintskill with his office in Ingelheim am Rhein

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland

Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von Notarassessorin Mascha Diefenbach
3. in ihrer Eigenschaft als amtlich bestellte Vertreterin des Notars Horst Heintskill mit dem Amtssitz in Ingelheim am Rhein
4. sie ist versehen mit dem Stempel/Siegel Horst Heintskill - Notar in Ingelheim am Rhein

Bestätigt

5. in Mainz
6. am 10. Jun. 2013
7. durch die Präsidentin des Landgerichts
8. unter Nr. 1091/2013
9. Siegel/Stempel
10. Unterschrift
In Vertretung:

Benno Henrich
Vizepräsident

Kostenrechnung:

Gebühr für die Erteilung der Legalisation
Wert: 3.000,00 €
JVKostO v. 26.7.1957
i.V.m. § 45 KostO
Gebühr: 10,00 €

Mainz, den 10. Jun. 2013

Justizsekretärin

Certified Copy

Assignment of Inventors and Priority Rights

For good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, the undersigned (the "Assignors")

Kim BURGARD, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Jeremy KROLL, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Sarah M. LAYTON, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Volker OHLINGER, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Francois-Xavier ORVEILLON, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of France
Stefan PESCH, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Michael Dennis PIONTKOWSKI, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Michael B. ROOF, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Philip UTLEY, 502 8th Avenue, Slater, IA 50244, USA – a citizen of the USA
Eric Martin VAUGHN, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA

inventor/s and applicant/s of an invention related to:

"NOVEL EUROPEAN PRRSV STRAIN"

for which a first application was filed in the **USA**
Serial No.: **US 61/444074**
Filing Date: **February 17, 2011**

do hereby assign, and transfer all my/our rights, title and interest in and to the same to

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
residing in
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany

to whom assignment has been made of all rights and title to the said invention for the following territories:

Argentina, Brazil, Canada, Chile, China, Colombia, Ecuador, Egypt, Georgia, India, Indonesia, Mexico, Nigeria, OAPI, Pakistan, Peru, South Africa, Taiwan, Thailand, Uruguay, Venezuela, Viet Nam, GCC Member States and the United Arabian Emirates

aforesaid without any restriction whatever.
Done and signed at

Kim BURGARD — Date

Jeremy KROLL — 26 JAN 2012 — Date

State of Iowa)
County of Story)

On this 26 day of Jan in the year 2012, before me, the undersigned notary public, personally appeared Jeremy Kroll, known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

Connie L Harris
_____, Notary Public
My Commission Expires: 7-3-12

CONNIE L HARRIS
Notarial Seal - Iowa
Commission # 703964
My Commission Expires 7-3-12

Sarah M Layton — 26 Jan 2012

Sarah M. LAYTON — Date

State of Iowa)
County of Story)

On this 26 day of Jan in the year 2012, before me, the undersigned notary public, personally appeared Sarah M. Layton, known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that she executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

Connie L Harris
_____, Notary Public
My Commission Expires: 7-3-12

CONNIE L HARRIS
Notarial Seal - Iowa
Commission # 703964
My Commission Expires 7-3-12

Volker OHLINGER — Date

Francois-Xavier ORVEILLON — Date

Stefan PESCH — Date

Michael Dennis PIONTKOWSKI _____ Date

State of _____)
County of _____)

On this ___ day of _____ in the year 20___ , before me, the undersigned notary public, personally appeared Michael Dennis Piontkowski , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

_____
_____, Notary Public
My Commission Expires: _____

Michael B. ROOF 26 June 2012 Date

State of Iowa)
County of Story)

On this 26 day of Jan in the year 2012, before me, the undersigned notary public, personally appeared Michael B. Roof , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

Connie L Harris
_____, Notary Public
My Commission Expires: 7-3-12

CONNIE L HARRIS
Notarial Seal - Iowa
Commission # 703964
My Commission Expires 7-3-12

_____ _____
Philip UTLEY Date

State of _____)
County of _____)

On this ___ day of _____ in the year 20___ , before me, the undersigned notary public, personally appeared Philip Utley , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

_____
_____, Notary Public
My Commission Expires: _____

Eric-Martin VAUGHN

Jan. 26, 2012
Date

State of Iowa)
County of Story)

On this 26 day of Jan in the year 2012, before me, the undersigned notary public, personally appeared Eric Martin Vaughn , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

Connie L Harris
, Notary Public
My Commission Expires: 7-3-12

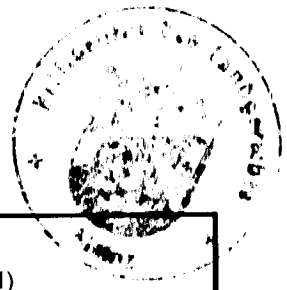
CONNIE L HARRIS
Notarial Seal - Iowa
Commission # 703964
My Commission Expires 7-3-12

Conformity of the above copy with the original is hereby certified.

Ingelheim am Rhein, the 04th day of June 2013 /Ge

Notary junior judge Mascha Diefenbach
as officially appointed representative of
the notary Horst Heintskill with his office in Ingelheim am Rhein





APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1.	Land:	Bundesrepublik Deutschland
	Diese öffentliche Urkunde	
2.	ist unterschrieben von	Notarassessorin Mascha Diefenbach
3.	in ihrer Eigenschaft als	amtlich bestellte Vertreterin des Notars Horst Heintskill mit dem Amtssitz in Ingelheim am Rhein
4.	sie ist versehen mit dem Stempel/Siegel	Horst Heintskill - Notar in Ingelheim am Rhein

Bestätigt

5.	in	Mainz	**6.** am	10. Jun. 2013
7.	durch die	Präsidentin des Landgerichts		
8.	unter Nr.	1089/2013		

9. Siegel/Stempel



10. Unterschrift
In Vertretung:

Benno Henrich
Vizepräsident

Kostenrechnung:
Gebühr für die Erteilung der Legalisation
Wert: 3.000,00 €
JVKostO v. 26.7.1957
i.V.m. § 45 KostO
Gebühr: 10,00 €

Mainz, den 10. Jun. 2013

Justizsekretärin

Certified Copy

Assignment of Inventors and Priority Rights

For good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, the undersigned (the "Assignors")

Kim BURGARD, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Jeremy KROLL, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Sarah M. LAYTON, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Volker OHLINGER, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Francois-Xavier ORVEILLON, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of France
Stefan PESCH, Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany – a citizen of Germany
Michael Dennis PIONTKOWSKI, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Michael B. ROOF, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Philip UTLEY, 502 8th Avenue, Slater, IA 50244, USA – a citizen of the USA
Eric Martin VAUGHN, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA

inventor/s and applicant/s of an invention related to:

"NOVEL EUROPEAN PRRSV STRAIN"

for which a first application was filed in the **USA**
Serial No.: **US 61/444074**
Filing Date: **February 17, 2011**

do hereby assign, and transfer all my/our rights, title and interest in and to the same to

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
residing in
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany

to whom assignment has been made of all rights and title to the said invention for the following territories:

Argentina, Brazil, Canada, Chile, China, Colombia, Ecuador, Egypt, Georgia, India, Indonesia, Mexico, Nigeria, OAPI, Pakistan, Peru, South Africa, Taiwan, Thailand, Uruguay, Venezuela, Viet Nam, GCC Member States and the United Arabian Emirates

aforesaid without any restriction whatever.
Done and signed at

../2

Kim BURGARD _____ Date _____

Jeremy KROLL _____ Date _____

State of _____)
County of _____)

On this ___ day of _____ in the year 20___ , before me, the undersigned notary public, personally appeared Jeremy Kroll , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

_____
_____, Notary Public
My Commission Expires: _____

Sarah M. LAYTON _____ Date _____

State of _____)
County of _____)

On this ___ day of _____ in the year 20___ , before me, the undersigned notary public, personally appeared Sarah M. Layton , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that she executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

_____
_____, Notary Public
My Commission Expires: _____

Volker OHLINGER _____ Date _____

Francois-Xavier ORVEILLON _____ Date _____

Stefan PESCH _____ Date _____

Michael Dennis PIONTKOWSKI Date

State of _____)
County of _____)

On this ___ day of _____ in the year 20___ , before me, the undersigned notary public, personally appeared Michael Dennis Piontkowski , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

_____
_____, Notary Public
My Commission Expires: _____

Michael B. ROOF Date

State of _____)
County of _____)

On this ___ day of _____ in the year 20___ , before me, the undersigned notary public, personally appeared Michael B. Roof , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

_____
_____, Notary Public
My Commission Expires: _____

Philip Utley 1/25/12
Philip UTLEY Date

State of Iowa)
County of Story)

On this 25 day of JAN in the year 2012, before me, the undersigned notary public, personally appeared Philip Utley , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

Randy D. Peel 1-25-12
_____, Notary Public
My Commission Expires: 7-26-2013

RANDY D. PEEL
Commission Number 711634
My Commission Expires
7-26-2013

_____ _____

Eric-Martin VAUGHN Date

State of _____)
County of _____)

On this ___ day of _____ in the year 20___ , before me, the undersigned notary public, personally appeared Eric Martin Vaughn , known to me to be the person whose name is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

_____
_____, Notary Public
My Commission Expires: _____

Conformity of the above copy with the original is hereby certified.

Ingelheim am Rhein, the 04th day of June 2013 /Ge

Notary junior judge Mascha Diefenbach
as officially appointed representative of
the Notary Horst Heintskill with his office in Ingelheim am Rhein

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland

Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von Notarassessorin Mascha Diefenbach
3. in ihrer Eigenschaft als amtlich bestellte Vertreterin des Notars Horst Heintskill mit dem Amtssitz in Ingelheim am Rhein
4. sie ist versehen mit dem Stempel/Siegel Horst Heintskill - Notar in Ingelheim am Rhein

Bestätigt

5. in Mainz
6. am 10. Jun. 2013
7. durch die Präsidentin des Landgerichts
8. unter Nr. 1090/2013
9. Siegel/Stempel
10. Unterschrift
In Vertretung:

Benno Henrich
Vizepräsident

Kostenrechnung:
Gebühr für die Erteilung der Legalisation
Wert 3.000,00 €
JVKostO v. 26.7.1957
i V m § 45 KostO
Gebühr 10,00 €

Mainz, den 10 Jun. 2013

Justizsekretärin

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
23 August 2012 (23.08.2012)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/110489 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/12 (2006.01) *C12N 7/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2012/052475

(22) International Filing Date:
14 February 2012 (14.02.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/444,074 17 February 2011 (17.02.2011) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH** [DE/DE]; Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **BURGARD, Kim** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **KROLL, Jeremy** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **LAYTON, Sarah M.** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **OHLINGER, Volker** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **ORVEILLON, Francois-Xavier** [FR/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **PESCH, Stefan** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **PIONTKOWSKI, Michael Dennis** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **ROOF, Michael B.** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **UTLEY, Philip** [US/US]; 502 8th Avenue, Slater, Iowa 50244 (US). **VAUGHN, Eric Martin** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US).

(74) Agents: **HAMMANN ET AL., Heinz** et al.; Boehringer Ingelheim GmbH, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

— *with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: NOVEL EUROPEAN PRRSV STRAIN

(57) Abstract: The present invention is related to improved modified live PRRS vaccines containing new PRRSV European strains of PRRSV and methods of use and manufacture of such vaccines.

WO 2012/110489 A2

NOVEL EUROPEAN PRRSV STRAIN

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention relates to a live attenuated strain of a European Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), methods for the production of such strains, vaccines based thereon and methods for the production of such vaccines and the use thereof in the treatment of swine.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is viewed by many as the most important disease currently affecting the pig industry worldwide. The syndrome first was described in 1987 in the United States as "mystery swine disease" and rapidly spread across the globe. It causes severe reproduction losses, is associated with increased mortality due to secondary infections, and is linked to reduced feed conversion and average daily weight gain. Unfortunately, control of the virus that causes PRRS has proven to be difficult.

[0003] PRRS virus (PRRSV) is an enveloped single stranded RNA virus classified in the family Arteriviridae (Cavanaugh, 1997). It causes a widespread disease of swine that was first described as `mystery swine disease` in the USA in 1987 (Hill, 1990). The disease manifests as respiratory illness in all age groups of swine leading to death in some younger pigs and severe reproductive problems in breeding age females.

[0004] Transmission of the PRRSV can, and often does, occur through direct contact between infected and susceptible pigs. Transmission over very short distances by air or through semen also may occur. Once infected, the virus can remain in the blood of adults for about two weeks, and in infected pigs for one to two months or more. Infected boars may shed the virus in the semen for more than 100 days. This long period of viremia significantly increases the possibility of transmission. In addition, the PRRS virus can cross the placenta during the last third of the gestation period to infect piglets in utero and cause stillbirth or weak-born piglets.

[0005] All types and sizes of herds, including those with high or ordinary health status or from either indoor or outdoor units, can be infected with PRRS virus. Infected herds may experience severe reproductivity losses, as well as, increased levels of post weaning pneumonia with poor growth. The reproductive phase typically lasts for two to three months; however, post weaning problems often become endemic. The reproductive disease is characterized by an abortion outbreak that affects both sows and gilts in the last term of gestation. Premature farrowings around 109 and 112 days of gestation occur. The number of stillbirths and weak-born piglets increases and results in a considerable increase in pre-weaning mortality.

[0006] The respiratory phase traditionally has been seen in the nursery, especially in continuous flow nurseries. However, respiratory problems caused by PRRS virus can also be seen in the finisher as part of the porcine respiratory disease complex (PRDC). A reduction in growth rate, an increase in the percentage of unmarketable pigs, and elevated post weaning mortality can occur. Diagnostic findings indicate high levels of pneumonia that associate with the PRRS virus together with a wide variety of other microbials commonly seen as secondary infectious agents. Bacterial isolates may include *Streptococcus suis, Haemophilus suis, Actinobacillus pleuropneumoniae, Actinobacillus suis, Mycoplasma hyopneumoniae,* and *Pasteurella multocida* among others. Viral agents commonly involved include swine influenza virus and porcine respiratory corona virus. Affected pigs rarely respond to high levels of medication, and all-in/all-out systems have failed to control the disease.

[0007] PRRSV virus exists as two genotypes referred to as "US" and "EU" type which share about 50% sequence homology (Dea S et al. (2000). Arch Virol 145:659-88). These two genotypes can also be distinguished by their immunological properties. Most sequencing information on various isolates is based on the structural proteins, namely the envelope protein GP5 which accounts for only about 4% of the viral genome, while only little is known on the non-structural proteins (nsp). Isolation of PRRSV and manufacture of vaccines have

been described in a number of publications (WO 92/21375, WO 93/06211, WO93/03760, WO 93/07898, WO 96/36356, EP 0 676 467, EP 0 732 340, EP 0 835 930).

[0008] Vaccination is the key method for alleviating the burden of PRRS as pigs that recover from a PRRS infection will develop an immune response, which under normal circumstances will protect them from being infected again by the same virus strain. However, PRRS virus has the ability to change (by mutation or recombination); and therefore, new viral strains may arise. In such cases, cross protection between strains may not exist, and new outbreaks may be observed in farms that had been infected previously. Thus there is a continuing need for additional vaccines.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0009] The present invention is related to improved modified live PRRS vaccines of European genotype and new PRRSV strains which can be used for the manufacture of such vaccines. In particular, the invention provides improved PRRS virus strains that have been deposited with the European Collection of Cell Cultures (ECACC) under the Accession Numbers ECACC 11012501 and ECACC 11012502 each deposited on January 25, 2011 in accordance with the provisions of the Budapest Treaty, or any descendant or progeny of one of the aforementioned strains.

[0010] In particular embodiments, the present invention describes a Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) of a European type, which is of the strain deposited with European Collection of Cell Cultures (ECACC) under the Accession Numbers ECACC 11012501 or Accession Numbers ECACC 11012502.

[0011] The PRRSV is characterized in that the virus is attenuated by passaging at least 36 times in cell culture such that when the modified virus is administered to a swine or other mammal prone to PRRSV, it fails to cause clinical

signs of PRRSV disease but is capable of inducing an immune response that immunizes the mammal against pathogenic forms of PRRSV.

[0012] Also contemplated is a method for the preparation of the live attenuated PRRSV deposited with European Collection of Cell Cultures (ECACC) under the Accession Numbers ECACC 11012502 or one attenuated from a parental strain deposited at Accession Numbers ECACC 11012501, comprising adapting an MA 104-grown PRRSV of a European type to non-MA 104 mammalian cells.

[0013] Another aspect of the invention contemplates a vaccine for the protection of pigs against PRRSV infection, comprising the live attenuated PRRSV deposited with European Collection of Cell Cultures (ECACC) under the Accession Numbers ECACC 11012502 or one attenuated from a parental strain deposited at Accession Numbers ECACC 11012501 and a pharmaceutically acceptable carrier. Such a vaccine may advantageously further comprise one or more non-PRRSV attenuated or inactivated pathogens or antigenic material thereof. For example, the non-PRRSV pathogens may be selected from Pseudorabies virus, Porcine influenza virus, Porcine parvovirus, Transmissible gastroenteritis virus, Escherichia coli, Erysipelo rhusiopathiae, Bordetella bronchiseptica, Salmonella cholerasuis, Haemophilus parasuis, Pasteurella multocida, Streptococcus suis, Mycoplasma hyopneumoniae and Actinobacillus pleuropneumoniae.

[0014] In other embodiments, the vaccine may further comprise one or more additional European PRRSV strains selected from the group consisting of a PRRSV strain deposited under the Accession Numbers Lelystad virus strain (Lelystad Agent (CDI-NL-2.91), or other strains such as those deposited under the Accession Numbers ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, CNCM Accession No. I-1140, CNCM Accession No I-1387, CNCM Accession No I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474, and VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, or ECACC V93070108 or indeed may be a U.S. strain such as North American PRRS virus, pT7P129A; ATCC deposit VR-2332, ATCC deposit VR-2368; ATCC VR-2495;

ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474, and ATCC VR 2402.

[0015] It is contemplated that the vaccine may comprise a carrier that is suitable for intradermal or intramuscular application. In some embodiments, the vaccine is in freeze-dried form. In specific embodiments, the vaccine comprises at least about 107 virus particles.

[0016] Another aspect of the invention relates to a method for the preparation of a live attenuated vaccine for combating PRRS, comprising admixing a live attenuated PRRSV virus deposited with European Collection of Cell Cultures (ECACC) under the Accession Number ECACC 11012502 or one attenuated from a parental strain deposited at Accession Numbers ECACC 11012501 with a pharmaceutically acceptable carrier. In such methods the live attenuated PRRSV may preferably further comprise one or more additional European PRRSV strains selected from the group consisting of a PRRSV strain deposited under the Accession Numbers ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, CNCM Accession No. I-1140, CNCM Accession No I-1387, and CNCM Accession No I-1388.

[0017] In some embodiments, the live attenuated PRRSV may further comprise an adjuvant.

[0018] Also contemplated is a method of immunizing swine against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), the method comprising the step of administering to swine a vaccine composition including a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus mixed with a pharmacologically compatible carrier agent, the virus comprising PRRS 94881 virus passaged at least 36 times in cell culture to modify the virus such that when the modified virus is administered to a swine or other mammal prone to PRRS, it fails to cause clinical signs of PRRS disease but is capable of inducing an immune response that immunizes the mammal against pathogenic forms of PRRS.

[0019] In some embodiments, the method is performed wherein the swine presents no lung lesions after vaccination. In other embodiments, the swine presents fewer lung lesions after vaccination as compared to vaccination with Porcilis vaccine.

[0020] Another aspect of the invention relates to a PRRS virus having a nucleotide sequence that is at least 95% homologous with the sequence set forth in either SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:10.

[0021] Also contemplated is a PRRS virus that comprises at least one ORF that encodes a protein that is at least 98% identical to any of the sequences set forth in SEQ ID NO: 2 to 9 or SEQ ID NO:11 to SEQ ID NO:18.

[0022] Also contemplated is a PRRS virus that has a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:10 or a fragment of either SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 wherein the fragment encodes an ORF selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, and SEQ ID NO:18.

[0023] The invention further relates to a subunit vaccine for vaccination of a porcine animal wherein the vaccine comprises one or more nucleotides selected from the group consisting of a nucleotide that encodes an ORF selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, and SEQ ID NO:18.

[0024] Another aspect of the invention relates to a subunit vaccine for vaccination of a porcine animal wherein the vaccine comprises one or more nucleotides selected from the group consisting of SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:25;

SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:30; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:33; and SEQ ID NO:34.

[0025] Also contemplated is a composition comprising one or more proteins selected from the group consisting of a protein having the sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, and SEQ ID NO:18.

[0026] Also contemplated is an isolated nucleic acid comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:30; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:34.

[0027] The invention further relates to a recombinant expression vector and/or vaccine comprising such expression vectors, wherein said vectors comprise a nucleic acid sequence that encodes one or more PRRSV ORFs selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, and SEQ ID NO:18 operably linked to a promoter. In such embodiments, the nucleic acid encoding the ORFs may preferably be selected from the group consisting of SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:30; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:33; and SEQ ID NO:34.

BRIEF DESCRIPTION OF SEVERAL VIEWS OF THE DRAWINGS

[0028] Figure 1A: Clinical observation of cough score in respiratory challenge model using European challenge strain.

[0029] Figure 1B: Clinical observation of total clinical score in respiratory challenge model using a European challenge strain.

[0030] Figure 2: Rectal temperature measurements in respiratory challenge model using a European challenge strain.

[0031] Figure 3: Average daily weight gain measurements in respiratory challenge model using a European challenge strain.

[0032] Figure 4: PRRS viremia as indicated through quantitative PCR in respiratory challenge model using a European challenge strain.

[0033] Figure 5: PRSS Serology as indicated by ELISA in respiratory challenge model using a European challenge strain.

[0034] Figure 6: Macroscopic examination of lung lesions in in respiratory challenge model using a European challenge strain.

[0035] Figure 7A-C: Histopathology measurements. Figure 7A shows means macroscopic lung lesions; Figure 7B shows control animal histopathology; Figure 7B shows PRRS infected animal histopathology.

[0036] Figure 8: Shows RT-PCT Time PCR results depicting % viremia in animals vaccinated with EU PRRS 94881.

[0037] Figure 9: Concurrent process for large-scale production of EU PRRS 94881.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0038] The present invention provides methods of treating or reducing the severity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection, as well as, methods of preventing PRRSV infection. Generally, the method is for treating or reducing the severity of or incidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. "Treating or reducing the severity of or incidence of" refers to a reduction in the severity of clinical signs, symptoms, and/or pathological signs normally associated with infection, up to and including prevention of any such signs or symptoms. "Pathological signs" refers to evidence of infection that is found microscopically or during necropsy (e.g. lung lesions).

[0039] The method generally includes the step of administering a therapeutic amount of a PRRSV antigen to a swine of a defined age or age range. For example, in one aspect of the invention, one therapeutic amount of a PRRSV antigen may be administered to a piglet about three-weeks-old or younger, and different therapeutic amounts of the antigen may be administered to a pig between about 3 weeks of age and 4 weeks of age. Similarly, an even different therapeutic amount might be administered to a pig between about four weeks and sixteen weeks of age (or any age within this range, e.g. five weeks to six weeks of age, nine weeks to fifteen weeks of age, seven weeks to ten weeks of age, etc), or to pig older than sixteen weeks, such as an adult sow.

[0040] In specific embodiments, the present invention relates to an attenuated, atypical PRRSV strain and corresponding improved modified-live vaccines which confer effective immunity to this newly discovered typical PRRSV strain. "Effective immunity" refers to the ability of a vaccine to prevent swine PRRSV infections, including atypical PRRSV infections, which result in substantial clinical signs of the disease. It should be understood that the immunized swine may or may not be serologically positive for PRRSV, but the swine do not exhibit any substantial clinical symptoms.

[0041] In preferred forms, the vaccine of the invention includes a live European type PRRS live virus which has been attenuated in virulence. The resulting attenuated virus has been shown to be avirulent in challenged controlled host animal studies and to confer effective immunity. This particular strain of EU PRRS is not as virulent as others and hence, it is an attractive option as a vaccine candidate. The PRRSV 94881 parental strain does not cause severe, atypical PRRS disease in the pregnant sow nor severe lung lesions in young pigs. This strain was initially isolated from in the North Rhine Westphalia, Germany from a 3 week old piglet with severe respiratory disorder. The strain was subsequently attenuated via continuous passage in MA 104 cells. The attenuated strain was deposited by Bioscreen GmbH, Mendelstrasse 11, 48149, Muenster, Germany, in the European Collection of Cell Cultures (ECACC), Porton Down, Salisbury,

Wiltshire, SP4 0JG, Great Britain, on January 25 2011 and was accorded Accession No. 11012502. This attenuated virus is a preferred Master Seed Virus (MSV) which has been subsequently passaged and developed as an effective PRRSV vaccine. The virulent parent strain denominated 94881 also was deposited in accordance with the Budapest Treaty by Bioscreen GmbH, Mendelstrasse 11, 48149, Muenster, Germany at the European Collection of Cell Cultures (ECACC), Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Great Britain, on January 25 2011 and was accorded Accession No. 11012501.

[0042] In certain exemplary embodiments the modified live virus vaccine was tested at a dosage of 1ml for pigs and 2 ml for sows via intramuscular injection and was shown to be efficacious in producing protective immunity.

[0043] Passaging of the virus to attenuation was accomplished using classical virology methods. Specifically, the parental isolate PRRS 94881 was attenuated in vitro through continuous passing in MA 104 cells to achieve a maximum passage of 108 passes past initial isolation. Briefly, the material was passed at roughly 1 to 2 passes per week for a total of 108 passes in T-25cm^2 or T-75cm^2 flasks. Confluent MA 104 cell cultures with approximately 12 - 30 mL of Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with 6% fetal bovine serum (FBS) were inoculated with 100 to 300 µl of the virus. Cultures were incubated for 3 - 7 days in a humidified chamber incubator at 37°C with 4 - 6% CO_2. Once cultures reached > 25% cytopathic effect (CPE), the flask was harvested by extracting the supernatant. A portion of the supernatant was passed into a new flask and 2 mL of the harvest was aliquoted for storage at -60°C to -80°C.

[0044] The skilled person using standard techniques in the art will be able to determine the underlying nucleic acid sequence of the attenuated virus has been deposited ECACC under Accession No. 11012502. The present invention therefore further embraces a nucleic acid sequence specific for the attenuated PRRSV 94481 deposited at ECACC under Accession No. 11012502. Preferably, the invention further embraces PRRS virus nucleic acid sequences that share at least 95% sequence homology with the sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID

NO:10 as such viruses may likely be effective at conferring immunity upon animals vaccinated with attenuated viruses containing such homologous sequences. The sequence shown in SEQ ID NO:1 is the full length sequence of the attenuated PRRS 94881 MSV and has a full length sequence of 14843 bp. The ORFS 1 through 7 have been annotated for this sequence as follows:

ORF Number	CDS in SEQ ID NO:1	Protein encoded
ORF1a	178 to 7227	SEQ ID NO:2
ORF1b	7209 to 11600	SEQ ID NO:3
ORF2	11611 to 12360	SEQ ID NO:4
ORF3	12219 to 13016	SEQ ID NO:5
ORF4	12761 to 13312	SEQ ID NO:6
ORF5	13309 to 13914	SEQ ID NO:7
ORF6	13902 to 14423	SEQ ID NO:8
ORF7	14413 to 14799	SEQ ID NO:9

[0045] The sequence shown in SEQ ID NO:10 is the full length sequence of the parental PRRSV 94881 strain, passage 5 and has a full length sequence of 14843 bp. The ORFS 1 through 7 have been annotated for this sequence as follows:

ORF Number	CDS in SEQ ID NO:10	Protein encoded
ORF1a	178 to 7227	SEQ ID NO:11
ORF1b	7209 to 11600	SEQ ID NO:12
ORF2	11611 to 12360	SEQ ID NO:13
ORF3	12219 to 13016	SEQ ID NO:14
ORF4	12761 to 13312	SEQ ID NO:15

ORF5	13309 to 13914	SEQ ID NO:16
ORF6	13902 to 14423	SEQ ID NO:17
ORF7	14413 to 14799	SEQ ID NO:18

[0046] With the isolation of this new attenuated European PRRS virus strain it is possible to produce improved PRRS vaccines containing a most recent PRRS strain that is reflective of virulent PRRS strains found currently in the field. In particular, the new attenuated European PRRS virus may be used to prepare modified live vaccines (MLV). A modified live vaccine is characterized in that it contains live virus which can replicate in pigs, but does not exert clinical disease of PRRS. Furthermore, upon administration it induces an immunological response in pigs which generally leads to a significant extent of protection against subsequent infection with pathogenic PRRS virus. Virus showing such characteristics is usually called attenuated virus. In addition, the present invention provides details of the sequences of the ORFs of both the parental and the attenuated strains of PRRSV 94881. Thus, it is contemplated that the skilled person may employ the sequences of any one or more of the ORFs shown herein in a subunit vaccine.

[0047] As noted above, in general, attenuation of virus may be generated from pathogenic virus isolates by repeated passaging in suitable host cells that are permissive to the virus until the virus shows the desired properties (WO 92/21375 , WO 93/06211, WO93/03760, WO 93/07898, WO 96/36356, EP 0 676 467, EP 0 732 340, EP 0 835 930). Alternatively, it may be generated by genetic reengineering through use of an infectious clone, normally a full-length complementary DNA transcript of the viral genome (WO 98/18933, EP 1 018 557, WO 03/062407, Nielsen et al, J Virol 2003, 77:3702-371 1). In a preferred embodiment, the present invention relates to a MLV containing attenuated PRRS virus of European genotype 94481 that is attenuated from a parental virus that is deposited at ECACC under Accession No. 11012501. A preferred MLV contains

the attenuated virus of the present invention that is deposited at ECACC under Accession No. 11012502.

[0048] In another aspect, the present invention contemplates preparation and isolation of a progeny or descendant of a PPRS virus that has been deposited on Janaury 25 2011 with the European Collection of Cell Cultures (ECACC), Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Great Britain, under the Accession Numbers ECACC 11012502 (attenuated strain for MLV) and 11012501 (parental strain). The invention therefore extends to PRRS virus strains which are derived from the deposited strains through propagation or multiplication in an identical or divergent form, in particular descendants which possess the essential characteristics of the deposited strains. Upon continued propagation, the strains may acquire mutations most of which will not alter the properties of these strains significantly.

[0049] The strains of the invention may also be further modified to impart further desirable properties to them. This may be achieved by classical propagation and selection techniques, like continued propagation in suitable host cells to extend the attenuated phenotype. Alternatively, the strains may be genetically modified by directed mutation of the nucleic acid sequence of the genome of these strains by suitable genetic engineering techniques. The genome of PRRSV was completely or partly sequenced (Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993a, Murtaugh et al, 1995) and encodes, besides the RNA dependent RNA polymerase (ORFs 1a and 1b), six structural proteins of which four envelope glycoproteins named GP2 (ORF2), GP3 (ORF3), GP4 (ORF4) and GP5 (ORF5), a non-glycosylated membrane protein M (ORF6) and the nucleocapsid protein N (ORF7) (Meulenberg et al. 1995, 1996; van Nieuwstadt et al., 1996). Immunological characterization and nucleotide sequencing of European and US strains of PRRSV has identified minor antigenic differences within strains of PRRSV located in the structural viral proteins (Nelson et al., 1993; Wensvoort et al., 1992; Murtaugh et al., 1995). The PRRS 94881 MSV of the present invention has been compared with the European Reference Virus strain Lelystad Virus (LV)

revealed nucleotide homologies ranging from 85.40 to 95.09 percent in the 8 different viral genes and amino acid identities from 86.39 to 97.27 percent between both virus strains. Two deletions in the ORF 1a of 94881 MSV could be identified compared to LV. For example, ORF1a of 94881 MSV has 85.40% nucleotide homology to Lelystad Virus resulting in an amino acid identity of 86.39%; ORF1b of 94881 MSV has 92.12% nucleotide homology to Lelystad Virus resulting in an amino acid identity of 97.27%; ORF2 of 94881 MSV has 91.07% nucleotide homology to Lelystad Virus resulting in an amino acid identity of 90.76%; ORF3 of 94881 MSV has 90.98% nucleotide homology to Lelystad Virus resulting in an amino acid identity of 89.43%; ORF4 of 94881 MSV has 90.58% nucleotide homology to Lelystad Virus resulting in an amino acid identity of 87.43%; ORF5 of 94881 MSV has 90.43% nucleotide homology to Lelystad Virus resulting in an amino acid identity of 88.56%; ORF6 of 94881 MSV has 95.02% nucleotide homology to Lelystad Virus resulting in an amino acid identity of 97.11%; ORF7 of 94881 MSV has 95.09% nucleotide homology to Lelystad Virus resulting in an amino acid identity of 92.97%;

[0050] Indeed, the PRRS 94881 virus of the present invention may be made into a chimeric virus wherein the backbone of the PRRS virus under ECACC Accession No. 11012502 or indeed the parent strain deposited under ECACC Accession No 11012501 is modified to replace the endogenous sequence of one or more of ORF 1a, ORF 1b, ORF 2, ORF 3, ORF 4, ORF 5, ORF 6, or ORF 7 with the corresponding ORF from a different strain of PRRS virus. For example, the different strain of the PRRS virus may be a different European strain such as Lelystad virus strain (Lelystad Agent (CDI-NL-2.91), or other strains such as those deposited under the Accession Numbers ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, CNCM Accession No. I-1140, CNCM Accession No I-1387, CNCM Accession No I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474, and VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, or ECACC V93070108 or indeed may be a U.S. strain such as North American PRRS virus, pT7P129A; ATCC deposit VR-2332, ATCC deposit VR-2368; ATCC

VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474, and ATCC VR 2402.

[0051] Recombinant techniques for preparing modified sequences are well known to those of skill in the art and usually employ construction of a full-length complementary DNA copies (infectious clones) of the viral genome which may then be modified by DNA recombination and manipulation methods (like site-directed mutagenesis etc.). This way, for example antigenic sites or enzymatic properties of viral proteins may be modified. Infectious clones of PRRS virus strains of European and North American genotype have been reported in the literature.

[0052] The PRRS virus strains of the present invention are suitable for vaccines of the invention can be grown and harvested by methods known in the art, e.g. by propagating in suitable host cells like the simian cell line MA-104, Vero cells, or porcine alveolar macrophages. PRRSV preferentially grows in alveolar lung macrophages (Wensvoort et al., 1991). A few cell lines, such as CL2621 and other cell lines cloned from the monkey kidney cell line MA-104 (Benfield et al., 1992; Collins et al., 1992; Kim et al., 1993) are also susceptible to the virus.

[0053] Vaccines comprising any one of PRRSV strain PRRS virus under ECACC Accession No. 11012501, 11012501 Accession Numbers ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, CNCM Accession No. I-1140, CNCM Accession No I-1387, and CNCM Accession No I-1388 as well as any combination of these strains or their descendants are thus preferred embodiments of the present invention. In specific embodiments, the PRRS virus 94881 is grown in a process wherein there is a concurrent seeding of the virus and the host cells together on the same day into a bioreactor as shown in Figure 9. Additional features of a method of production of PRRS virus 94881 may be as described in concurrently filed herewith as U.S. Provisional entitled “A Commercial scale process for production of PRRSV” filed concurrently with the instant application under application number 61/444,071. While this is one method of growing the

PRRSV 94881, it should be understood that the virus may be propagated according to any conventional method known to those of skill in the art.

[0054] Preferably, vaccines according to the present invention are modified live vaccines comprising one or more of these strains alive in a suitable carrier, but inactivated virus may also be used to prepare killed vaccine (KV). MLV are typically formulated to allow administration of 10^1 to 10^7 viral particles per dose, preferably 10^3 to 10^5 particles per dose, more preferably 10^4 to 10^5 particles per dose (4.0-5.0 $\log_{10}$ $TCID_{50}$). KV may be formulated based on a pre-inactivation titre of 10^3 to 10^{10} viral particles per dose. The vaccine may comprise a pharmaceutically acceptable carrier, for example a physiological salt-solution.

[0055] Pigs can be infected by PRRSV via the oronasal route. Virus in the lungs is taken up by lung alveolar macrophages and in these cells replication of PRRSV is completed within 9 hours. PRRSV travels from the lungs to the lung lymph nodes within 12 hours and to peripheral lymph nodes, bone marrow and spleen within 3 days. At these sites, only a few cells stain positive for viral antigen. The virus is present in the blood during at least 21 days and often much longer. After 7 days, antibodies to PRRSV are found in the blood. The combined presence of virus and antibody in PRRS infected pigs shows that the virus infection can persist for a long time, albeit at a low level, despite the presence of antibody. During at least 7 weeks, the population of alveolar cells in the lungs is different from normal SPF lungs.

[0056] A vaccine according to the present invention may be presented in form of a freeze-dried preparation of the live virus, to be reconstituted with a solvent, to result in a solution for injection. The solvent may e.g. be water, physiological saline, or buffer, or an adjuvanting solvent. The solvent may contain adjuvants. The reconstituted vaccine may then be injected into the a pig, for example as an intramuscular or intradermal injection into the neck. For intramuscular injection, a volume of 2 ml may be applied, for an intradermal injection it is typically 0.2 ml. In a further aspect, the present invention therefore is a vaccine product, comprising in separate containers a freeze-dried composition of

the virus, and a solvent for reconstitution, and optionally further containing a leaflet or label comprising instructions of use.

[0057] A vaccine according to the present invention may not only comprise one or more of the aforementioned strains, but may include further components active against PRRS or other porcine viral or bacterial diseases, like porcine circovirus or classical swine fever virus. Therefore, the invention further relates to a vaccine as described, characterized in that it contains at least one further antigen active against a porcine disease which is not PRRS. For example, such further antigens may include Mycoplasma hyopneumoniae, PCV2, SIV, H. parasuis, E. rhusiopathiae, S. suis, A. suis, Leptospira sp. Parvovirus and the like. In addition, the vaccine may comprise certain pharmaceutically or veterinary acceptable adjuvants. The invention provides new vaccine compositions, in particular, PRRS virus vaccines comprising PRRSV 94881 that further comprise adjuvants that enhance the efficacy of the vaccine such that a better clinical response/outcome is seen with the administration of the combination of the adjuvant and the vaccine as compared to administration of the vaccine alone. For example, the vaccine compositions of the invention may comprise a PRRSV 94881 virus vaccine and an adjuvant selected from the group consisting of MCP-1, α–tocopherol (e.g., α–tocopherol acetate, an exemplary version of which is sold as Diluvac Forte®), Haemophilus sonmus fractions, carbopol and combinations thereof. In some embodiments, the virus vaccine comprising PRRS 94881 virus vaccine, which may be a recombinant subunit vaccine or alternatively may be a live attenuated virus vaccine. An exemplary live vaccine that exists is Ingelvac®PRRS MLV and the PRRS 94881 may be formulated in a manner similar to Ingelvac®PRRS MLV.

[0058] In addition to the above, the immunogenic compositions of the invention may contain other ingredients so long as the other ingredients do not interfere with the adjuvants or the underlying virus vaccine. Such other ingredients include, for example, binders, colorants, desiccants, antiseptics, wetting agents, stabilizers, excipients, adhesives, plasticizers, tackifiers, thickeners, patch

materials, ointment bases, keratin removers, basic substances, absorption promoters, fatty acids, fatty acid ester, higher alcohols, surfactants, water, and buffer agents. Preferred other ingredients include buffer agents, ointment bases, fatty acids, antiseptics, basic substances, or surfactants.

[0059] The content or amount of the adjuvants used in the invention may vary and can be determined by taking into consideration, for example, the properties of the PRRS virus vaccine being used, and the dosage form. The adjuvant may comprise, for example, 1 to 100% by weight. The PRRSV 94881-based compositions of the invention are produced by mixing together the adjuvant component and the virus vaccine component, either alone or with various other ingredients. The compositions may be such that the virus vaccine and the adjuvant are presented as one formulation or alternatively, the adjuvant and the vaccine are presented in distinct formulations that can be administered simultaneously or sequentially.

[0060] The adjuvant component of the immunogenic compositions of the invention thus may be administered separately from the virus vaccine in the administration to organisms. Alternatively, the adjuvant according to the present invention, together with the virus vaccine, can be administered as a single vaccine composition. The virus vaccine may be any virus vaccine. More specific embodiments contemplate the use of a PRRS virus vaccine comprising PRRSV 94881. In addition such a vaccine may be combined with other vaccines such as Ingelvac® PRRS MLV and/or Porcilis®. This is merely one exemplary PRRS virus combination vaccine and other such vaccine combinations can be readily prepared.

[0061] The immunogenic compositions described herein are particularly advantageous in the induction of the production of an antibody response to PRRS virus. Administration of the vaccines preferably will produce a lessening of the severity of one or more clinical symptoms, such as lung lesions, anorexia, skin discolorations, lethargy, respiratory signs, mummified piglets, coughing, diarrhea and combinations thereof, that are associated with PRRSV infection.

[0062] The compositions thus particularly enhance the clinical outcome in a diseased animal as compared to the outcome from administration of PRRS virus vaccine alone. In specific embodiments, the enhanced clinical outcome is a reduction of the percentage of lung lesions by at least 50% when compared to animals not receiving the immunogenic composition in combination with said adjuvant. In other embodiments, the enhance clinical outcome is a reduction of viremia in animals by at least 45% when compared to animals not receiving the immunogenic composition in combination with said adjuvant.

[0063] Thus, in one aspect, the invention relates to an improved vaccine, more particularly and improved PRRS virus vaccine, wherein the improvement comprises admixing with the virus vaccine an adjuvant selected from the group consisting of MCP-1, Haemophilus sonmus fractions, carbapol and combinations thereof. The vaccine composition of the invention may further comprise a pharmaceutically acceptable carrier.

[0064] The vaccine compositions of the invention may be formulated by any method known in the art of formulation, for example, into liquid preparations, suspensions, ointments, powders, lotions, W/O emulsions, O/W emulsions, emulsions, creams, cataplasms, patches, and gels and is preferably used as medicaments. Thus, according to another aspect of the present invention, there is provided a pharmaceutical composition comprising the above vaccine composition. The vaccine composition according to the present invention, when dermally administered, can significantly induce antibody production. Accordingly, in another preferred embodiment of the present invention, the vaccine composition can be provided as a transdermal preparation.

[0065] Further, as described above, the virus and adjuvant in the present invention may be administered, to an organism, together as a single vaccine composition, or as an adjuvant preparation separate and distinct from the antigenic PRRS virus component of the vaccine, whereby the adjuvant acts in a manner such that amount of an antibody produced in the organism in response to

the PRRS virus vaccine can be significantly increased as compared to administration of the PRRS virus vaccine alone.

[0066] When the adjuvant and the PRRS virus vaccine are administered to an organism, the clinical outcome of the animal is enhanced. The effective amount of the adjuvant and the immunologically effective amount of the PRRS virus vaccine may be readily determined by a person having ordinary skill in the art by taking into consideration, for example, the type and properties of the antigenic substance, the species of organisms, age, body weight, severity of diseases, the type of diseases, the time of administration, and administration method and further using the amount of an antibody produced against the antigenic substance in the organism as an index.

[0067] The PRRS virus vaccine, the adjuvant, or combinations thereof can be administered to organisms by any suitable method selected depending, for example, upon the condition of animals and properties of diseases. Examples of such methods include intraperitoneal administration, dermal administration for example, subcutaneous injection, intramuscular injection, intradermal injection, and patching, nasal administration, oral administration, mucosal administration (for example, rectal administration, vaginal administration, and corneal administration). Among them, intramuscular administration is preferred.

[0068] An exemplary therapeutic dose of PRRSV MLV is about two milliliters (2 mLs). Skilled artisans will recognize that the dosage amount may be varied based on the breed, size, and other physical factors of the individual subject, as well as, the specific formulation of PRRSV MLV and the route of administration. Preferably, the PRRSV MLV is administered in a single dose; however, additional doses may be useful. Again, the skilled artisan will recognize through the present invention that the dosage and number of doses is influenced by the age and physical condition of the subject pig, as well as, other considerations common to the industry and the specific conditions under which the PRRSV MLV is administered.

[0069] In certain other embodiments, the vaccine may be a multivalent vaccine that comprises two or more PRRS viruses where at least one of the PRRS viruses is the attenuated 94881 virus deposited under ECACC Accession No. 11012502. The other PRRS viruses may be one or more selected from the group consisting of PRRSV strain Lelystad virus (Lelystad Agent (CDI-NL-2.91), or other strains such as those deposited under the Accession Numbers ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, CNCM Accession No. I-1140, CNCM Accession No I-1387, CNCM Accession No I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474, and VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, or ECACC V93070108 or indeed may be a U.S. strain such as North American PRRS virus, pT7P129A; ATCC deposit VR-2332, ATCC deposit VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474, and ATCC VR 2402.

[0070] The vaccines based on PRRS viruses may be used to vaccinate both piglets and sows. In one aspect of the invention, a particular dose regimen is selected based on the age of the pig and antigen selected for administration. This will permit pigs of any age to receive the most efficacious dose. In a preferred method, a therapeutic amount of PRRSV 94881 MLV is administered to a pig or piglet that is about two weeks old $\pm$ 5 days of age. The amount selected will vary depending upon the age of the pig. Alternatively, a different therapeutic amount of such an MLV is administered to a pig or piglet that is older than about 3 weeks, and this amount will also change as the pig receiving such an administration ages or becomes older. Accordingly, pigs about four weeks old, six weeks old, eight weeks old, ten weeks old, twelve weeks old, fourteen weeks old, sixteen weeks old, a gilt, or a sow will all receive different amounts. Therapeutic dose to be used will be optimized in the field and is typically, determined in clinical studies in which a minimal immunizing dose is defined based on protection against a virulent heterologous PRRSV challenge in susceptible swine. Preferably, the PRRSV MLV produced according to the methods described herein is administered intramuscular administration; however, other methods of administration such as

intradermal, intranasal, intraretinal, oral, subcutaneous, and the like, that are well-known and used in the art may be used.

[0071] The skilled person will recognize that the vaccination methods may involve determining the proper timing and dosage for vaccination of a pig against PRRSV. Such methods generally comprises the steps of determining at least one variable selected from the group consisting of age, health status, innate immunity level and active immunity level, of the pig, and adjusting a standard dosage level to account for these variables. Generally, the innate immunity level and active immunity level will be determined by referring to a standard comprised of average levels from a population of pigs of similar age and health status. In a particularly preferred method, all variable are considered prior to determining the optimum dosage level and timing of administration.

[0072] In preferred embodiments, the present invention also relates to isolated nucleic acids that code specific open reading frames of attenuated 94881 virus deposited under ECACC Accession No. 11012502 and the parent virulent 94881 virus deposited under ECACC Accession No. 11012501. For example, the complete nucleotide sequence of the attenuated 94881 virus deposited under ECACC Accession No. 11012502 has a sequence of SEQ ID NO:1 which encodes ORF1a, ORF1b, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 protein sequences of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, and SEQ ID NO:9, respectively. The complete nucleotide sequence of the parent virulent 94881 virus deposited under ECACC Accession No. 11012501 has a sequence of SEQ ID NO:10 which encodes ORF1a, ORF1b, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 protein sequences of SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, and SEQ ID NO:18, respectively.

[0073] The PRRSV 94881 vaccine can be administered in any conventional fashion and in some preferred methods the administration is intramuscularly. It is preferred that the administered PRRSV vaccine provide its benefits of treating or reducing the severity of or incidence of PRRSV infection after a single dose, as

with Ingelvac®, however, if other antigens or combination or multivalent vaccines are selected, it should be understood that they can be administered in their conventional fashion, which may include one or more booster doses after the initial administration. Those of skill in the art will be able to determine appropriate dosing levels based on the PRRSV vaccine selected and the age range of the animal to which the antigen will be administered.

[0074] In specific examples presented herein below pigs and sows were challenged with a new European derived strain of PRRSV that was able to reproducibly produce respiratory disease in piglets. Historically, European-derived PRRSV strains have been unable to reproduce respiratory disease in piglet model and hence respiratory challenge models relied on infection with non-European strains. Because of high genetic diversity there is a demand in Europe for a new vaccine based on an European strain. In additional examples, the animals were challenged with a strain that produced reproductive failure in gilts/sows challenge models. It has been found that the the efficacy of the MLV vaccines based on attenuated 94881 virus deposited under ECACC Accession No 11012502 or any virus prepared from this strain or from the parental strain deposited at ECACC Accession No 11012501 can be shown using a variety of challenge models because this strain also is effective in other models of PRRS virus-induced respiratory or reproductive failure.

[0075] EXAMPLES

[0076] Example 1: Description of PRRSV Respiratory Challenge Model

[0077] As noted above, historically, EU-derived PRRSV strains are unable to reproduce respiratory disease in piglet model. Because of the high genetic diversity there is a demand in Europe for a new vaccine based on an European strain and a good, reproducible respiratory challenge model utilizing virulent an European-derived PRRSV strain is necessary for the conduction of the studies. In the following example, the inventors show that challenge of pigs with low passage European challenge strain (passage 4) reliably produced respiratory symptoms.

[0078] In this study, 3 groups with 12 animals, 3 weeks of age at allocation and appr. 10 weeks of age at challenge were used:

[0079] Group 1: Control group

[0080] Group 2: Challenge group (SD 35)

[0081] Group 3: Vaccinated with Porcilis®PRRSV (SD 0) and then challenged (SD 35).

[0082] The study was conducted over a 56 day period necropsy of 6 animals from each group was measured 10 days after challenge; necropsy of all remaining animals 21 days after challenge. Daily investigated parameters included: rectal temperature, respiratory and other clinical signs. Further parameters investigated included: body weight, mortality, viremia, seroconversion, pathological and histological examination of the lungs.

[0083] At study day -7 the groups of pigs were allocated to each group. At study day 0, Group 3 was vaccinated with Porcilis®PRRSV. At study day 35 group 2 and group 3 were challenged with a European challenge strain. At day 45 6 animals from each group were euthanized. The remaining animals were euthanized at day 56.

[0084] Figure 1A shows coughing measurements as a meanscore per animal and week. It was seen that there was an increase in coughing after challenge in both the challenge alone (Group 2) and the Porcilis group (Group 3). Figure 1B shows the total clinical score which was taken from dyspnoea, coughing, nasal and eye discharge and behaviour. These data showed that there was an overall increase in total clinical score after challenge in the challenge and Porcilis group. Rectal temperature of the animals was monitored before and after challenge and shows that there was an increase rectal temperature in the challenge and Porcilis group after Challenge (SD > 35 group 1-2 $p \leq 0.001$; group 1-3 $p \leq 0.001$) (Figure 2).

[0085] Measurement of average daily weight (Figure 3) showed that after challenge until first and until second necropsy the ADW was significantly less in

the challenge (SD35-44 p≤ 0.001 and SD35-56 p≤ 0.01) and in the Porcilis vaccinated group (SD35-44 p≤ 0.05 and SD35-56 p≤ 0.05).

[0086] Viremia was monitored using PCR (Figure 4) and ELISA assays (Figure 5). PCR showed that in Group 1: all animals from the control group remained negative. In Group 2: all animals were positive for PRRSV after challenge; in Group 3: all animalls were positive for PRRSV after vaccination. ELISA revealed: that in Group 1: all animals remained negative; in Group 2: all animals were positive for PRRSV AB after challenge in Group 3: all animals were positive for PRRSV AB after vaccination.

[0087] Macroscopic examination of the lungs was also performed (Figure 6) where lungs were evaluated for tan mottled areas and areas of consolidation: In comparison to the control group significant macroscopic changes could be observed in the challenge and Porcilis group (group 1-2 p≤0.001; group 1-3 p ≤ 0.05). In histopathological examination, the data also showed efficacy of vaccination (Figure 7A through 7C). Mean lung lesion score was significantly higher in the challenge and Porcilis group in comparison to the control group (group 1-2 p≤ 0.001; group 1-3 p ≤ 0.001). Microscopic lesions were stronger 10 days post infection.

[0088] In summary, coughing, total clinical scores and rectal temperatures increased after challenge in the challenge controls and Porcilis vaccinated groups. Body weight was significantly ($p<0.05$) less in the challenge controls and Porcilis group in comparison to the negative control group. All animals from the Porcilis group were positive for PRRS virus and antibodies after vaccination. All animals from the challenge controls were positive for PRRS virus and antibodies after challenge. Macroscopical and histological analysis of the lungs showed severe macroscopic and microscopic lung lesions in the challenge controls and Porcilis group in comparison to the negative control group.

[0089] This study thus confirmed that the European challenge strain used does induce significant ($p<0.05$) disease when compared to the negative control

group: fever, coughing, reduced weight and severe macroscopic and microscopic lung lesions.

[0090] In addition, the European challenge strain has successfully demonstrated consistent and reproducible PRRSV-specific respiratory disease in the pig challenge model and therefore, is suitable for use as a challenge virus in future efficacy studies. Porcilis PRRS shows a lack of efficiency against the European challenge strain within the parameters of this study.

[0091] Example 2: Evaluation of Minimum Immunizing Dose of attenuated PRRS virus 94881 in Susceptible 2 week old piglets following challenge with heterologous European PRRS isolate.

[0092] A vaccination-challenge study was performed to evaluate the minimum immunizing dose (MID) of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vaccine European-derived isolate 94881, Modified Live Virus (PRRS 94881 MLV) at three different titer levels, administered to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) susceptible piglets, that were approximately 14 days of age, to provide relevant reduction in lung lesions following challenge with a heterologous European isolate of PRRS. Fifteen piglets were included in each vaccinated group (Groups 1-3) as well as in the challenge control group (Group 4). Ten piglets were included in the negative control group (Group 5).

[0093] The vaccine groups and the challenge control groups were monitored for a number of parameters including: viremia post-challenge, clinical assessments post-vaccination, PRRS serology, viremia post-vaccination, clinical observations post-challenge, average daily weight gain (ADWG), rectal temperatures and PRRS virus detection in the lungs. A negative control group (Group 5), which was not challenged, was also included in the study for study validation purposes by demonstrating that biosecurity was not breached throughout the duration of the study.

[0094] The challenge control and negative control groups were PRRS negative up to the day of challenge (D28) and the negative control group remained PRRS negative for the remainder of the study (D38), thus validating the study.

[0095] Challenge was at 4 weeks post-vaccination. At this time, only 2 animals in low titer vaccine group, 1 animal in the medium titer vaccine group and 3 animals in the high titer vaccine group were PRRS qPCR positive in serum.

[0096] The challenge control group exhibited significant lung lesions typical of PRRS post-challenge. Post-challenge, the low, medium and high titer vaccine groups had median total lung lesion scores of 0.13%, 0.55%, and 0.40%, respectively; while the challenge control group had a median total lung lesion score of 33.40%. The median total lung lesion scores for the three vaccine titer groups were significantly lower than the challenge control group ($p<0.0001$). There were no statistical differences between vaccine titer groups ($p\geq0.1484$) for total lung lesion scores. The negative control group had a median total lung lesion score of 0.00%.

[0097] On study Days 31, 35 and 38 of the post-challenge period, the three vaccine titer groups had significantly less viremia than the challenge control group (**$p\leq0.0093$**). There were no statistical differences between vaccine titer groups for viremia post-challenge except on D35, when the high titer vaccine group exhibited significantly lower viremia than the medium titer vaccine group ($p=0.0442$). Negative control piglets were negative for viremia on D31, D35 and D38.

[0098] Clinically, severity ($p\leq0.0082$) and frequency ($p\leq0.0268$) of coughing was less severe in the three vaccine titer groups than the challenge control group during the post-challenge period; Day 29 - Day 38. Pyrexia was more prominent in the challenge control group than in the three vaccine titer groups post-challenge. ADWG was significantly higher for the three vaccine titer groups compared with the challenge control group (**$p\leq0.0027$**).

[0100] The MID of PRRS 94881 MLV as determined in this study is associated with the low titer vaccine level of $1 \times 10^{2.77}$ $TCID_{50}$/mL, based on a

relevant reduction in gross lung lesions for all three titer levels in comparison to the challenge controls after receiving a virulent heterologous European-derived PRRS challenge. When secondary parameters were examined, all three vaccine titer levels were associated with efficacy and no clear distinctions between titer groups were evident.

[0101] General Design of Study:

[0102] This was a blinded randomized design study conducted in 70 weaned, PRRS susceptible piglets, 14-16 days of age on Day 0 (D0). A description of treatment groups is shown below in Table 2.1:

Table 2.1 Treatment Groups

Group	No. of Animals on D0	Treatment on Day 0
1	15	IVP No. 1 (mean titer of 1 x $10^{2.77}$ of PRRS 94881 MLV)
2	15	IVP No. 2 (mean titer of 1 x $10^{4.42}$ of PRRS 94881 MLV)
3	15	IVP No. 3 (mean titer of 1 x $10^{5.84}$ of PRRS 94881 MLV)
4	15	CP (Placebo matched product without PRRS 94881 MLV)
5	10	CP (Placebo matched product without PRRS 94881 MLV)

[0103] Eighty-three piglets met the study inclusion criteria, of which the first 70 numerical numbers were randomly assigned to one of five groups on D-3 by a biostatistician. Piglets were assigned 15 per group to Groups 1-4 and ten piglets to Group 5. All 83 piglets were PRRS seronegative.

[0104] Piglets were observed from D-1 to D26 for clinical assessments post-vaccination and observations will be recorded on the Clinical Assessment Record form.

[0105] **Serology**: Venous whole blood was collected from piglets on D0, D7, D14, D21, D28. Sample collections were recorded. Blood samples were spun down and serum was harvested from each tube, split and transferred to appropriately labeled tubes. One set of serum samples were held at 2-8 ºC and the other set of serum samples were held at -70 ± 10 °C. The set of serum

samples collected on days 0, 7, 14, 21, 28 and 38 and held at 2-8 ºC were tested for PRRS antibodies. Results were reported as negative (ELISA S/P ratio of < 0.4) or positive (ELISA S/P ratio of ≥ 0.4).

[0106] **PRRS Viremia**: The set of serum samples collected on days 0, 7, 14, 21, 28, 31, 35, and 38 and held at -70 ± 10 °C were tested for PRRSv RNA by qPCR (Addendum 1, Attachment 7). Results were reported as n.d. (not detected), positive (EU PRRSv detected, but not quantifiable, GE/mL (genome equivalent) = < 3.3 log) or a reported value (log GE/mL). For statistical purposes, "not detected" was assigned a value of 0 log GE/mL and a "positive" value was assigned a value of 3.0 log GE/mL.

[0107] **Average Daily Weight Gain (ADWG):** Each pig was weighed on a calibrated scale and individual body weights were recorded. The average daily gain was determined from the D0 to D28 and from D28 to D38.

[0108] **Clinical Observations Post-Challenge**: Piglets were observed by the Study Investigator or designees for clinical signs of disease from D27 to D38 and were recorded on the Clinical Observation Record form. Observations included respiration, behavior and cough based on the clinical observation scoring system as shown below in Table 2.2

Table 2.2 Clinical Observation Scoring System

Respiration Score	Behavior Score	Cough Score
0 = normal respiration 1 = panting/rapid respiration 2 = dyspnea 3 = dead	0 = normal 1 = mild to moderate lethargy 2 = severely lethargic or recumbent 3 = dead	0 = no coughing 1 = soft or intermittent cough 2 = harsh or severe, repetitive cough 3 = dead

[0109] A daily total clinical observation score for each piglet was determined by the summation of its daily respiration, behavior and cough scores.

[0110] Rectal temperatures were collected from D27 to D38.

[0111] **Total Lung Lesion Score**: All piglets that died before D38 and remaining piglets that were euthanized on D38 were necropsied. Each set of

lungs was examined for any gross lung pathology and determination of the % pathology for each lung lobe. If pathology of other organs were noted, these were described and noted as well.

[0112] **Lung qPCR for PRRSV**: For each set of lungs, two samples from the Left and Right Apical lobes, the Left and Right Cardiac lobes, the Left and Right Diaphragmatic lobes and the Intermediate lobe, were retained. For one set of lung samples, all three samples from the left side were combined into one container; while all three samples from the right side and the Intermediate lung lobe sample were combined into another container. Each container was filled with a sufficient amount of 10% formalin solution. For the other set of lung samples, all three lung samples from the left side were combined into one Whirlpak®; while all three samples from the right side and the Intermediate lung lobe sample were combined into another Whirlpak®.

[0113] Frozen lung tissue samples were held at -70 ± 10 °C until further analysis. For each piglet, all left lung samples were homogenized and tested as a single combined sample; and all right lung tissues and the intermediate lung lobe sample were homogenized and tested as a single combined sample. Results were reported as n.d. (not detected), positive (EU PRRSv detected, but not quantifiable, GE/mL (genome equivalent) = < 3.3 log) or a test value (log GE/mL) for left and right lung samples. For analysis purposes for each piglet, the mean of left and right lung sample qPCR results were noted. For statistical purposes, "not detected" was assigned a value of 0 log GE/mL and a "positive" value was assigned a value of 3.0 log GE/mL.

[0114] RESULTS

[0115] **Total Lung Lesion Score Post-Challenge**: A summary of group minimum, maximum, median, 95% confidence interval, Q range and mean for total lung lesion scores showed that the low, medium and high titer vaccine groups had median total lung lesion scores of 0.13%, 0.55%, and 0.40%, respectively; while the challenge control group had a median total lung lesion score of 33.40%. The median total lung lesion scores for the three vaccine titer groups were significantly

lower than the challenge control group ($p<0.0001$). There were no statistical differences between vaccine titer groups ($p\geq0.1484$) for total lung lesion scores. The negative control group had a median total lung lesion score of 0.00%.

[0116] For one of the animals (high titer vaccine group), histologically mild suppurative interstitial pneumonia with copious fibrinopurulent pleuritis was noted. Airways and alveoli were relatively unremarkable except for scattered neutrophils. Lung tissue was IHC negative for *M. hyo*, PCV2, PRRSv and SIV antigens. Lung lesions were consistent with serositis generally associated with bacterial agents (Addendum 12; Accession 2009030254). Several pure bacterial cultures from lung tissue were isolated and identified as *Bordetella bronchiseptica* and a coagulase negative *Staphylococcus*. Although two types of bacteria were isolated from lung tissues, this piglet was not removed from Group 3 total lung lesion score analyses.

[0117] Two of 10 negative control piglets exhibited very minor lung lesions (No. 1767, 0.55%; No. 1789, 0.61%). These lesions were considered insignificant and not indicative of PRRS. Two of 10 negative control piglets exhibited very minor lung lesions (No. 1767, 0.55%; No. 1789, 0.61%). These lesions were considered insignificant and not indicative of PRRS.

[0118] **PRRS Viremia Post-Challenge**: Individual PRRS viremia post-challenge results (D31-D38) were tabulated and it was found that all piglets were viremic post-challenge in the three vaccine titer groups and the challenge control group. At all three time points post-challenge, the three vaccine titer groups had significantly less viremia than the challenge control group ($p\leq0.0093$). There were no differences between vaccine titer groups for viremia post-challenge except on D35, when the high titer vaccine group exhibited a lower mean viremia than the medium titer vaccine group ($p=0.0442$). Negative control piglets were negative for viremia on D31, D35 and D38. Area under curve (AUC) represents both the quantity and duration of viral load and is a good assessment tool for examining viremia. Significant differences were also detected between the three vaccine titer groups and the challenge control group with respect to AUC at both D28 to D38

($p \leq 0.0162$), and D31 to D38 ($p < 0.0001$). No differences were detected between vaccine titer groups with respect to AUC ($p \geq 0.3669$) at both time intervals.

[0119] The group frequency of viremic positive piglets was also summarized for D31 to D28 and is shown in Table 2.3. Since all vaccine and challenge control piglets were viremia positive post-challenge, the frequency viremia positive piglets was 100% for each group at each time point. Hence, no analyses were conducted on post-challenge frequency for viremia.

Table 2.3 Summary of Group Frequency of Viremic Positive Piglets – D31 to D38

Study Day	Group*	No. Positive	% Positive	95 % CI		Total No.
31	1	14	100	76.8	100.0	14
	2	15	100	78.2	100.0	15
	3	15	100	78.2	100.0	15
	4	14	100	76.8	100.0	14
	5	0	0	0.0	30.8	10
35	1	14	100	76.8	100.0	14
	2	15	100	78.2	100.0	15
	3	15	100	78.2	100.0	15
	4	14	100	76.8	100.0	14
	5	0	0	0.0	30.8	10
38	1	14	100	76.8	100.0	14
	2	15	100	78.2	100.0	15
	3	15	100	78.2	100.0	15
	4	14	100	76.8	100.0	14
	5	0	0	0.0	30.8	10

* Group 1 = Low titer PRRS 94881 MLV; Group 2 = Medium titer PRRS 94881 MLV; Group 3 = High titer PRRS MLV; Group 4 = Challenge control group; Group 5 = Negative control group

Lung qPCR Results: Individual lung virus isolation results post-challenge were summarized as was the frequency of qPCR positive lung sample test results (p-values) for differences between groups. Lung tissues from piglets in all three vaccine titer groups and the challenge control group were qPCR positive for PRRSv post-challenge. There were no significant differences detected between vaccine titer groups and the challenge control group ($p=1.0000$). Since all vaccine titer piglets were qPCR positive for PRRSv, no tests were conducted between vaccine titer groups.

[0120] Although no differences were detected between vaccine titer groups and the challenge control group for frequency of qPCR positive lung tissues, differences were evident for viral load in lung tissues. Indeed, the low, medium and high titer vaccine groups had median lung qPCR values of 6.88, 6.80 and 6.81 $\log_{10}$ GE/mL, respectively; while the challenge control group had a median lung qPCR value of 8.13 $\log_{10}$ GE/mL. The differences between the vaccine titer groups and the challenge control group were significant ($p \leq 0.0001$). Conversely, no differences were detected between vaccine titer groups for median lung qPCR values ($p \geq 0.7379$).

[0121] **Clinical Observation Scores Post-Challenge**: Abnormal respiration and behaviour were not severe post-challenge, as evidenced by median maximum clinical scores of 0 (a score of 0 represented normal respiration or normal behavior) for all five groups. In addition, no significant differences were detected between vaccine titer groups and the challenge control group for both abnormal respiration and behavior ($p \geq 0.0996$).

[0122] Coughing was noted in all three vaccine titer groups and the challenge control, but was more severe in the challenge control group. For the three vaccine titer groups, each group had a maximum cough score of 1, which represented soft or intermittent coughing and median maximum cough score of 0. Conversely, the challenge control group had a maximum cough score of 2, which represented harsh or severe, repetitive coughing, and a median maximum cough score of 1. The three vaccine titer groups had significantly less severe coughing than the challenge control group ($p \leq 0.0082$). Coughing was not noted in the negative control group.

[0123] All three vaccine titer groups had maximum total scores of 1 and median maximum scores of zero. Conversely, the challenge control group had a maximum total score of 4 and a median maximum score of 1. The three vaccine groups had significantly lower maximum total clinical scores than the challenge control group ($p \leq 0.0047$). Again, the negative control group had a maximum total clinical score of zero and a median maximum total clinical score of zero.

[0124] The frequency of abnormal respiration or behavior for at least one day from D29 to D38 was low for all groups. Indeed, no abnormal respiration was noted in low and medium vaccine titer groups from D29 to D38. The high titer vaccine group had one of 15 (7%) piglets and the challenge control group had 3 of 14 (21%) piglets with abnormal respiration. Abnormal behavior was not noted in any vaccine titer group; while 2 of 14 (14%) challenge control piglets exhibited abnormal behavior for at least one day post-challenge. No significant differences were detected between vaccine titer groups and the challenge control group for frequency of abnormal respiration or behavior for at least one day post-challenge ($p \geq 0.0996$). Abnormal respiration or behavior was not noted in the negative control group.

[0125] The frequency of coughing was much higher in the challenge control than in the three vaccine titer groups. In deed, the frequency of coughing for at least one day post-challenge was 14%, 13% and 27% for the low, medium and high titer vaccine groups, respectively. Conversely, the frequency of coughing for at least one day post-challenge for the challenge control group was 71%. The three vaccine titer groups had significantly less frequency of coughing than the challenge control group ($p \leq 0.0268$).

[0126] The frequency of any clinical sign post-challenge, as represented by a total clinical score > 0, was higher in the challenge control group than in the three vaccine titer groups. Similar to the frequency of cough, the frequency of any clinical sign for at least one day post challenge was 14%, 13%, and 33% for the low, medium, and high titer vaccine groups, respectively; while 79% of piglets in the challenge control group had a least one clinical sign post-challenge. The three vaccine groups had significantly lower frequency of any clinical sign post-challenge than the challenge control group ($p \leq 0.0253$). No clinical signs were noted in the negative control group during this same time period.

[0127] Mean scores for abnormal respiration or behavior from D29 to D38 were low for all groups. Indeed, the mean respiration scores for the low and medium vaccine titer groups were 0.00 (normal), the high titer vaccine had a mean

respiration score of 0.01 and the challenge control had a mean respiration score of 0.03. The mean score for behavior was 0.00 for all three vaccine titer groups; while the challenge control had a mean behavior score of 0.01. No significant differences were detected between vaccine titer groups and the challenge control group for mean respiration and behavior scores ($p \geq 0.0996$). Respiration and behavior mean scores for the negative control group were 0.00.

[0128] The challenge control group had a higher mean cough score than the three vaccine titer groups. In deed, the mean cough scores were 0.01, 0.01 and 0.04 for the low, medium and high titer vaccine groups, respectively. Conversely, the mean cough score for the challenge control group was 0.28. The three vaccine titer groups had significantly lower mean cough scores than the challenge control group ($p \leq 0.0077$).

[0129] The mean total score was higher in the challenge control group than in the three vaccine titer groups. Similar to the mean cough scores, the mean total scores post challenge were 0.01, 0.01, and 0.04 for the low, medium, and high titer vaccine groups, respectively; while the mean total score for the challenge control group was 0.32. The three vaccine groups had significantly lower mean total scores than the challenge control group ($p \leq 0.0025$).

[0130] **Rectal Temperatures Post-Challenge**: The maximum group mean rectal temperatures for low, medium, and high titer vaccine groups between D29 to D38 were 40.20 °C (D33), 40.33 °C (D35), and 40.20 °C (D37), respectively. The maximum group mean rectal temperature for the challenge control group and the negative control group between D29 and D38 were 40.51 °C (D33) and 39.95 °C (D33), respectively.

[0131] The low titer vaccine group had significantly lower rectal temperatures than the challenge control group on D29 (39.47 vs. 39.90 °C), D31 (39.85 vs. 40.20 °C), D35 (39.80 vs. 40.22 °C) and D38 (39.86 vs. 40.32 °C) ($p \leq 0.0317$); while the low titer vaccine had a significantly higher rectal temperature than the challenge control group on D30 (40.08 vs. 39.58 °C; $p=0.0003$). No

significant differences were detected between the low titer vaccine group and the challenge control group on D32-D34 and D36-D37 ($p \geq 0.0545$).

[0132] The medium titer vaccine group had significantly lower rectal temperatures than the challenge control group on D31 (39.62 vs. 40.20 °C), D33 (40.15 vs. 40.51 °C), and D38 (39.58 vs. 40.32 °C) ($p \leq 0.0227$). No significant differences were detected between the medium titer vaccine group and the challenge control group on D29-D30, D32, and D34-D37 ($p \geq 0.0580$).

[0133] The high titer vaccine group had a significantly lower rectal temperature than the challenge control group on D33 (40.12 vs. 40.51 °C), D35 (39.79 vs. 40.22 °C), and D38 (39.55 vs. 40.32 °C) ($p \leq 0.0147$); while the high titer vaccine group had a significantly higher rectal temperature than the challenge control group on D32 (40.31 vs. 39.90 °C; $p=0.0063$). No significant differences were detected between the high titer vaccine group the challenge control group on D29-D31, D34 and D36-37 ($p \geq 0.0708$).

[0134] There was less frequency of pyrexia in the three vaccine titer groups post-challenge compared with the challenge control group. The frequency of pyrexia was low overall and similar between vaccine titer groups.

[0135] **Average Daily Weight Gain (ADWG):** The least square mean ADWG from D0 to D28 for the low, medium and high titer vaccine groups were 0.4, 0.3, and 0.4 kg/day, respectively. The least square mean ADWG during this same time period for the challenge control group was 0.3 kg/day. The low titer vaccine group had a significantly higher least square mean ADWG than the challenge control group from D0 to D28 ($p=0.0292$); while no other significant differences were detected between vaccine titer groups and the challenge control group ($p \geq 0.1262$), or between vaccine titer groups ($p \geq 0.1293$), for least square mean ADWG. During this same time period, the negative control group had mean ADWG of 0.5 kg/day.

[0136] The least square mean ADWG from D28 to D38 for the low, medium and high titer vaccine groups were 0.5, 0.5 and 0.4 kg/day, respectively. The least

square mean ADWG during this same time period for the challenge control group was 0.3 kg/day. The three vaccine titer groups significantly out gained the challenge control group post-challenge ($p \leq 0.0027$). During this same time period, the negative control group had a mean ADWG of 0.6 kg/day.

[0137] **Clinical Assessments Post-Vaccination**: In the low titer vaccine group, one piglet (1735) was noted as thin from D0 to D10. In addition, one piglet beginning on D6 was noted as thin for 16 days, exhibited cough for 2 days and depression for 9 days, and was euthanized on D21 for animal welfare reasons due to poor health. Piglet 1727 had a total lung lesion score of 10.8%. Since this value was determined pre-challenge, it was not included in post-challenge total lung lesion analysis. In addition, areas of red/purple consolidation in the cranioventral areas of the lungs were noted, the liver was pale and kidneys had multiple red/purple areas in the renal pelvis. The pathologist noted fatty infiltration in central lobules in the liver, commonly seen in cases of negative energy balance and consequent lipolysis. No other lesions were observed in sections of liver, kidney and lung. Lung tissue was positive for EU PRRS by PCR. No growth was detected for routine bacterial culture.

[0138] In the medium titer vaccine group, one piglet was excluded from the study on D0 prior to treatment due to poor health and was replaced by another piglet. Two Piglets exhibited coughing for one and three days, respectively, beginning on D12. Four piglets were noted as thin on D2, D3 or both D2 and D3.

[0139] In the high titer vaccine group, one piglet (1728) exhibited lameness or lameness and swelling in one leg from D7 to D26. Beginning 18 days post-vaccination, one piglet was noted as thin for 6 days, and exhibited coughing for one day and rough hair coat for 4 days. Another Piglet was noted as thin on D2. Two Piglets exhibited coughing for two days and one day, respectively, beginning on D9. One piglet exhibited diarrhea for one day (D14).

[0140] In the challenge control group, six piglets exhibited periodic coughing for a cumulative of one to six days, beginning with a first piglet on D7 and ending with three piglets on D21. Two piglets were noted as thin for two and 11 days,

respectively, beginning on D1 for one of these piglets. The second of these two Piglets also exhibited depression and rough hair coat for 4 days, weak on legs for one day and was found dead on D15. At necropsy for this piglet there were no lung lesions (lung lesion score of 0%) noted, no feed in the stomach and no abdominal fat, and diagnosed starvation as the cause of death. Since this lung lesion score was determined pre-challenge, it was not included in post-challenge lung lesion analysis.

[0141] The group test results (p-values) were summarized for any abnormal clinical assessment for at least one day from D1 to D26. No significant differences were detected between vaccine titer groups and the challenge control group ($p \geq 0.0502$); nor between vaccine titer groups ($p \geq 0.3898$). No piglets in the negative control group exhibited an abnormal clinical assessment from D-1 to D26.

[0142] **PRRS Serology**: Individual piglet PRRS ELISA serology results were summarized. Piglets in the negative control group remained PRRS seronegative throughout the study. Seroconversion could be observed in the 3 vaccine titer groups by 14 days post-vaccination; while the challenge control group remained PRRS seronegative until post-challenge. Ten days post-challenge (D38) all piglets in the low and high titer vaccine groups and the challenge control group were PRRS seropositive; while 14 of 15 piglets in the medium titer vaccine groups were PRRS seropositive.

[0143] PRRS ELISA positive serology test results (p-values) were determined for differences between groups. The three vaccine titer groups had significantly higher frequencies of PRRS ELISA positive piglets than the challenge control group on D14, D21 and D28 ($p<0.0001$). No significant differences were detected between the three vaccine titer groups and challenge control on D38 ($p=1.0000$ or no test conducted) nor between the three vaccine titer groups at any time point ($p=1.0000$ or no test conducted).

[0144] **PRRS Viremia Post-Vaccination**: Individual PRRS viremia results post-vaccination were determined. For statistical purposes, a “not detected” result was assigned a value of 0 log GE/mL and a “positive” value was assigned a value

of 3.0 log GE/mL. All groups were PRRS viremia negative on D0. The group viremia (qPCR) – D7 to D28 post-vaccination titer (log GE/mL) data was assessed. Piglets in the three vaccine titer groups reached peak mean viremia on D7, after which titers levels for all three groups slowly declined prior to challenge (SD28). Conversely, the challenge control group and the negative control group remained negative for viremia during the pre-challenge phase of the study. From the group test results (p-values) for D7, D14, D21 and D28 qPCR results it was seen that all three vaccine titer groups had significantly higher median qPCR values than the challenge control group for D7-D28 ($p \leq 0.0159$). The medium vaccine titer group had a significantly higher qPCR median value than the low titer vaccine group ($p=0.0193$); otherwise, no differences were detected for qPCR median values between vaccine groups pre-challenge ($p \geq 0.0594$).

[0145] Four weeks post-vaccination, the frequency of viremia was low in the three vaccine titer groups.

[0146] The following conclusions can be made based upon these study results:

- The absence of any break of biosecurity during the study and the confirmation of piglet's susceptibility to PRRS confirmed the validation of the study and its suitability for interpretation
- Substantial PRRS clinical disease was evident in the challenge control group, thus validating this challenge model as an adequate laboratory tool to evaluate PRRS vaccine efficacy and more specifically, the MID of PRRS 94881 MLV
- All three dose levels of PRRS 94881 MLV were associated with significant reduction in lung lesions, as well as significant reduction in viremia post-challenge, viral load in lung tissues, coughing, total clinical observation scores, pyrexia and ADWG
- The MID of PRRS 94881 MLV as determined in this study is associated with the low titer vaccine level of $1 \times 10^{2.77}$ $TCID_{50}$/mL, based on a relevant

reduction in gross lung lesions for all three titer levels in comparison to the challenge controls after receiving a virulent heterologous European-derived PRRS challenge.

[0147] Further depiction of Results

[0148] Clinical observations were taken every day. Quantitative RT- PCR was performed using PRRSV European specific primers for samples form blood, oral, faecal, and nasal swab, as well as lung lavages.

[0149] From these studies data showed that the piglets showed normal health except for a few pigs that were lame. Post-mortem there were no abnormalities at necropsy except that 1-2 animal showed signs of mildly enlarged inguinal lymph notes. Importantly, it was seen that there were no lung lesions observed with the vaccinated group.

[0150] Figure 8 shows the percentage of viremic animals in the sentinel group as compared to the group vaccinated with a composition containing the attenuated PRRS virus strain deposited at ECACC Accession No. 11012502. This Figure shows the spread of the vaccine strain from vaccinated animals to sentinels. At the peak of PRRS viraemia (SD21) as detected by quantitative RT-PCR, the viral load was 78.47% lower in sentinel infected pigs (mean viral load of 3.347 GE/ml) than in vaccinated animals (mean viral load of 4.014 GE/ml). In the room where the PRRS naïve sows were commingled with their vaccinated offspring, only 3 sows out of 8 were tested positive for PRRSV in blood by RT-PCR thus confirming limited and ineffective PRRS MLV vaccine exposure to naïve adult animals. The vaccine virus 94881 MLV was primarily excreted in the faeces in this study. Indeed, in faeces, the virus could be detected from one day to 21 days post vaccination. At five days post vaccination, almost 30% of the vaccinated animals excreted virus in faeces. The PRRS virus was not detected in nasal secretions and in only a few animals via oral secretions (2 out of the 56 sampled animals at 5 days post vaccination).

[0151] Example 3: Exemplary Materials and Methods For Use in Testing Vaccine Efficacy using Porcilis® PRRS as an example.

[0152] A selected number, for example, fourteen healthy pregnant sows from a confirmed PRRSV negative herd (tested virologically and serologically) were used in this study. Sows faced first or second parturition and were confirmed to be pregnant at the time of vaccination/challenge infection on day 94 of gestation. The sows were divided into three treatment groups. The first group was treated with a commercial dose of Porcilis™ PRRS of 2 ml containing at least $10^{4.0}TCID_{50}$ via intramuscular administration at day 94 of gestation. The challenge control group (group 2) received a dose of $10^{4.72}$ $TCID_{50}$ in 2 ml cell culture medium of the pathogenic European field isolate (passage 4) intranasally. Group 3 was vaccinated with a dose of 2 ml containing $10^{7.6}TCID_{50}$ i.m. PRRS MLV containing attenuated PRRS strain deposited at ECACC Accession No. 11012502 on January 25 2011 seven days before insemination and was challenged with the European field isolate (passage 4) ($10^{4.72}$ $TCID_{50}$ in 2 ml cell culture medium i.n.) at day 94 of gestation.

[0153] Animals from group 1 were monitored until day 5 post-farrowing. Animals from group 2 and 3 were monitored until day 28 post farrowing.

[0154] Animal Phase: All sows were accustomed to the animal facilities 1 week before vaccination. Sows and piglets were observed for their general health status by the investigator on a daily basis. Every animal that died or was euthanised was subjected to post-mortem examination and subsequent laboratory analysis.

[0155] Pregnancy was confirmed with ultrasound examination. Serum from sows was obtained on study days 0, 7, 14 and at farrowing for PCR and ELISA investigations. Any material that was associated with abortion was subjected to laboratory investigations.

[0156] Routine gross pathology was performed on all deadborn piglets. Lung tissue samples from all lung lobes were collected from deadborn piglets and

from mummies. Samples for PCR testing were stored at -70° C. 2 ml of precolostral blood from each piglet was collected on the day of birth. Serum was prepared and aliquots were stored at -70°C. Serum was used to test for viremia to evaluate the transplacental infection. All piglets of group 1 that survived until day 5, were euthanized at 5 days of age.

[0157] Clinical and Reproductive Performance Parameters: The following criteria are exemplary criteria that may be investigated (priority order): number of live born piglets per litter, number of stillborn piglets per litter, number of mummified fetuses per litter and number of piglets surviving through day 5 or 28 of age, respectively. The number of piglets born viremic was determined using pre-colostral serum. The frequency of PCR positive blood and tissue samples from sows and/or piglets was investigated to evaluate the epidemiology and course of infection.

[0158] Field Samples: The field samples investigated in this study were taken from routine PRRSV diagnostics and consisted of blood, serum and various organ materials, mostly lungs and lymph nodes, from different European countries. The samples were stored at -20° C for a maximum of 3 days before RNA preparation and residual material was subsequently transferred to -70° C. for long term storage. RNA and RT-PCR products were stored at -20°C.

[0159] Cell Culturing: MA104 cells (clone CL2621) were grown in MEM (Dulbecco, Germany) supplemented with 10% FCS and antibiotics.

[0160] Porcine alveolar macrophages were harvested using a method described by Wensvoort et al. (Wensvoort, G. et al. Vet. Quat. 1991, 13:121-130) and modified as follows: each lung lobe was infused with 50-100 ml PBS and subsequently massaged for 3 to 5 min. Then the fluid was rescued from the lobe and passed through a gaze filter. This procedure was repeated until the lavage fluid was clear. The pooled lavage fluid was centrifuged at 500 g for 15 min at room temperature. The pellet was washed in PBS and aliquots of $1x10^7$ cells in 50% RPMI 1640 (Biochrom), 40% FCS and 10% DMSO were frozen at -196°C.

For further use the PAMs were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and antibiotics.

[0161] Preparation of Organ Material for Virus Isolation in Cell Culture: About 0.5 cm^3 of tissue material was transferred into a tube containing one steel homogenizer ballet in 1.8 ml of sterile PBS. The tubes were agitated for 10 min until the organ material was homogenized. Cell debris was pelleted by centifugation for 2 min at 450 g and room temperature. The supernatant was passed through a 0.45 .mu.m pore sterile filter and stored at -70°C. Aliquots of 30 μl were used to inoculate one semiconfluent cell culture monolayer using 24 well microtitre plates.

[0162] RNA Isolation: RNA from organ material was extracted with the RNeasy Mini Kit and from serum, plasma, cell culture supernatant and vaccine solution with the QTAamp Viral RNA Mini Kit (both Qiagen) according to the manufacturer's recommendations, using approximately 100 mg organ material and 140 μl fluid material, respectively, for each preparation. The RNA was finally eluted in 65 μl buffer as recommended by the manufacturer.

[0163] Plaque Purification of Virus: Confluent monolayers of Ma104 cells in cell culture dishes of 10 cm seeded 48 hours before were infected with the respective virus at tenfold dilutions from 10^{-1} to 10^{-4}. The cells were incubated for 1 hour with the virus dilutions which were then removed, and the cells were overlaid with 30 ml of Ma104 medium containing 5% methylcellulose (Sigma). Plaques were picked after five to seven days and were transferred to Ma104 monolayers in 24 well plates. Virus from these plates was harvested at about 50% CPE and was subjected to further analysis.

[0164] Immunofluorescence Assay: Cells were fixed at -20° C. for 15 min using ice-cold aceton:methanol (1:1) and air-dried thereafter. After rehydration in PBS, cells were incubated with the PRRSV specific monoclonal antibody SDOW17 (Rural Technologies Inc., USA) diluted 1:1000 in PBS for 1 hour. After 3 washes with PBS, cells were incubated with goat anti-mouse FITC conjugated secondary antibody (Dianova, Hamburg, Germany) (1:150 in PBS) for another

hour. After 3 final washes with PBS, cells were overlaid with glycerine:PBS solution (1:1) and subjected to immunofluorescence microscopy.

[0165] Diagnostic nRT-PCR: A diagnostic RT-nPCR can be carried out to check the samples for the presence of PRRSV-EU virus.

[0166] An exemplary diagnostic RT-nPCR can be carried out with the Titan One Tube Kit (Roche Molecular Biochemicals) as follows: [5 µl total RNA preparation, 1*RT-PCR buffer, 0.4 mM dNTPs, 20 pmol of primers PLS and PLR, 5 mM dithiothreitol, 1 mM $MgCl_2$, 2.5-5 U RNasin (Promega Ltd), 1-2.5 U enzyme mixture, adjusted to a final volume of 25 µl with DEPC treated aqua dest]. Routine cycling conditions used can be: 45° C. for 1 hour, 94°C. for 2 min and 30 cycles of 94° C. for 30 sec, 58° C. for 45 sec and 68° C. for 45 sec, final elongation step at 68° C. for 5 min. The nested PCR reaction was carried out with Qiagen Taq (Qiagen AG) as follows: [1 µl RT-PCR product, 1*PCR buffer, 10 µl Q-solution, 3.5 mM $MgCl_2$, 0.3 mM dNTPs, 20 pmol of each EU-7-n-s and EU-7-n-as primers, 2.5 U Taq polymerase, adjusted to a final volume of 50 µl with aqua dest]. Cycling conditions were as follows: 7 cycles with 94° C. for 1 min, 58° C. for 1 min and 72° C. for 1 min, followed by 30 cycles with 94° C. for 1 min and 70° C. for 1.5 min (no annealing step), final elongation step at 70° C. for 5 min.

[0167] Nucleotide Sequencing: Nucleotide sequencing can be performed on the nested PCR products which had been generated with primers that contained an M13 tag, either directly from the PCR reaction or from PCR products that had been excised from agarose gels and purified with the JETsorb gel extraction kit (Genomed). Sequencing was done using the automated sequencer LI-COR DNA Analyzer GENE READIR 4200® (LI-COR Inc., Lincoln, Nebr., USA). Nucleotide and deduced amino acid sequences can be analyzed with AlignIR®, vs1.1 (LI-COR Inc., Lincoln, Nebr., USA) and the DNASIS.RTM. 2.6 software package (Hitachi Software Genetic Systems Inc., San Francisco, USA).

[0168] Example 4: Determination of the full length genome sequence PRRSV 94881

[0169] The present example shows the determination of the full length genome nucleotide sequences of the attenuated 94881 strain and its parental strain 94881, passage 5. These sequences did not show any unclear nucleotide position what indicates the presence of a homogeneous viral content. The comparison of the 94881 Master Seed Virus with the European Reference Virus strain Lelystad Virus (LV) revealed nucleotide homologies ranging from 85.40 to 95.09 percent in the 8 different viral genes and amino acid identities from 86.39 to 97.27 percent between both virus strains. Two deletions in the ORF 1a of 94881 MSV could be identified compared to LV. The comparison between 94881 Master Seed Virus and its parental strain, passage 5, showed 26 nucleotide exchanges between both resulting in a total number of 14 amino acid exchanges.

[0170] For the full length genome sequence determination of the 94881 Master Seed Virus a total number of 1 reverse transcription, 17 external PCRs and 58 internal PCRs was performed, resulting in 40 PCR products which were used for sequencing. In case of 94881, passage 5, 1 reverse transcription, 17 external PCRs and 67 internal PCRs were performed, resulting in 40 PCR products, also, used for sequencing.

[0171] Overlapping sequence alignment analyses resulted in a full length sequence of 14843 nucleotides for both virus isolates comprising the complete open reading frames (ORFs) 1a to 7, each. Additionally, 177 nucleotides of the 5´-non translated region (5´NTR) and 43 nucleotides of the 3´-non translated region (3´NTR) could be determined, each. Compared with the European PRRSV reference virus isolate Lelystad (LV) (GenBank Assession no. M96262) 44 nucleotides of the 5´NTR and 83 nucleotides of the 3´NTR could not be determined as those regions were used for primer annealing regions.

[0172] The sequencing reactions resulted for both virus strains in a clear nucleotide sequence without any wobbles or any other indication on a mixed sequence. After translation into amino acids clear amino acid sequences without any questionable amino acid were available for sequence comparison of 94881 MSV with the LV and with the parental strain 94881 passage 5. The alignments

and comparisons of the nucleotide sequences between 94881 MSV and Lelystad virus were performed and showed that there were substantial differences at the nucleotide and amino acid level. Alignments also were performed between 94881 MSV and its parental strain, passage 5.

[0173] Sequence comparisons with LV resulted in nucleotide homologies from 85.40 to 95.09 percent in the 8 different viral genes and amino acid identities from 86.39 to 97.27 percent between both virus strains. Two deletions in the ORF 1a of 94881 MSV can be identified compared to LV. One deletion of 138 nucleotides is located at position 2154 to 2292 of LV and results in 46 missing amino acids. At position 2686 to 2688 a further triplet is deleted resulting in the missing amino acid Phenylalanine. An arrangement of all nucleotide homologies and amino acid identities between LV and both 94881 strains is shown in Table 4.1.

Table 4.1: Arrangement of nucleotide and amino acid sequence comparisons of the 94881 Master Seed Virus to the European Reference Virus Lelystad Virus

ORF	length of the viral gene/protein nn/aa	no. of nucleotide deviations to Lelystad Virus	genetic homology to Lelystad Virus in percent	no. of amino acid deviations to Lelystad Virus	amino acid identity to Lelystad Virus in
5´NTR	177*/ ---	9	94.92	---	---
1a	7050** / 2349	1050	85.40	326	86,39
1b	4392 / 1463	346	92.12	40	97.27
2	750 / 249	67	91.07	23	90.76
3	798 / 265	72	90.98	28	89,43
4	552 / 183	52	90.58	23	87.43
5	606 / 201	58	90.43	23	88.56
6	522 / 173	26	95.02	5	97.11
7	387 / 128	19	95.09	9	92.97
3´NTR	44***/ ---	2	95.45	---	---

NTR : non translated region

* = Only 177 nucleotides were compared between Lelystad Virus and 94881 MSV. The remaining 44 nucleotides, located upstream, had not been determined.

** = The isolate 94881 MSV shows two deletions in the ORF 1a, one with 138 nucleotides and one with 3 nucleotides, respectively. The complete nucleotide and amino acid sequences of the Reference virus LV were used for the homology and identity calculations, deletions are assessed as deviations. The length of the corresponding viral gene of LV is 7191 nucleotides and the corresponding polyprotein 2396 amino acids, calculations of genetic homology and amino acid identity refer to the numbers of 7191 nucleotides and 2396 amino acids, respectively.

*** = Only 44 nucleotides were compared between Lelystad Virus and 94881 MSV. The remaining 83 nucleotides, located downstream, had not been determined

[0174] The sequence comparison of the full length nucleotide sequences of 94881 Master Seed Virus and 94881 Parental Strain, passage 5, revealed a total number of 26 nucleotide exchanges between both. The nucleotide exchanges were distributed as follows: 15 in the ORF 1a, 4 in the ORF 1b, 2 in the ORF 2, none in the ORF 3, 1 in the ORF 4, 3 in the ORF 5, 1 in the ORF 6 and none in the ORF 7. These nucleotide exchanges resulted in a total number of 14 amino acid exchanges which were distributed as follows: 8 in the polyprotein 1a, 1 in the polyprotein 1b, 1 in the glycoprotein 2, none in the glycoprotein 3, 1 in the glycoprotein 4, 2 in the glycoprotein 5 and 1 in the matrix protein. Both strains showed the same deletions compared to Lelystad Virus in ORF 1a. An arrangement of all nucleotide exchanges and resulting amino acid exchanges including the positions in the vial genes and corresponding proteins is shown in detail in Table 4.2.

[0175] Example 5 – Culture of Deposited Virus and MSV

[0176] As noted above, PARENT (low passage) 94881 is deposited at European Collection of Cell Cultures (ECACC) under the Accession Numbers ECACC 11012501, 94881 Master Seed Virus (MSV) is deposited at European Collection of Cell Cultures (ECACC) under the Accession Numbers ECACC 11012502. The growth and culture conditions for the parent virus and the MSV are provided in the present example.

[0177] **Parent 94881**: This is a virus of a genotype which is PRRSV type 1, as such it is a European genotype PRRSV. The virus has a porcine host. The

parent virus deposited at 11012501 was deposited at a titer of 5.81 Log10 $TCID_{50}$/mL. Host cells for virus propagation are MA 104 cells. These cells are cultured Minimal Essential Medium (MEM) with 3.7 g/L sodium bicarbonate containing 6% irradiated Fetal Bovine Serum at 37±1°C. The cells are plated in T-flasks (75 cm^2) with a plating density of 2 x 10^4 to 2 x 10^5 cells/cm^2 and cultivated for 3 to 7 days until 100% confluent prior to passage. For virus growth, the virus is added to the cells at a MOI of 0.001-0.01 in T-flasks. The cells infected are at a confluency of about 80-100%, typically 1-3 days post cell planting. The infected cells are cultivated at 37±1°C for 3-10 days post infection and the virus is then harvested. The harvest is performed when monolayer cells exhibit approximately 80-100% cytopathic effect (CPE) at 3-10 days post infection. The supernatant of infected MA104 tissue cultures (spent media + PRRSV from a culture with 80-100% CPE) is harvested and contains the virus that has been propagated. This supernatant may be stored at -70°C/-80°C for several months until use. The virus is assessed for $TCID_{50}$ with Spearman and Kaerber calculation to determine log10 $TCID_{50}$/mL of sample.

[0178] Vaccine (high passage) 94881 Master Seed Virus (MSV): This is a virus of a genotype which is PRRSV type 1, as such it is a European genotype PRRSV. The virus has a porcine host. The MSV deposited at 11012502 was deposited at a titer of 6.43 Log10 TCID50/mL. Host cells used for the propagation of the MSV are MA 104 cells. These cells are cultured Minimal Essential Medium (MEM) with 1.4g/L sodium bicarbonate and containing 10% irradiated Fetal Bovine Serum at 36±2°C. The cells are plated in T-flasks (75-150 cm2) or 850 cm2 roller bottles with a planting density of 1 x 104 to 1 x 105 cells / cm2 and cultivated for 3 to 7 days until 100% confluent prior to passage. For virus growth, the virus is added to the cells at a MOI of 0.001-0.01 in T-flasks or roller bottles. The cells infected are at a confluency of about 80-100%, typically 1-3 days post cell planting. The infected cells are cultivated at 36±2°C for 3-14 days post infection and the virus is then harvested. The harvest is performed when monolayer cells exhibit approximately 80-100% cytopathic effect (CPE) at 3-14 days post infection. The supernatant of infected MA104 tissue cultures (spent media + PRRS from a

culture with 80-100% CPE) is harvested and contains the virus that has been propagated. This supernatant may be stored at 2-8°C for 5-10 days, -70°C for several months until use. The MSV is assessed for TCID50 with Reed and Muench calculation to determine log10 TCID50/mL of sample.

5

Table 4.2: Arrangement of nucleotide and amino acid sequence comparisons of the 94881 Master Seed Virus to 94881 Parental strain

ORF	no. of deviating nucleotides	position in viral gene	exchange (nn) from parental strain to MSV	synonymous /non synonymous	no. of deviating amino acids	position in viral protein	exchange (aa) from parental strain to MSV
1a	15	309	C to T	synonymous	8	---	---
		753	G to T	non synonymous		251	E to D
		1474	G to A	non synonymous		492	V to I
		1789	G to A	non synonymous		597	V to I
		2094	C to T	synonymous		---	---
		2987	T to C	non synonymous		996	L to S
		3034	A to G	non synonymous		1012	T to A
		3065	A to G	non synonymous		1022	E to G
		3736	A to G	non synonymous		1246	T to A
		3966	C to T	synonymous		---	---
		4101	T to C	synonymous		---	---
		5803	C to T	non synonymous		1935	L to F
		6354	T to G	synonymous		---	---
		6519	C to T	synonymous		---	---
		6588	T to C	synonymous		---	---
1b	4	591	T to C	synonymous	1	---	---
		1833	C to T	synonymous		---	---
		1932	C to T	synonymous		---	---
		3682	G to A	non synonymous		1228	V to I
2	2	13	C to T	non synonymous	1	5	H to Y
		195	C to T	synonymous		---	---
3	0	---	---	---	0	---	---
4	1	529	T to C	non synonymous	1	177	F to L
5	3	109	A to G	non synonymous	2	37	N to D
		364	C to T	non synonymous		122	L to F
		570	C to T	synonymous		---	---
6	1	214	C to T	non synonymous	1	72	L to F
7	0	---	---	---	0	---	---

[0179] Example 6: PRRS 94881 $_{ML}$V Gilt MID Study

[0180] Summary

[0181] The objective of this vaccination-challenge study was to evaluate the minimum immunizing dose (MID) of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vaccine European-derived Isolate 94881, Modified Live Virus, Code 19T1.U_ (PRRS 94881 MLV) in gilts. Two different titer levels were administered to PRRS seronegative gilts approximately 28 days pre-breeding (Day 0; D0), gilts were challenged with a heterologous European isolate of PRRSv at approximately 90 days of gestation (D118) and gilts were evaluated for the total number of live born piglets or percentages of live born piglets and weaned piglets at 20 days of age to determine the MID. At the time of challenge on Day 118 (D118), the challenge control group consisted of 8 pregnant gilts (Group 1, Placebo), the low titer group consisted of 8 pregnant gilts (Group 2, 1 x $10^{2.43}$ $TCID_{50}$/dose), the high titer group consisted of 8 pregnant gilts (Group 3, 1 x $10^{3.90}$ $TCID_{50}$/dose), and the negative control group consisted of 5 pregnant gilts (Group 4, Placebo, not challenged).

[0182] Both the low titer and the high titer groups were associated with higher percentages of live piglets per litter at farrowing (**P≤0.0455**) and higher percentages and numbers of live piglets per litter at weaning (**P≤0.0203**) in comparison to the challenge control group.

[0183] With regard to supportive efficacy parameters, the high dose group was associated with a higher percentage and number of healthy piglets per gilt at farrowing (**P≤0.0211**), a lower percentage and number of weak and mummified feti (**P≤0.0090**), a lower percentage of qPCR positive gilts and lower viral load in gilts post-challenge on D125, DOF 0 and DOF+13 (**P≤0.0155**), a lower percentage of piglets per gilt qPCR positive and lower piglet viral load on DOF 0 (**P≤0.0030**), a lower percentage of piglets per gilt with clinical disease (**P<0.0001**), and higher

piglet body weights on DOF+20 and ADWG (**P<0.0013**), in comparison with the challenge control group.

[0184] The low dose group was associated with a higher percentage of healthy piglets per gilt at farrowing (**P=0.0138**), a lower percentage and number of mummified feti (**P≤0.0190**), a lower percentage of qPCR positive gilts and lower viral load in gilts post-challenge on D125, D132, DOF 0 and DOF+13 (**P≤0.0290**), a lower percentage of piglets per gilt qPCR positive on DOF 0 (**P=0.0381**), a lower percentage of piglets per gilt with clinical disease (**P<0.0001**), and higher piglet body weight on DOF+20 and ADWG (**P<0.0028**), in comparision to the challenge control group.

[0185] In conclusion, the study objective was met and data from this study establishes the MID of PRRS 94881 MLV in gilts as $1 \times 10^{2.43}$ $TCID_{50}$/2 mL. In addition, this study establishes duration of immunity (DOI) in gilts of approximately 4 months.

[0186] OBJECTIVE(S)/PURPOSE OF THE STUDY

[0187] The objective of this vaccination-challenge study was to evaluate the minimum immunizing dose (MID) of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vaccine European-derived Isolate 94881, Modified Live Virus, Code 19T1.U_ (PRRS 94881 MLV), at two different titer levels (Group 2, low titer; Group 3, high titer), administered to PRRS seronegative gilts pre-breeding to provide higher percentages of live born piglets and weaned piglets at 21 days of age, following challenge of gilts with a heterologous European isolate of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSv) at approximately 90 days of gestation. The primary criteria to satisfy this objective was that one or both vaccine groups must demonstrate relevantly higher percentage or number of live born piglets and weaned piglets at 20 days of age (DOF +20), compared with the challenge control group (Group 1).

[0188] Other parameters analyzed between the vaccine groups and the challenge control group included gilt clinical assessments post-vaccination, gilt

PRRS serology, gilt viremia, gilt clinical observations, piglet viremia, total piglets per litter, healthy live piglets per litter, weak live piglets per litter, mummies per litter, stillborns per litter, crushed/mortalities piglets per litter, piglet clinical observations, and piglet average daily weight gain (ADWG). These parameters were analyzed as supportive parameters and did not serve as primary parameters to satisfy the study objective.

[0189] SCHEDULE OF EVENTS

Table 6.1 Gilt Schedule of Events

Study Day(s)	Dates	Key Study Event
-2 or -1	20-Jul-2010 to 21-Jul-2010	Health examination
-1 to 21	21-Jul- 2010 to 12-Aug-2010	Groups 1-4: Daily Clinical Assessments
0	22-Jul-2010	Groups 1-4: Blood collection; Vaccinated Groups 1 and 4 with Control Product (CP); Vaccinated Group 2 with Investigational Veterinary Product (IVP) No. 1 (low titer vaccine group); and vaccinated Group 3 with IVP No. 2 (high titer vaccine group)
8 to 21	30-Jul-2010 to 12-Aug-2010	Groups 1-4: Treated gilts once daily with Matrix™ to synchronize estrus cycles
7, 14, 21, 56 and 84	29-Jul-2010, 05-Aug-2010, 12-Aug-2010, 16-Sep-2010, 14-Oct-2010	Groups 1-4: Blood collection
22 to 113	13-Aug-2010 to 12-Nov-2010	Groups 1-4: Clinical Assessments at least three times a week
26 to 32	17-Aug-2010 to 23-Aug-2010	Groups 1-4: Observed for heat detection and bred gilts by artificial insemination (AI)
84	14-Oct-2010	Groups 1-4: Pregnancy check by ultrasound
116 to 20 days after farrowing	15-Nov-2010 to 05-Jan-2011	Groups 1-4: Clinical Observations, recorded abortions, stillbirths, mummies, live piglets, weak born piglets
118 (approx. 90 days of gestation)	17-Nov-2010	Groups 1-4: Blood collection Groups 1-3: Challenged with PRRSv isolate 190136
125, 132, farrowing/ abortion (DOF*), DOF +7, DOF +13	24-Nov-2010, 01-Dec-2010, 03-Dec-2010 to 16-Dec-2010, 10-Dec-2010 to 23-Dec-2010, 16-Dec-2010 to 29-Dec-2010	Groups 1-4: Blood collection
DOF+20	23-Dec-2010 to 05-Jan-2011	Groups 1-4: Blood collection from remaining gilts; Euthanized remaining gilts; Disposal
DOF+20 or later	25-Dec-2010 to 05-Jan-2011	Groups 1-4: Euthanized remaining gilts; Disposal

*DOF = Day of Farrowing

Table 6.2 Piglet Schedule of Events

Study Day(s)	Dates	Key Study Event
DOF	03-Dec-2010 to 16-Dec-2010	All dead piglets: Weighed; Necropsied; Collected blood/body fluid if possible; Collect lung samples All live piglets: Weighed; Blood collection (pre-colostral or peri-natal (within 12 hours of birth))
DOF +1 to DOF +20	04-Dec-2010 to 05-Jan-2011	All live piglets: Clinical Observations Dead piglets: Weighed; Necropsied; Collected blood/body fluid if possible; Collected lung samples
DOF +7	10-Dec-2010 to 23-Dec-2010	All live piglets: Blood collection
DOF +13	16-Dec-2010 to 29-Dec-2010	All live piglets: Blood collection
DOF +20	23-Dec-2010 to 05-Jan-2011	All live piglets: Weighed; Blood collection;
DOF+20 or later	25-Dec-2010 to 05-Jan-2011	Group 1-3 piglets: Euthanized remaining piglets, Disposal; Group 4 piglets: Assigned to another BIVI project

[0190] STUDY DESIGN

Table 6.3 Study Design

Group	**Number of gilts on D0**	**Treatment on D0 (approximately 28 days prior to breeding)**	**Number of gilts on D118**	**Challenged on D118 with 6.0 mL (2 mL/nostril; 2 mL IM) of 1 x $10^{6.30}$ $TCID_{50}$ of PRRSv 190136**
1 (Challenge control group)	28	2.0 mL IM of Control Product (Placebo matched product without PRRS 94881 MLV)	16	Yes
2 (Low titer group	28	2.0 mL IM of IVP No. 1 (1 x $10^{2.43}$ $TCID_{50}$ of PRRS 94881 MLV)	16	Yes
3 (High titer group)	28	2.0 mL IM of IVP No. 2 (1 x $10^{3.90}$ $TCID_{50}$ of PRRS 94881 MLV)	16	Yes
4 (Negative control group)	10	2.0 mL IM of Control Product	5	No

[0191] BLINDING CRITERIA

[0192] The Study Investigator and designees were blinded with regard to gilts assigned to Groups 1-4. To maintain blinding of the Study Investigator and designees, a person not collecting data administered the IVPs and CP to assigned gilts on D0. Laboratory personnel were blinded to the treatment each gilt received while conducting their respective tasks.

[0193] MATERIALS

[0194] INVESTIGATIONAL VETERINARY PRODUCTs (IVP) AND CONTROL PRODUCT (CP)

Table 6.4 Investigational Veterinary Products (IVPs)

Generic Product Name:	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, Modified Live Virus
Isolate:	Isolate 94881
Formulation:	The Manufacturer's Batch Protocol (MBP) for PRRS 94881 MLV vaccine, Lot 390-005 (cake) is presented in Appendix 1. The MBP for Sterile Carbopol Adjuvanted Diluent, Lot 808-002 (diluent) is presented in Section 15.1, Appendix 1. D0 just prior to vaccination, BIVI-Ames reconstituted/diluted PRRS 94881 MLV vaccine, Lot 390-005 with Sterile Carbopol Adjuvanted Diluent, Lot 808-002 to formulate the two IVPs. IVP No. 1 was formulated to a targeted titer level of approximately 1 x $10^{3.0}$ $TCID_{50}$/2 mL and IVP No. 2 was formulated to a targeted titer level of approximately 1 x $10^{4.5}$ $TCID_{50}$/2 mL. An adequate volume of each IVP was formulated for vaccination and testing.
IVP Lot/Serial Nos.:	IVP No. 1: N270-142 IVP No. 2: N270-143
Manufacturer:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506
Expiration Date:	An expiration date of 22 Jul 2010 was assigned to each IVP for study purposes only.
Storage Requirements:	Rehydrated/diluted IVP was stored at 2-8 ºC or on ice
Testing:	PRRS 94881 MLV, Serial 390-005 and Sterile Carbopol Adjuvanted Diluent, Lot 808-002 were tested by BIVI-QC. At the start and end of the vaccination procedure, BIVI-Ames was contacted. BIVI-Ames tested pre- and post-vaccination aliquots of each IVP for virus titer in accordance with the PRRSv Titer Procedure (Section 15.1).
Test Results:	Test results for PRRS 94881 MLV, Serial 390-005 and for Sterile Carbopol Adjuvanted Diluent, Lot 808-002 were satisfactory IVP No. 1 had an average titer of 1 x $10^{2.43}$ $TCID_{50}$/2 mL and IVP No. 2 had an average titer of 1 x $10^{3.90}$ $TCID_{50}$/2 mL
IVP Transfer:	Two vials containing 35 mL of each IVP were transferred to the study site on D0 just prior to vaccination.
IVP Retention:	A retention sample of each IVP is currently stored at -70 ± 10 ºC at BIVI-Ames until the final report has been signed.

Table 6.6 Control Product (CP)

Generic Product Name:	Placebo
Formulation:	BIVI-Production produced lyophilized placebo product containing inert material comprised in the vaccine serial without PRRS 94881 MLV (Lot N240-191-062409, On D0, BIVI-Ames reconstituted Lot N240-191-062409 with Sterile Carbopol Adjuvanted Diluent, Lot 808-002 to formulate the CP, Lot No. 270-141.
Manufacturer:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506, USA
Lot Number:	N270-141
Expiry Date:	An expiration date of 22 Jul 2010 was assigned to the CP for study purposes only.
Storage Conditions:	Lyophilized vaccine: 2-8 °C Rehydrated CP: 2-8 °C or on ice
Testing:	CP was tested by BIVI-QC for EP sterility in accordance with Special Outline No. 96
Test Results:	CP was determined to be sterile
CP Transfer:	Two vials containing 50 mL each of CP were transferred to the study site on D0 just prior to vaccination.
CP Retention:	CP was formulated for this study only and was not retained.

[0195] CHALLENGE MATERIAL

Table 6.7 Challenge Material

Name/number of isolate	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus
Location and date of isolation incl. clinical symptoms	Isolate 190136, Passage 2. Isolate #190136 was obtained from lung tissue of a new born piglet from a farm showing typical reproductive signs of PRRS (abortions in gilts and weakness in new born piglets) during an outbreak in Lower Saxony, Germany, in April 2004. The attending veterinarians submitted the samples to bioScreen (sample arrived on 21 April, 2004). Isolate #190136 could directly be propagated on AK-MA104 cells.
Formulation:	Challenge virus was thawed and diluted with MEM (Minimum Essential Medium) to a targeted titer of approximately 1×10^6 $TCID_{50}$/3 mL on D118. An adequate volume of challenge material was prepared. Two aliquots were removed from challenge material.
Lot Number:	N289-034
Manufacture:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. - USA
Storage conditions	Bulk challenge material was stored at -70 ± 10°C. Once prepared, diluted challenge material was maintained on ice until it was administered.
Testing:	At the start and end of the challenge procedure, BIVI-Ames was contacted. BIVI-Ames laboratory personnel tested pre- and post-challenge aliquots for virus titer in accordance with the PRRSv Titer Procedure
Test Results:	The challenge material had a mean titer of $1 \times 10^{6.30}$ $TCID_{50}$/6 mL dose
Challenge material transfer:	Three vials containng 101mL each of challenge material were transferred to the study site on D118 just prior to administration.
Administration route	2.0 mL/nostril and 2.0 mL IM in the left neck (administered to all gilts in Groups 1, 2 and 3 on D118).
Challenge material retention:	Challenge material was formulated for this study only and was not retained.

[0196] ADDITIONAL TREATMENTS

[0197] Matrix™ (6.8 mL; Alternogest; Intervet/Schering Plough Animal Health) was administered in each gilt's feed from D8 to D21 to synchronize estrus cycles.

[0198] Oxytocin (VetTek) was administered at parturition to assist gilts with farrowing, but not for initiation of farrowing. At farrowing, all live piglets received 1.0 mL iron injection (Phoenix or Durvet), IM, in the right ham for prevention of iron deficiency anemia shortly after birth. Additionally, all live piglets received gentamicin (SparHawk Laboratories Inc) as a scour preventative shortly after birth. All treatments were recorded on the Biological & Pharmaceutical Treatment Record form.

[0199] TREATMENTS

[0200] DOSING JUSTIFICATION

[0201] Each IVP was administered as a 2.0 mL dose to assigned gilts to evaluate the MID of PRRS 94881 MLV. A 2.0 mL dose of the CP was administered to gilts assigned to groups 1 and 4.

[0202] DOSING REGIMEN

[0203] On D0, each IVP or CP was administered to each respective gilt IM in the right neck region using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe and a sterile 18g x 1 inch (2.54 cm) needle by a person not collecting study data. The dosing regimen is shown below in Table 6.8.

Table 6.8 Dosing Regimen

Group	Number	Treatment	Dose/Route	Study Day
1	28	CP	2.0 mL IM	D0
2	28	IVP No. 1 (low titer dose)	2.0 mL IM	D0
3	28	IVP No. 2 (high titer dose)	2.0 mL IM	D0
4	10	CP	2.0 mL IM	D0

[0204] METHODS AND PRECAUTIONS FOR STUDY PERSONNEL

[0205] Personnel administering IVPs, the CP and challenge material adhered to safety precautions and wore personal protective equipment as outlined for the specific study site.

[0206] ANIMAL INFORMATION

[0207] DETAILS OF STUDY ANIMALS

Table 6.9 Animal Information

Source:	Wilson Prairie View Farms N5627 Highway DD Burlington, WI 53105	
Number of gilts:	94	
Arrival date:	Gilts arrived at the Veterinary Resources, Inc. facilities in two shipments on 15 Jul 2010 (D-7) and 20 Jul 2011 (D-2).	
Identification:	Individually ear tagged with unique number	
Species:	Porcine	
Breed:	Commercial crossbred	
Gender:	Females	
Age range:	Approximately 8 months of age on D0	
Ownership of test animals:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.	
Physiological status:	All gilts were PRRS ELISA seronegative on D0. Gilts selected for assignment to the study were observed by the Study Investigator on D-2 or D-1 and determined to be in good health and nutritional status.	
Pregnancy results:	Gilts were checked for pregnancy on D84.	
Group –Gilt Assignments on D0	Group 1 (n=28): 1, 3, 5, 6, 8, 11, 15, 18, 19, 34, 35, 39, 40, 52, 54, 68, 79, 82, 88, 90, 95, 96, 98, 101, 102, 107, 109 and 110	Group 2 (n=28): 12, 26, 31, 32, 41, 47, 49, 56, 58, 59, 60, 64, 67, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 85, 89, 93, 94, 100, 103 and 104
	Group 3 (n=28): 2, 7, 14, 22, 23, 25, 27, 28, 30, 33, 36, 42, 46, 48, 51, 53, 57, 61, 62, 65, 66, 80, 84, 86, 91, 92, 105 and 106	Group 4 (n=10): 4, 10, 13, 16, 17, 20, 21, 24, 29, and 108
Group-Gilt Nos. Remaining in the Study On D118	Group 1 (n=16): 1, 6, 11, 18, 19, 40, 54, 68, 79, 82, 88, 95, 96, 98, 102, and 107	Group 2 (n=16): 12, 26, 31, 32, 41, 47, 49, 58, 64, 67, 72, 85, 89, 93, 100, and 104
	Group 3 (n=16): 7, 14, 23, 27, 33, 36, 46, 48, 57, 61, 62, 65, 66, 84, 92, and 106	Group 4 (n=5): 4, 13, 16, 17, and 108

[0208] INCLUSION/EXCLUSION CRITERIA

[0209] All gilts enrolled in this study were PRRS ELISA negative, non-bred and were healthy at the time of vaccination as determined by observation.

[0210] POST-INCLUSION REMOVAL OF GILTS

[0211] Five (5) – Group 1 gilts (Nos. 5, 15, 34, 35 and 52), two (2) - Group 2 gilts (Nos. 77 and 94), three (3) - Group 3 gilts (Nos. 2, 25, and 30) and one (1) - Group 4 gilt (No. 20) did not display estrus and were subsequently not bred. These gilts were removed from the study by D47.

[0212] Two (2) – Group 1 gilts (Nos. 109 and 110), nine (9) – Group 2 gilts (Nos. 56, 59, 60, 69, 73, 75, 76, 78, and 103), four (4) – Group 3 gilts (Nos. 22, 28, 51 and 53) and one (1) – Group 4 gilt (No. 21) were removed from the study by D89 due to lameness, not pregnant, or late breeding.

[0213] The study protocol stated that if > 16 pregnant gilts per group for Groups 1-3 were still in the study prior to challenge, extra gilts would be randomly selected for removal from the study; thus leaving 16 pregnant gilts per group for Groups 1-3. Five (5) – Group 1 gilts (Nos. 3, 8, 39, 90 and 101), one (1) - Group 2 gilt (No. 70) and five (5) - Group 3 gilts (Nos. 42, 80, 86, 91, and 105) were removed from the study by D104 based on randomizations by the statistician or selection by non-study person, reducing the group size to 16 gilts for Groups 1-3.

[0214] Due to space limitations, the Study Investigator requested that the size of Group 4 be reduced from eight (8) to five (5). The statistician randomly selected three (3) gilts (Nos. 10, 24 and 29) for removal from the study, which were removed on D109.

[0215] ANIMAL MANAGEMENT AND HOUSING

[0216] Animal Housing

[0217] Low IVP titer gilts were housed in Rooms 1 and 2, and high IVP titer gilts were housed in Rooms 3 and 4, in Building CB at VRI-Cambridge from D-1 to study completion. Gilts assigned to the challenge control and negative control groups were housed in a single room at VRI-Risdal from D-1 to D85. On D85, remaining gilts in the challenge control and negative control groups were moved to

VRI-Cambridge. Sixteen (16) – challenge control gilts were housed in Building CB, Rooms 5-8 and eight (8) - negative control gilts were housed in Building CA, Room 12, for the remainder of the study. From D85 onward, each room was identical in layout with two rows of 4 farrowing crates per row. Each crate held one gilt and her progeny. Each crate was approximately 5 feet x 7 feet in size, was elevated off of the floor, metal rod panels for sides and plastic-mesh for flooring. There was no nose-to-nose contact between adjacent crates. The floor of each crate was washed down at least once daily to remove excrement and waste. Each room had separate heat and ventilation, preventing cross-contamination of air between rooms. Each room was cleaned and disinfected prior to use for this study. Animal Services staff showered and donned clean clothes before entering each room.

[0218] Treatment group isolation was necessary in this study as it is well known within the scientific community that PRRSv readily spreads from pig to pig via various mechanisms including aerosolization. This includes avirulent live PRRS vaccines as these biological products include attenuated virus particles that mimic the characteristics of virulent wild-type PRRS without the capability to cause disease. Proper methods were in place to ensure that biosecurity was maintained and that vaccinated animals did not accidentally cross-contaminate non-vaccinated, PRRSv naïve negative control animals.

[0219] Each room in the facility has fans and heaters to aid in sufficient air circulation and heating. The ventilation system is separate yet identical for each room, so air is not shared between rooms. Solid feed was stored in bags, free from vermin. Water was *ad libitum* from a well located at the animal facility. Gilts were fed a commercially prepared, non-medicated gestation or lactation ration (Heart of Iowa Cooperative, Roland, IA) appropriate for their size, age, and condition.

[0220] Gilts were in good health and nutritional status before initiation of the study as determined by the Study Investigator. During the study, two gilts were observed with mild lameness and one gilt was observed with a swelling in the left

neck region. The Study Investigator considered all of these to be non-specific conditions that commonly occur in groups of gilts housed in confinement. The Study Investigator determined that concomitant treatments were not required for any animals during this study.

[0221] All gilts and their pigs assigned to Groups 1-3 were disposed of by commercial incineration after euthanasia. Gilts assigned to Group 4 were disposed of by rendering after euthanasia. Group 4 piglets were not euthanized and disposed of, but were assigned to another BIVI project. No food products from animals enrolled in this study entered the human food chain.

[0222] ASSESSMENT OF EFFICACY

[0223] To assess the MID of PRRS 94881 MLV, low titer group (Group 2) and the high titer group (Group 3) were challenged on D118 and reproductive performance and weaned piglets post-challenge were evaluated. The primary criteria to satisfy this objective were that one or both vaccine groups must demonstrate statistically higher percentage or number of live born piglets and weaned piglets at 20 days of age (DOF +20), compared with the challenge control group (Group 1).

[0224] Other parameters analyzed to support efficacy between vaccine groups and the challenge control group included gilt clinical assessments post-vaccination, gilt PRRS serology, gilt viremia, gilt clinical observations post-challenge, piglet viremia at farrowing, total number of piglets per litter, healthy live piglets per litter, weak live piglets per litter, mummies per litter, stillborns per litter, crushed/mortalities piglets per litter, piglet clinical observations, and piglet ADWG.

[0225] CRITERIA FOR A VALID TEST

[0226] The negative control group (Group 4) was not included in any analyses. The negative control group was included in the study to demonstrate that source gilts were PRRS negative at the time that the other three groups were challenged. Furthermore, the negative control group had to remain PRRS

negative until study completion to exclude a possible introduction of a field PRRSv or accidental cross contamination from challenged groups.

[0227] Pre-purchase and D0 serum samples were all required to be negative for PRRS antibodies. Serum samples collected from Groups 1 and 4 up to the day of challenge and from Group 4 until study completion had to be free of PRRS antibodies for the study to be valid.

[0228] PRIMARY OUTCOME PARAMETERS

[0229] The primary efficacy variables for statistical evaluation were live piglets per gilt at birth (mean number or percentage) and live piglets per litter at DOF +20 (mean number and percentage).

[0230] 9.2.1 Percentage of Live Piglets at Birth Per Gilt

[0231] Farrowing data was recorded for each gilt during the study. The day of farrowing (DOF) for each gilt was defined as the day that the first piglet was born. At the time of farrowing, each piglet was classified into one of five categories listed below in Table 6.10. A live piglet at birth was defined as any piglet that received an observation rating at birth as healthly live piglet, weak live piglet or crushed/mortality piglet (death due to crushing was confirmed at necropsy as described below). Observations were conducted by the Study Investigator or a designee and were recorded on the Farrowing/Litter Processing Record form.

Table 6.10 Farrowing Result Categories

Term	Definition
Mummy	A mummified fetus that is not completely developed and is exhibiting severe autolysis or a completely developed fetus exhibiting a shiny gun metal green appearance and with no or very little hair
Stillborn Piglet	A completely developed dead piglet with hair
Weak Live Piglet	A poor-doing piglet that cannot nurse or walk
Healthy Live Piglet	A healthy, nursing piglet that is able to walk
Crushed/Mortality	A fully developed piglet that appears to have died shortly after farrowing due to being crushed by the gilt

[0232] Live piglets per Litter at DOF +20

[0233] Piglets were observed for clinical signs of disease as outlined below in Table 6.11 from DOF+1 to DOF+20. Observations were conducted by the Study Investigator or designees and were recorded on the Clinical Observations Record form.

Table 6.11 Clinical Observation Scoring System

Respiration	Behavior	Cough
0 = normal respiration 1 = panting/rapid respiration 2 = dyspnea 3 = dead	0 = normal 1 = mild to moderate lethargy 2 = severely lethargic or recumbent 3 = dead	0 = none 1 = soft or intermittent cough 2 = harsh or severe, repetitive cough 3 = dead

[0234] A daily total clinical observation score was determined as a summation of respiration, behavior and cough scores by the statistician using SAS program. Any piglet receiving a clinical score of zero to eight on DOF+20 was evaluated as alive on DOF+20.

[0235] SUPPORTIVE PARAMETERs

[0236] Other parameters analyzed between vaccine groups and the challenge control group included gilt clinical assessments post-vaccination, gilt PRRS serology, gilt viremia, gilt clinical observations, piglet viremia, total piglets per litter, healthy live piglets per litter, weak live piglets per litter, mummies per litter, stillborns per litter, crushed/mortalities piglets per litter, piglet clinical observations, and piglet average daily weight gain (ADWG).

[0237] Gilt Daily Assessments

[0238] All gilts were observed once daily from D-1 to D21 and from D22 to 115 at least three times a week for daily assessments post-vaccination by the Study Investigator or designees. Observations were recorded on the Daily Assessment Record form.

[0239] Gilt PRRS Serology

[0240] Venous whole blood was collected from gilts prior to purchase and on D0, D7, D14, D21, D56, D84, D118, D125, D132, DOF 0, DOF+7, DOF+13 and DOF+20. Blood collections from gilts at the time of farrowing/abortions (DOF 0) were conducted immediately after farrowing/abortions were completed or up to 8 hours post-farrowing/abortion.

[0241] Briefly, approximately 10 mL of blood was collected from each gilt into an appropriate sized Serum Separator Tube(s) (SST). Sample collections were recorded on the Sample Collection Record form. Blood in SSTs was allowed to clot at room temperature. Blood samples collected on weekdays were delivered to BIVI-Ames on the day of collection. Blood samples collected on weekends were processed by VRI personnel on the day of collection. Serum samples at VRI were held at 2-8 ºC. At either BIVI-Ames or VRI, blood samples were spun down and serum was harvested, split and transferred to appropriate tubes. Each tube was labeled with the gilt's ID number, the study number, the date of collection, the study day and the sample type. Serum samples at VRI were delivered to BIVI-Ames at the earliest convenient time. A completed Specimen Delivery Record form was included with each shipment. At BIVI-Ames, one set of serum samples were held at 2-8 ºC and the other set of serum samples were held at -70 ± 10 °C.

[0242] The set of gilt serum samples held at 2-8 ºC were tested by BIVI-Ames for PRRS antibodies. Results were reported as negative (ELISA S/P ratio of < 0.4) or positive (ELISA S/P ratio of ≥ 0.4).

[0243] Gilt Clinical Observations Post-Challenge

[0244] Gilts were observed for clinical signs of disease from D116 to DOF+20. Observations were conducted by the Study Investigator or designees. Gilts were observed each day for respiration, behavior and cough based on the clinical observation scoring system outlined above in Table 6.11.

[0245] 9Piglet PRRS Viremia

[0246] Venous whole blood was collected from piglets on DOF 0, DOF+7, DOF+13 and DOF+20, or when a piglet was found dead. Pre-colostral blood collection was preferred from newborn piglets, but was not mandatory. If pre-colostral blood could not be collected, peri-natal blood within 12 hours of farrowing was permissible. Samples not collected before first suckling were labeled as "Peri-natal" and kept separately from pre-colostral samples.

[0247] Briefly, approximately 2.0 to 2.5 mL of blood was collected from each live piglet into an appropriate sized Serum Separator Tube(s) (SST). A minimum of 5.0 mL of blood was collected from each piglet on DOF +20 just prior to euthanasia. Blood was collected from each mummy or stillbirth or if blood could not be collected from a dead fetus, thoracic or abdominal fluid was collected. Sample collections were recorded on the Sample Collection Record form.

[0248] Piglet Average Daily Weight Gain

[0249] Individual piglets were weighed on DOF 0 and DOF+20, or on the day a piglet was found dead by the Study Investigator or designees. Individual body weights on DOF 0 were recorded on the Farrowing/Litter Processing Record form and body weights after DOF 0 were recorded on the Body Weight Record form.

[0250] PRRS Virus Quantitation in Lung Tissue

[0251] All piglets dead at delivery or dying before DOF+20 were necropsied by the Study Investigator. Necropsy results and a diagnosis were recorded on the Necropsy Report form. Two lung samples were collected from each necropsied piglet. One sample was placed into a separate Whirlpak® container and another sample was placed into an appropriate container filled with a sufficient volume of 10% formalin. Sample collections were recorded on the Necropsy Report form.

[0252] Whirlpaks® and formalin containers were appropriately labeled with animal number, study number, date of sampling, study day, sample type and whether the samples were from the left side, right side or both. Samples in Whirlpaks® were stored at -70 ± 10 °C and samples in 10% formalin were stored

at room temperature until delivered to BIVI-Ames. A completed Specimen Delivery Record form was included with each delivery of samples. At BIVI-Ames, samples in Whirlpaks® were stored at -70 ± 10 °C until shipped from BIVI-Ames to Germany, and formalin fixed samples were stored at BIVI-Ames at room temperature.

[0253] After the study was completed, frozen tissue samples in Whirlpaks® were shipped and tested as described above.

[0254] Formalin fixed tissue samples were submitted to ISU VDL within one week of collection for embedding in paraffin blocks). Tissues in paraffin blocks were returned to BIVI and are currently held by BIVI-Ames at room temperature for possible future testing. A decision of whether to retain these samples or discard them will be made by the Study Sponsor and Monitor after the study report is completed.

[0255] ADVERSE EVENTS

[0256] No adverse events attributed to the IVPs were reported during this study. For more information on adverse events, see Section 12.6, Gilt Assessments Post-Vaccination.

[0257] STATISTICAL METHODS

[0258] EXPERIMENTAL UNIT

[0259] Treatment groups had to be housed in separate rooms in this study to avoid transmission of live PRRSv vaccine to non-vaccinated groups. Therefore, room was the experimental unit. However, for the purposes of this analysis, possible bias due to confounding “room” and “treatment” effects were ignored, and gilt and her corresponding litter were analyzed as the experimental unit.

[0260] RANDOMIZATION

[0261] Ninety-four (94) PRRS seronegative gilts from a pool of 107 test-eligible gilts were randomly assigned to one of 4 groups prior to D0. Groups 1-3 each consisted of 28 gilts. Group 4 consisted of 10 gilts. For Group 1, Nos. 45

and 55 were excluded by the farm manager prior to shipment due to health reasons and were replaced by two extra gilts, Nos. 15 and 18, respectively. For Group 3, gilt No. 44 was excluded by the farm manager prior to shipment due to health reasons and was replaced by extra gilt No. 25.

[0262] Due to space limitations at the time of challenge, Groups 1-3 were restricted to 16 gilts per group and Group 5 was restricted to 5-8 gilts. On D85, 16 gilts per group were randomly selected to remain in the study for Groups 1-3. Since Group 4 consisted of 8 gilts on D85, this group was not further reduced by randomization. Afterwards, the Study Investigator requested that Group 4 be reduced from 8 gilts to 5 gilts. On D109, 5 gilts were randomly selected to remain in the study for Group 4.

[0263] All randomizations procedures were conducted by a biostatistician..

[0264] ANALYSIS

[0265] The statistical analyses and data summaries were conducted by Dr. rer. hort. Martin Vanselow, Biometrie & Statistik, Zum Siemenshop 21, 30539 Hannover, Germany, +49(0) 511 606 777 650, m.vanselow@t-online.de.

[0266] The main objective of the statistical analysis was the comparison of two PRRS 94881 MLV vaccine groups (Groups 2 and 3) to an unvaccinated challenged control group (Group 1). All data were imported into SAS for management and evaluation. The data were received from the study sponsor in the form of verified SAS data sets. Cases which had been withdrawn from the study were considered for the respective parameter of analysis until date of exclusion. All data were summarised descriptively (n, minimum, maximum, mean, median, standard deviation, interquartile range, or frequency distributions, confidence interval) based on the type of the variable. The statistical analyses were performed using SAS software release 8.2 (SAS, 2001, Cary, North Carolina, USA: SAS Institute Inc.).

[0267] Variables for the Statistical Evaluation of the Study:

[0268] Primary variables

[0269] Proportions of live piglets at farrowing/abortion (DOF+0)

[0270] Proportions of live piglets at 20 days of age (DOF+20)

[0271] Supportive variables

[0272] Gilt clinical assessments post-vaccination

[0273] Gilt PRRS serology

[0274] Gilt viremia

[0275] Gilt clinical observations

[0276] Piglet viraemia

[0277] Reproductive performance

[0278] Piglet clinical observations

[0279] Piglet average daily weight gain (ADWG)

[0280] Hypothesis to be Tested and Assumptions Made:

[0281] The unchallenged negative control group (Group 4) was excluded from statistical tests. The low titer and high titer groups (Groups 2 and 3, respectively) were compared to the challenge control group (Group 1). All tests between groups were designed as two-sided tests on differences. In the case of all tests, differences were considered as statistically significant only if $P \leq 0.05$. Efficacy was demonstrated if the percentage or number of live born piglets and the percentage or number of weaned piglets at DOF+20 were significantly higher for one or both vaccine groups compared with the challenged control group.

[0282] Details on Data Manipulations and Evaluation:

[0283] Clinical Assessments of Gilts Post-Vaccination

[0284] Frequency tables of animals with at least one positive finding between study days 1 and 21 and between study days 1 and 113 were generated. Differences between the challenge control and vaccine groups were tested by Fisher's exact test.

[0285] Clinical Observations of Gilts Post-Challenge

[0286] Frequency tables of animals with at least one positive finding between study day 116 and DOF+20 were generated. Differences between the challenge control group and vaccine groups were tested by Fisher's exact test.

[0287] Serology of Gilts

[0288] Frequency tables of "positive" ELISA results on study days 7, 14, 21, 56, 84, 118, 125, 132 (pre-farrowing) and DOF+0, DOF+7, DOF+13 and DOF+20 were generated. Differences between the challenge control and vaccine groups were tested by Fisher's exact test.

[0289] Viremia of Gilts

[0290] Viremia data were evaluated for each day of investigation separately (pre-farrowing study days 7, 14, 21, 56, 84, 118, 125, 132 and DOF+0, DOF+7, DOF+13 and DOF+20). For the qualitative evaluation of the qPCR data the analytical results 'not detected' ('n.d.') and 'negative' were classified as 'negative' and the analytical results 'positive' and a measured value were classified as 'positive'. For the quantitative evaluation 'not detected' ('n.d.') and 'negative' were replaced by a $\log_{10}$ GE/mL value of 0.0 and 'positive' was replaced by 3.0. The quantitative PCR data (PRRS viral load [$\log_{10}$ GE/mL]) were used for comparisons between challenge control (group 1) and treatment groups 2 and 3 using the Wilcoxon Mann-Whitney test. Frequency tables of 'positive' qPCR results were generated. Differences between the challenge control group and vaccine groups were tested by Fisher's exact test.

[0291] Reproductive Performance

[0292] Absolute frequencies per gilt of total number, alive, healthy, weak, stillborn, dead and alive piglets at DOF+20 were determined and used as single values for the comparisons between groups. Relative frequencies per gilt of alive, healthy, weak, stillborn and dead piglets were calculated in relation to the total number of piglets at farrowing and used as single values for the comparisons between groups. The percentage of live piglets per litter at DOF+20 was

calculated in relation to the number of live piglets at farrowing minus number of mortalities and crushed piglets. Differences between the challenge control group and vaccine groups were tested by the Wilcoxon Mann-Whitney test.

[0293] Viremia of Piglets

[0294] Viremia data were evaluated for each day of investigation separately (DOF+0, DOF+7, DOF+13 and DOF+20). For the qualitative evaluation of the qPCR data the analytical results 'not detected' ('n.d.') and 'negative' were classified as 'negative' and the analytical results 'positive' and a measured value were classified as 'positive'. The percentages of 'positive' piglets per litter were calculated and used as single values for the comparisons between groups by the Wilcoxon Mann-Whitney test. For the quantitative evaluation 'not detected' ('n.d.') and 'negative' were replaced by a $\log_{10}$ GE/mL value of 0.0 and 'positive' was replaced by 3.0. The median qPCR values per litter were calculated and used as single values for the comparisons between groups by the Wilcoxon Mann-Whitney test. For the summary statistics the individual qPCR data were used. The viral loads in lung samples were evaluated descriptively only.

[0295] Body Weight and Average Daily Weight Gain of Piglets

[0296] Individual average daily weight gains (ADWG) were calculated for the time periods between DOF+0 and DOF+20. Differences between treatment groups were tested by analysis of variance (ANOVA) and subsequent t-tests. Least squares means of the groups and differences between least squares means with 95 % confidence intervals were derived from the ANOVA. The analysis for DOF+20 and ADWG was repeated with weight at DOF+0 as a covariate. The weight data of piglets per gilt were summarised descriptively.

[0297] Clinical Observations of Piglets

[0298] The percentage of piglets per litter with at least one positive finding between study days DOF+1 and DOF+20 were calculated and used as single values for the comparisons between groups by the Wilcoxon Mann-Whitney test.Data were analyzed assuming a completely random design structure.

[0299] RESULTS

[0300] GILT REPRODUCTIVE PERFORMANCE

[0301] Mean percentages of live piglets per litter at farrowing (healthy + weak + crushed/mortality) were 54.4%, 75.1%, 72.3%, and 93.0% for the challenge control, low titer, high titer, and negative control groups, respectively. The low titer and high titer groups had significantly higher percentage of live piglets per litter at farrowing compared to the challenge control group (**P≤0.0455**). Mean number of live piglets per litter at farrowing were 6.5, 8.3, 8.6 and 10.8 for the challenge control, low titer, high titer, and negative control groups, respectively. No significant differences were detected between groups for the number of live piglets per litter at farrowing (P≥0.1039).

[0302] Mean percentages of healthy live piglets per litter were 41.4%, 65.8%, 67.9%, and 93.0% for the challenge control, low titer, high titer, and negative control groups, respectively. The low titer and high titer groups had significantly higher percentages of healthy live piglets per litter at farrowing compared to the challenge control group (**P≤0.0138**). Mean number of healthy live piglets per litter at farrowing were 4.9, 7.2, 8.1 and 10.8 for the challenge control, low titer, high titer, and negative control groups, respectively. The high titer group had a significantly higher number of healthy live piglets per litter at farrowing (**P=0.0211**), while no difference was detected for the low titer group in comparison with the challenge control group (P=0.0640).

[0303] Mean percentages of weak live piglets per litter at farrowing were 7.4%, 7.1%, 0.4%, and 0.0% for the challenge control, low titer, high titer, and negative control groups, respectively. Mean number of weak live piglets per litter at farrowing were 0.9, 0.8, 0.1 and 0.0 for the challenge control, low titer, high titer, and negative control groups, respectively. The high titer group had significantly lower percentage and number of weak live piglets per litter at farrowing compared to the challenge control group (**P≤0.0090**). Conversely, no differences were detected between the low titer group and the challenge control group for percentage or number of weak live piglets at farrowing (P≥0.8569).

[0304] Mean percentages of mummies per litter at farrowing were 28.1%, 14.1%, 8.7%, and 0.0% for the challenge control, low titer, high titer, and negative control groups, respectively. Mean number of mummies per litter at farrowing were 3.1, 1.6, 0.9, and 0.0 for the challenge control, low titer, high titer, and negative control groups, respectively. Both the low titer and high titer groups had significantly lower percentages and numbers of mummies per litter at farrowing compared with the challenge control group (**P≤0.0190**).

[0305] No significant differences were detected between the two vaccine titer groups and the challenge control group for percentage or number of stillborn or mortalities/crushed piglets per litter at farrowing (P≥0.1681).

[0306] A summary of group reproductive performance results (% piglets per litter and number of piglets per litter) on the DOF is shown below in Tables 6.12 and 6.13.

Table 6.12 Summary of Group Reproductive Performance Results **(% piglets per litter)** on the DOF

Piglets	Group *	N	Min.	Max.	Median	Mean	95 % CI		SD	P
Alive	1	16	0	92	57.3	54.4	41.1	67.7	24.91	
	2	16	33	100	81.9	75.1	64.5	85.7	19.88	**0.0184**
	3	16	17	100	75.6	72.3	59.5	85.1	24.01	**0.0455**
	4	5	83	100	91.7	93.0	84.2	101.8	7.11	
Healthy	1	16	0	92	48.1	41.4	27.5	55.3	26.13	
	2	16	8	92	71.4	65.8	52.2	79.5	25.57	**0.0138**
	3	16	17	100	71.8	67.9	54.4	81.3	25.25	**0.0082**
	4	5	83	100	91.7	93.0	84.2	101.8	7.11	
Weak	1	16	0	25	3.6	7.4	2.6	12.2	9.04	
	2	16	0	25	0.0	7.1	2.1	12.2	9.43	0.9441
	3	16	0	7	0.0	0.4	-0.5	1.3	1.67	**0.0024**
	4	5	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	
Stillborn	1	16	0	50	9.5	17.5	8.5	26.4	16.83	
	2	16	0	42	3.8	10.7	3.3	18.2	13.94	0.1965
	3	16	0	83	10.6	19.0	7.0	31.0	22.54	0.9033
	4	5	0	17	8.3	7.0	-1.8	15.8	7.11	
Mummies	1	16	0	63	25.8	28.1	18.8	37.4	17.50	
	2	16	0	55	9.1	14.1	6.0	22.3	15.25	**0.0190**
	3	16	0	50	3.3	8.7	1.2	16.3	14.14	**0.0006**
	4	5	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	
Mortalities / Crushed	1	16	0	27	0.0	5.6	1.1	10.2	8.55	
	2	16	0	18	0.0	2.1	-0.6	4.8	5.07	0.2276
	3	16	0	25	0.0	4.0	0.1	7.8	7.25	0.6108
	4	5	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	
Alive on DOF+20	1	15	0	100	33.3	43.6	23.0	64.3	37.28	
	2	16	13	100	84.5	73.8	58.5	89.2	28.80	**0.0203**
	3	16	44	100	86.6	83.8	75.1	92.5	16.37	**0.0022**
	4	5	100	100	100.0	100.0	100.0	100.0	0.00	

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS 94881 MLV group; Group 4 = Negative control group

5

Table 6.13: Summary of Group Reproductive Performance Results **(No. of piglets per litter)** on the DOF

Piglets	Group *	N	Min.	Max.	Median	Mean	95 % CI		SD	P
Total	1	16	6	15	12.0	11.6	10.4	12.9	2.31	
	2	16	9	13	11.0	11.1	10.4	11.7	1.24	0.1857
	3	16	7	15	12.0	11.6	10.3	12.9	2.42	0.9623
	4	5	10	14	12.0	11.6	9.5	13.7	1.67	
Alive	1	16	0	11	6.0	6.5	4.7	8.3	3.35	
	2	16	4	12	8.0	8.3	7.0	9.5	2.27	0.1543
	3	16	2	13	9.0	8.6	6.6	10.6	3.77	0.1039
	4	5	9	14	10.0	10.8	8.4	13.2	1.92	
Healthy	1	16	0	11	5.5	4.9	3.1	6.7	3.36	
	2	16	1	12	7.0	7.2	5.7	8.7	2.83	0.0640
	3	16	2	13	8.5	8.1	6.1	10.1	3.76	**0.0211**
	4	5	9	14	10.0	10.8	8.4	13.2	1.92	
Weak	1	16	0	3	0.5	0.9	0.3	1.5	1.09	
	2	16	0	3	0.0	0.8	0.2	1.4	1.11	0.8569
	3	16	0	1	0.0	0.1	-0.1	0.2	0.25	**0.0090**
	4	5	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	
Stillborn	1	16	0	6	1.0	2.0	0.9	3.1	2.03	
	2	16	0	5	0.5	1.3	0.4	2.1	1.65	0.1681
	3	16	0	10	1.0	2.1	0.8	3.5	2.58	0.9478
	4	5	0	2	1.0	0.8	-0.2	1.8	0.84	
Mummies	1	16	0	7	3.0	3.1	2.1	4.1	1.89	
	2	16	0	6	1.0	1.6	0.7	2.5	1.67	**0.0125**
	3	16	0	4	0.5	0.9	0.2	1.5	1.20	**0.0003**
	4	5	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	
Mortalities / Crushed	1	16	0	3	0.0	0.7	0.1	1.2	1.01	
	2	16	0	2	0.0	0.3	-0.1	0.6	0.58	0.2200
	3	16	0	2	0.0	0.4	0.0	0.8	0.73	0.6115
	4	5	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	
Alive on DOF+20	1	16	0	10	2.0	2.9	1.2	4.7	3.21	
	2	16	1	10	6.5	6.2	4.5	7.9	3.19	**0.0063**
	3	16	2	12	7.5	6.9	5.0	8.9	3.71	**0.0026**
	4	5	9	14	10.0	10.8	8.4	13.2	1.92	

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS 94881 MLV group; Group 4 = Negative control group

[0307] LIVE PIGLETS AT DOF+20

[0308] These scores highlight the number of live piglets at weaning (20 days of age). A summary of group percentage and number of live piglets per litter on DOF+20 is shown above in Tables 6.12 and 6.13.

[0309] Mean percentages of live piglets per litter at weaning (DOF+20) were 43.6%, 73.8%, 83.8%, and 100.0% for the challenge control, low titer, high titer, and negative control groups, respectively. Mean number of live piglets per litter at weaning were 2.9, 6.2, 6.9 and 10.8 for the challenge control, low titer, high titer, and negative control groups, respectively. Both the low titer and high titer groups had significantly higher percentages and numbers of alive piglets per litter at weaning (DOF+20) compared with the challenge control group (**P≤0.0203**).

[0310] GILT qPCR VIREMIA

[0311] All gilts were qPCR negative for PRRSv RNA on D0. All challenge control and negative control gilts remained qPCR negative for PRRSv RNA up to and including the day of challenge (D118). The negative control group remained qPCR negative for the remainder of the study, with exception of gilt No. 108, which was "positive" on DOF+7. Gilt No. 108 was negative at other time points for PRRSv RNA by qPCR testing.

[0312] Post-vaccination, 50% and 36% of low titer and high titer gilts, respectively, were qPCR positive for PRRSv RNA (**P≤0.0007**) on D7. From D14 to D56, only 4% of low titer gilts remained qPCR positive while up to 4% of high titer gilts were qPCR positive intermittently during this observation period. No differences were detected between vaccine groups and the challenge control group from D14 to D56 for the percentage of gilts qPCR positive for PRRSv RNA (P=1.0000 or no test conducted). All vaccinated gilts were qPCR negative for PRRSv RNA on D84 and D118 (day of challenge).

[0313] Post-challenge, the low titer and higher groups had statistically lower percentages of gilts qPCR positive for PRRSv RNA compared with the challenge control group on Days 125, DOF 0, and DOF+13 (**P≤0.0155**). On D132, the low titer group had a significantly lower percentage of gilts qPCR positive for PRRSv

RNA (**P=0.0290**); while no statistical difference was detected between the high titer group and the challenge control group (P=0.1556). No significant differences were detected between vaccine groups and the challenge control group on DOF+7 and DOF+20 for the percentage of gilts qPCR positive for PRRSv RNA (P≥0.1719).

[0314] A summary of group percentage of gilts qPCR positive for PRRSv RNA from D7 to DOF +20 is shown below in Tables 6.14 and 6.15.

Table 6.14 Summary of Group Percentage of Gilts qPCR Positive for PRRSv RNA from D7 to D132

Study Day	Group*	N	%	95 % CI		Total	P
7	1	0	0	0.0	12.3	28	
	2	14	50	30.6	69.4	28	**<0.0001**
	3	10	36	18.6	55.9	28	**0.0007**
	4	0	0	0.0	30.8	10	
14	1	0	0	0.0	12.3	28	
	2	1	4	0.1	18.3	28	1.0000
	3	0	0	0.0	12.3	28	n.a.
	4	0	0	0.0	30.8	10	
21	1	0	0	0.0	12.3	28	
	2	1	4	0.1	18.3	28	1.0000
	3	1	4	0.1	18.3	28	1.0000
	4	0	0	0.0	30.8	10	
56	1	0	0	0.0	14.8	23	
	2	1	4	0.1	19.6	26	1.0000
	3	1	4	0.1	20.4	25	1.0000
	4	0	0	0.0	33.6	9	
84	1	0	0	0.0	14.8	23	
	2	0	0	0.0	13.2	26	n.a.
	3	0	0	0.0	13.7	25	n.a.
	4	0	0	0.0	33.6	9	
118 (Day of challenge)	1	0	0	0.0	20.6	16	
	2	0	0	0.0	20.6	16	n.a.
	3	0	0	0.0	20.6	16	n.a.
	4	0	0	0.0	52.2	5	
125	1	16	100	79.4	100.0	16	
	2	5	31	11.0	58.7	16	**0.0001**
	3	4	25	7.3	52.4	16	**<0.0001**
	4	0	0	0.0	52.2	5	
132	1	10	63	35.4	84.8	16	
	2	3	19	4.0	45.6	16	**0.0290**
	3	5	31	11.0	58.7	16	0.1556
	4	0	0	0.0	52.2	5	

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS94881 MLV group; Group 4 = Negative control group; n.a. = not appicable, no test conducted

[0099] Table 6.15: Summary of Group Percentage of Gilts qPCR Positive for PRRSv RNA from DOF 0 to DOF+20

Study Day	Group*	N	%	95 % CI		Total	P
DOF+0	1	15	94	69.8	99.8	16	
	2	4	25	7.3	52.4	16	**0.0002**
	3	1	6	0.2	30.2	16	**<0.0001**
	4	0	0	0.0	52.2	5	
DOF+7	1	5	31	11.0	58.7	16	
	2	2	13	1.6	38.3	16	0.3944
	3	1	6	0.2	30.2	16	0.1719
	4	1	20	0.5	71.6	5	
DOF+13	1	7	47	21.3	73.4	15	
	2	0	0	0.0	20.6	16	**0.0024**
	3	1	6	0.2	30.2	16	**0.0155**
	4	0	0	0.0	52.2	5	
DOF+20	1	3	19	4.0	45.6	16	
	2	3	19	4.0	45.6	16	1.0000
	3	0	0	0.0	20.6	16	0.2258
	4	0	0	0.0	52.2	5	

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS 94881 MLV group; Group 4 = Negative control group

[0315] Both vaccine groups had significantly higher median viral loads compared with the challenge control group on D7 (**P≤0.0007**). No differences were detected between vaccine groups and the challenge control group from D14 to D56 for viral load (P=1.0000). All vaccinated gilts had zero viral load on D84 and D118 (day of challenge).

[0316] Post-challenge, the low titer and higher groups had statistically lower median viral loads compared with the challenge control group on D125, DOF 0, and DOF+13 (**P≤0.0155**). On D132, the low titer group had a significantly lower median viral load **(P=0.0230)**; while no statistical difference was detected between

the high titer group and the challenge control group (0.94 and 1.97 log_{10} GE/mL respectively; P=0.1144). No significant differences for viral load were detected between vaccine groups and the challenge control group on DOF+7 and DOF+20 (P≥0.1719).

[0317] A summary of group mean gilt qPCR GE/mL results from D7 to DOF +20 is shown below in Tables 6.16 and 6.17.

Table 6.16: Summary of Group Gilt qPCR Results (log_{10} GE/mL) From D7 to D132

Study Day	Group *	N	Min.	Max.	Median	95 % CI		QRange	Mean	P
7	1	28	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	2	28	0.00	3.00	1.500	0.000	3.000	3.000	1.500	**<0.0001**
	3	28	0.00	3.00	0.000	0.000	3.000	3.000	1.071	**0.0007**
	4	10	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
14	1	28	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	2	28	0.00	3.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.107	1.0000
	3	28	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.0000
	4	10	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
21	1	28	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	2	28	0.00	3.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.107	1.0000
	3	28	0.00	3.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.107	1.0000
	4	10	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
56	1	23	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	2	26	0.00	3.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.115	1.0000
	3	25	0.00	3.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.120	1.0000
	4	9	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
84	1	23	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	2	26	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.0000
	3	25	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.0000
	4	9	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
118 (Day of challenge)	1	16	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	2	16	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.0000
	3	16	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.0000
	4	5	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
125	1	16	3.00	5.38	4.495	4.130	4.880	0.765	4.419	
	2	16	0.00	6.46	0.000	0.000	3.000	3.000	1.293	**0.0001**
	3	16	0.00	3.00	0.000	0.000	3.000	1.500	0.750	**<0.0001**
	4	5	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

132	1	16	0.00	4.47	3.000	0.000	3.000	3.000	1.967	
	2	16	0.00	3.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.563	**0.0230**
	3	16	0.00	3.00	0.000	0.000	3.000	3.000	0.938	0.1144
	4	5	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS 94881 MLV group; Group 4 = Negative control group

Table 6.17: Summary of Group Gilt qPCR Results (log_{10} GE/mL) From DOF 0 to DOF+20

Study Day	Group *	N	Min.	Max.	Median	95 % CI		QRange	Mean	P
DOF+0	1	16	0.00	3.00	3.000	3.000	3.000	0.000	2.813	
	2	16	0.00	3.00	0.000	0.000	3.000	1.500	0.750	**0.0002**
	3	16	0.00	3.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.188	**<0.0001**
	4	5	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
DOF+7	1	16	0.00	3.00	0.000	0.000	3.000	3.000	0.938	
	2	16	0.00	5.55	0.000	0.000	0.000	0.000	0.534	0.3944
	3	16	0.00	3.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.188	0.1719
	4	5	0.00	3.00	0.000	0.000	3.000	0.000	0.600	
DOF+13	1	15	0.00	3.00	0.000	0.000	3.000	3.000	1.400	
	2	16	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	**0.0024**
	3	16	0.00	3.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.188	**0.0155**
	4	5	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
DOF+20	1	16	0.00	3.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.563	
	2	16	0.00	6.45	0.000	0.000	0.000	0.000	0.903	0.7924
	3	16	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.2258
	4	5	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS 94881 MLV group; Group 4 = Negative control group

[0318] GILT CLINICAL OBSERVATIONS SCORES POST-CHALLENGE

[0319] From D116 to DOF+20, 25%, 25%, 38% and 60% of challenge control, low titer, high titer and negative control gilts, respectively, exhibited clinical disease for at least one day from D116 to DOF+20. No significant differences were detected between vaccine groups and the challenge control group for the frequency of gilts positive for clinical disease from D116 to DOF+20 (P≥0.7043).

[0320] A summary of group percentage of gilts positive for clinical disease (a clinical observation score of > 0) for at least one day from D116 to DOF +20 is shown below in Table 6.18.

Table 6.18: Summary of group percentage of gilts positive for clinical disease (a clinical observation score of > 0) for at least one day from D116 to DOF +20

Study Days	Group*	N	%	95 % CI		Total	P
116 –	1	4	25	7.3	52.4	16	
DOF+20	2	4	25	7.3	52.4	16	1.0000
	3	6	38	15.2	64.6	16	0.7043
	4	3	60	14.7	94.7	5	

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS 94881 MLV group; Group 4 = Negative control group

[0321] GILT PRRS ELISA SEROLOGY

[0322] All gilts were PRRS seronegative on D0 and D7. All challenge control and negative control gilts remained PRRS seronegative up to and including the day of challenge (D118); while the negative control group remained PRRS seronegative for the remainder of the study (DOF+20).

[0323] On D14, 18% and 21% of low titer and high titer gilts, respectively, were PRRS seropositive. The high titer group had a significantly higher percentage of PRRS seropositive gilts on D14 (**P=0.0232**), while no difference was detected for the low titer group in comparison with the challenge control group (p=0.0515). These percentages reached group highs of 65% and 60% for the low titer and high titer groups, respectively on D56 (**P<0.0001**). On the day of the challenge (D118), 56% and 50% of low titer and high titer gilts were PRRS seropositive (**P≤0.0024**). On D125, 6%, 88%, and 100% of challenge control, low titer and high titer gilts, respectively, were PRRS seropositive; and the difference between the vaccine groups and the challenge control group were significant (**P<0.0001**). After D125, all remaining challenge control, low titer and high titer gilts were PRRS seropositive for the remainder of the study (no test conducted).

[0324] A summary of group PRRS ELISA serology results from D14 to DOF+20 is shown below in Tables 6.19 and 6.20.

Table 6.19: Summary of Group Gilt PRRS ELISA Serology Results from D14 to Day 132

Study Day	Group*	N	%	95 % CI		Total	P
7	1	0	0	0.0	12.3	28	
	2	0	0	0.0	12.3	28	n.a.
	3	0	0	0.0	12.3	28	n.a.
	4	0	0	0.0	30.8	10	
14	1	0	0	0.0	12.3	28	
	2	5	18	6.1	36.9	28	0.0515
	3	6	21	8.3	41.0	28	**0.0232**
	4	0	0	0.0	30.8	10	
21	1	0	0	0.0	12.3	28	
	2	13	46	27.5	66.1	28	**<0.0001**
	3	11	39	21.5	59.4	28	**0.0003**
	4	0	0	0.0	30.8	10	
56	1	0	0	0.0	14.8	23	
	2	17	65	44.3	82.8	26	**<0.0001**
	3	15	60	38.7	78.9	25	**<0.0001**
	4	0	0	0.0	33.6	9	
84	1	0	0	0.0	14.8	23	
	2	15	58	36.9	76.6	26	**<0.0001**
	3	14	56	34.9	75.6	25	**<0.0001**
	4	0	0	0.0	33.6	9	
118	1	0	0	0.0	20.6	16	
	2	9	56	29.9	80.2	16	**0.0008**
	3	8	50	24.7	75.3	16	**0.0024**
	4	0	0	0.0	52.2	5	
125	1	1	6	0.2	30.2	16	
	2	14	88	61.7	98.4	16	**<0.0001**
	3	16	100	79.4	100.0	16	**<0.0001**
	4	0	0	0.0	52.2	5	
132	1	16	100	79.4	100.0	16	
	2	16	100	79.4	100.0	16	n.a.
	3	16	100	79.4	100.0	16	n.a.
	4	0	0	0.0	52.2	5	

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS 94881 MLV group; Group 4 = Negative control group. n.a. = not appicable, no test conducted

Table 6.20 Summary of Group Gilt PRRS ELISA Serology Results from DOF 0 to DOF+20

Study Day	Group*	N	%	95 % CI		Total	P
DOF+0	1	16	100	79.4	100.0	16	
	2	16	100	79.4	100.0	16	n.a.
	3	16	100	79.4	100.0	16	n.a.
	4	0	0	0.0	52.2	5	
DOF+7	1	15	100	78.2	100.0	15	
	2	16	100	79.4	100.0	16	n.a.
	3	16	100	79.4	100.0	16	n.a.
	4	0	0	0.0	52.2	5	
DOF+13	1	16	100	79.4	100.0	16	
	2	16	100	79.4	100.0	16	n.a.
	3	16	100	79.4	100.0	16	n.a.
	4	0	0	0.0	52.2	5	
DOF+20	1	16	100	79.4	100.0	16	
	2	16	100	79.4	100.0	16	n.a.
	3	15	100	78.2	100.0	15	n.a.
	4	0	0	0.0	52.2	5	

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS 94881 MLV group; Group 4 = Negative control group.

**No test conducted on sample from Gilt No. 106. n.a. = not appicable, no test conducted

[0325] GILT ASSESSMENTS POST-VACCINATION

[0326] No abnormal assessments from D1 to 21 were detected in any groups and no test was conducted. From D1 to D113, 4%, 4%, 0% and 10% of challenge control, low titer, high titer and negative control gilts, respectively, exhibited an abnormal assessment for at least one day from D1 to D113. No significant differences were detected between vaccine groups and the challenge control group for abnormal assessments from D1 to D113 (P=1.0000).

[0327] Individually, No. 109 (challenge control group) exhibited lameness of the right rear leg on D85, No. 12 (low titer group) exhibited a swelling in the left neck region from D78 to D89, and No. 21 (negative control group) exhibited lameness from D81 to D83.

[0328] A summary of group percentage of gilts that exhibited an abnormal assessment for at least one day from D1 to D21 and from D1 to D113 is shown below in Table 6.21.

Table 6.21 Summary of Group Abnormal Assessments for At Least One Day from D1 to D113

Study Days	Group*	N	%	95 % CI		Total	P
1 – 21	**1 – 4**	no 'positive' findings					
1 – 113	**1**	1	4	0.1	18.3	28	
	2	1	4	0.1	18.3	28	1.0000
	3	0	0	0.0	12.3	28	1.0000
	4	1	10	0.3	44.5	10	

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS 94881 MLV group; Group 4 = Negative control group

[0329] PIGLET CLINICAL OBSERVATIONS SCORES

[0330] Mean percentages of piglets per litter positive for clinical disease (a clinical observation score of > 0) for at least one day from DOF+1 to DOF+20 were 91.6%, 32.5%, 33.4% and 3.2% for the challenge control, low titer, high titer, and negative control groups, respectively. Low and high titer groups had significantly lower percentages of piglets per litter positive for clinical disease for at least one day from DOF+1 to DOF+20 compared with the challenge control group (**$p \leq 0.0001$**).

[0331] A summary of group percentage of piglets per litter that were positive for clinical disease (a clinical observation score of > 0) for at least one day from DOF+1 to DOF+20 is shown below in Table 6.22.

Table 6.22: Summary of group percentage of piglets per litter positive for clinical disease (a clinical observation score of > 0) for at least one day from DOF+1 to DOF+20

Study Days	Group *	N	Min.	Max.	Median	Mean	95 % CI		SD	P
DOF+1	1	15	56	100	100.0	91.6	82.9	100.4	15.78	
to	2	16	0	100	25.0	32.5	15.6	49.4	31.64	**<0.0001**
DOF+20	3	16	0	100	25.0	33.4	19.0	47.9	27.16	**<0.0001**
	4	5	0	9	0.0	3.2	-2.3	8.8	4.50	

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS 94881 MLV group; Group 4 = Negative control group

[0332] PIGLET SERUM/BODY FLUIDS qPCR RESULTS

[0333] A mean of 86.3%, 58.1%, 55.0% and 0% of piglets per litter for the challenge control, low titer, high titer and negative control groups, respectively, were qPCR positive for PRRSv RNA on DOF 0. The low titer and higher groups had statistically lower percentages of piglets per litter qPCR positive for PRRSv RNA compared with the challenge control group on DOF 0 (**P≤0.0381**). On DOF+7, again the low titer and high titer groups had significantly lower percentages of piglets per litter qPCR positive for PRRSv RNA compared with the challenge control group (**P≤0.0293**). On DOF+13, only the low titer group had a significantly lower percentage of piglets per litter qPCR positive (**P=0.0216**); while no significant differences were detected for the high titer group and the challenge control for the percentage of piglets per litter qPCR positive (P=0.0860). No significant differences were detected between groups on DOF+20 (P≥0.0614).

[0334] A summary of group percentage of serum/body fluid qPCR PRRSv positive piglets per gilt is shown below in Table 6.23.

Table 6.23: A Summary of Group Percentage of Serum/Body Fluid qPCR PRRSv Positive Piglets per Gilt

Study Day	Group*	N	Min.	Max.	Median	Mean	95 % CI		SD	P
DOF+0	1	16	50	100	96.4	86.3	76.8	95.8	17.87	
	2	16	0	100	68.3	58.1	37.3	78.9	39.07	**0.0381**
	3	16	0	100	60.0	55.0	37.0	73.0	33.77	**0.0018**
	4	5	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	
DOF+7	1	12	100	100	100.0	100.0	100.0	100.0	0.00	
	2	16	10	100	100.0	76.6	57.1	96.0	36.51	**0.0293**
	3	16	0	100	100.0	78.6	60.6	96.6	33.83	**0.0175**
	4	5	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	
DOF+13	1	11	100	100	100.0	100.0	100.0	100.0	0.00	
	2	16	0	100	100.0	75.4	55.0	95.8	38.31	**0.0216**
	3	16	0	100	100.0	84.0	68.2	99.9	29.75	0.0860
	4	5	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	
DOF+20	1	11	0	100	100.0	90.9	70.7	111.2	30.15	
	2	16	0	100	93.8	75.3	55.6	95.0	36.97	0.0614
	3	16	0	100	100.0	81.6	65.0	98.1	31.06	0.1832
	4	5	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS 94881 MLV group; Group 4 = Negative control group

[0335] The high titer group had a significantly lower median qPCR result compared with the challenge control group on DOF 0 (**P=0.0030**); while no difference was detected between the low titer group and the challenge control group (P=0.0620). On DOF+7, DOF+13 and DOF+20, both vaccine groups had significantly lower median qPCR values compared with the challenge control group (**p≤0.0122**).

[0336] A summary of group piglet serum/body fluid qPCR GE/mL results per gilt is shown below in Table 6.24.

Table 6.24: Summary of Group Piglet Serum/Body Fluid qPCR results (log_{10} GE/mL) per Gilt (P values for differences between groups based on median qPCR values)

Study Day	Group *	N	Min.	Max.	Median	95 % CI		QRange	Mean	P
DOF+0	1	180	0.00	8.69	6.400	6.080	6.790	3.195	5.556	
	2	176	0.00	8.47	3.000	3.000	4.420	6.945	3.560	0.0620
	3	183	0.00	8.76	3.000	0.000	3.000	6.580	3.049	**0.0030**
	4	58	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
DOF+7	1	58	4.47	8.76	6.950	6.610	7.370	1.300	6.914	
	2	103	0.00	8.12	3.000	3.000	4.930	5.640	3.337	**<0.0001**
	3	115	0.00	6.91	4.280	3.000	4.630	2.120	3.642	**<0.0001**
	4	54	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
DOF+13	1	52	4.19	8.62	6.835	6.430	6.970	0.995	6.549	
	2	100	0.00	8.22	3.000	3.000	3.000	4.530	2.678	**<0.0001**
	3	113	0.00	6.54	3.000	3.000	3.000	1.580	3.413	**<0.0001**
	4	54	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
DOF+20	1	46	0.00	6.94	5.595	5.270	6.520	1.770	5.554	
	2	98	0.00	6.59	3.000	3.000	3.000	4.000	2.502	**0.0122**
	3	111	0.00	6.28	3.000	3.000	3.000	1.160	3.218	**0.0005**
	4	54	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS 94881 MLV group; Group 4 = Negative control group

[0337] PIGLET ADWG

[0338] No differences were detected between groups for LS Mean body weights on DOF 0 (P≥0.2972). Both vaccine groups had higher least square mean body weights compared with the challenge control group on DOF+20 (**P<0.0028**), with or without DOF 0 body weights factored as a covariate in the analyses.

[0339] Mean ADWG from DOF 0 to DOF+20 were 0.1 kg/day, 0.2 kg/day, 0.2 kg/day and 0.2 kg/day for the challenge control, low titer, high titer, and negative control groups, respectively. Both vaccine groups had significantly higher ADWG compared with the challenge control group (**P<0.0028**), with or without DOF 0 body weights factored as a covariate in the analyses.

[0340] A summary of group DOF 0 and DOF+20 piglet body weights and DOF 0 to DOF+20 ADWG (kg/day) is shown below in Tables 6.25 and 6.26.

Table 6.25: Summary of Group DOF 0 and DOF+20 Piglet Body Weights and DOF 0 to DOF+20 ADWG (kg/day)

Study Day(s)	Group*	N	Min.	Max.	Median	Mean	95 % CI		SD
DOF+0 Body Weights	1	47	0.9	2.0	1.40	1.34	1.274	1.411	0.234
	2	99	0.9	2.1	1.40	1.43	1.388	1.479	0.227
	3	111	0.9	2.0	1.40	1.40	1.360	1.448	0.234
	4	54	0.9	1.9	1.40	1.39	1.335	1.454	0.218
DOF+20 Body Weights	1	47	1.5	6.1	3.70	3.80	3.462	4.146	1.164
	2	99	2.4	8.3	5.50	5.42	5.168	5.673	1.266
	3	111	2.1	8.2	5.30	5.19	5.000	5.388	1.032
	4	54	2.4	6.9	5.20	5.26	5.008	5.511	0.922
ADWG (DOF+0 to DOF +20)	1	47	0.015	0.235	0.1150	0.1231	0.10649	0.13968	0.05653
	2	99	0.065	0.340	0.2000	0.1993	0.18770	0.21099	0.05837
	3	111	0.055	0.330	0.1950	0.1895	0.18078	0.19823	0.04638
	4	54	0.060	0.260	0.1925	0.1932	0.18305	0.20343	0.03733

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS 94881 MLV group; Group 4 = Negative control group

Table 6.26: Summary of Group LS Mean Body Weights and DOF 0 to DOF+20 ADWG (kg/day) – Test Results (P values) on Differences between Groups

Study Day(s)	Group*	LS Mean	95 % confidence interval		P
DOF+0 Body Weights	1	1.32	1.169	1.477	
	2	1.42	1.318	1.522	
	3	1.41	1.317	1.497	
	Diff. 1-2	-0.10	-0.281	0.088	0.2972
	Diff. 1-3	-0.08	-0.262	0.094	0.3467
DOF+20 Body Weights	1	3.82	3.072	4.567	
	2	5.32	4.827	5.819	
	3	5.35	4.910	5.785	
	Diff. 1-2	-1.50	-2.401	-0.606	**0.0016**
	Diff. 1-3	-1.53	-2.394	-0.662	**0.0010**
DOF+20** Body Weights	1	4.01	3.341	4.685	
	2	5.28	4.843	5.727	
	3	5.34	4.950	5.728	
	Diff. 1-2	-1.27	-2.078	-0.466	**0.0028**
	Diff. 1-3	-1.33	-2.103	-0.550	**0.0013**
ADWG (DOF+0 to DOF+20)	1	0.125	0.0903	0.1594	
	2	0.195	0.1722	0.2181	
	3	0.197	0.1768	0.2172	
	Diff. 1-2	-0.070	-0.1118	-0.0289	**0.0014**
	Diff. 1-3	-0.072	-0.1122	-0.0322	**0.0008**
ADWG (DOF+0 to DOF+20**)	1	0.130	0.0969	0.1640	
	2	0.194	0.1720	0.2161	
	3	0.197	0.1773	0.2162	
	Diff. 1-2	-0.064	-0.1039	-0.0233	**0.0028**
	Diff. 1-3	-0.066	-0.1052	-0.0275	**0.0013**

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS 94881 MLV group; Group 4 = Negative control group.

** weight at DOF+0 was used as a covariate

[0341] PIGLET NECROPSY OBSERVATIONS and DIAGNOSES

[0342] Feti listed as stillborns, mummies or crushed at farrowing were confirmed at necropsy as correctly categorized with the exception of 8 feti. Two-challenge control feti were listed as stillborns (40-S1, 66-S1), but necropsy results

revealed inflated lungs indicating they were alive at the time of birth. Two-challenge control feti were listed as crushed (1-C1, 79-C2), but necropsy results revealed non-inflated lungs for both feti, indicating they did not breath. One-low titer fetus was listed as a stillborn (85-S2), but necropsy results revealed inflated lungs indicating the piglet was alive at the time of birth. Three-high titer piglets were listed as crushed (36-C1, 36-C2, 65-C1), but necropsy results revealed non-inflated lungs for both feti, indicating they did not breath. Due to the low number of feti incorrectly listed at time of farrowing, no changes were made to gilt performance analyses.

[0343] One-challenge control piglet 102-428 died subsequently to blood collection, which was confirmed by necropsy.

[0344] PIGLET LUNG qPCR RESULTS

[0345] Of the feti and dead piglets necropsied, the mean lung qPCR results were 4.68, 4.09, 3.55 and 0.0 $\log_{10}$ GE/mL for the challenge control, low titer, high titer, and negative control groups, respectively. No statistical analyses were conducted on these data.

[0346] A summary of group lung PRRSv qPCR results ($\log_{10}$ GE/mL) is shown below in Table 6.27.

Table 6.27: Summary of Group Piglet Lung PRRSv qPCR Results ($\log_{10}$ GE/mL)

Group	N	Min.	Max.	Median	95 % CI		QRange	Mean
1	141	0.00	7.95	5.140	4.810	5.390	2.990	4.676
2	79	0.00	7.45	4.780	3.000	5.260	2.620	4.092
3	75	0.00	6.84	4.220	3.000	5.100	5.620	3.547
4	4	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

*Group 1 = Challenge control group; Group 2 = Low titer PRRS 94881 MLV group; Group 3 = High titer PRRS 94881 MLV group; Group 4 = Negative control group

[0347] DISCUSSION/CONCLUSION

[0348] To achieve the study objective, four groups of PRRS susceptible gilts were included in the study design on D0: a challenge control group that received

control product (Group 1); a low titer vaccine group that received 1 x $10^{2.43}$ $TCID_{50}$ of PRRS 94881 MLV (IVP No. 1, Group 2); a high titer vaccine group that received 1 x $10^{3.90}$ $TCID_{50}$ of PRRS 94881 MLV (IVP No. 2, Group 3); and a negative control group (Group 4) that also received control product. Each treatment was administered as a 2.0 mL dose IM at approximately 28 days prior to breeding (D0).

[0349] To determine the minimum immunizing dose of PRRS 94881 MLV, the two vaccine titer groups and the challenge control group were challenged on D118 (approximately 90 days of gestation) with a heterologous European isolate of PRRSv (isolate 190136) and evaluated post-challenge for percentage and number of live piglets per litter at birth (day of farrowing, DOF) and percentage and number of live piglets per litter at 21 days of age (DOF +21).

[0350] Validation of the study (Negative Control Group 4)

[0351] To ensure that source gilts were free of PRRSv and that no extraneous PRRSv exposure or cross-contamination among treatment and control groups occurred during the study, a negative control group (Group 4) was included in the study design. Negative control gilts were negative for PRRS antibodies throughout the study. In addition, this group of gilts and their progeny were also negative for PRRSv viremia (qPCR) at all tested time points with exception of No. 108 on DOF+7. Gilt No. 108 was "positive" on DOF+7, while qPCR negative at all other time points and her piglets were negative for PRRSv RNA as well. This result was considered an error due to sample contamination and not due to PRRSv infection. These results support that the negative control group remained free of PRRS infection during the study and validate the results of this trial.

[0352] Validation of the PRRSv reproductive challenge model (Challenge Control Group 1)

[0353] A challenge model involving a virulent EU-derived strain of PRRSv that induces sufficient and reproducible PRRS clinical disease is necessary to adequately evaluate PRRS vaccine efficacy in a laboratory setting. Following inoculation with European PRRS isolate 190136 (1 x $10^{6.30}$ $TCID_{50}$/6mL), the

challenge control group exhibited only 54.4% live piglets per litter at birth (93.0% for the negative control group), 17.5% and 28.1% per litter of stillborns and mummies, respectively (7.0% and 0.0%, respectively, for the negative control group), 91.6% piglets per litter exhibited clinical disease for at least one day from DOF+1 to DOF+20 (3.2% piglets per litter for the negative control group), a mean of 2.9 live piglets per litter at 20 days of age (a mean of 10.8 for the negative control group), and 86.3% of piglets per litter viremic at birth (0% for the negative control group). These results highlight that severe PRRS-specific clinical disease was induced in the unvaccinated, challenge control group of gilts and their progeny, thus validating this challenge model as an adequate clinical laboratory tool to evaluate PRRS vaccine efficacy and more specifically, the MID of PRRS 94881 MLV in gilts.

[0354] Determination of the minimum immunizing dose of PRRS 94881 MLV in gilts (low and high titer vaccine doses; Groups 2-3)

[0355] Determination of the MID of PRRS 94881 MLV in gilts was based upon the vaccine group that received the lowest titer of vaccine that resulted in higher percentages or number of live piglets per litter at birth and higher percentages of number of live piglets per litter at 20 days of age post-challenge compared with the challenge control group.

[0356] Live piglets per litter (either percent or number) at farrowing was selected as one of two key criteria for determining the MID of PRRS 94881 MLV. The first key criterion was based upon the fact that PRRSv infection in pregnant gilts and sows typically results in stillborns and mummies, with low numbers of live piglets at farrowing. Live piglets per litter at birth were defined as the summation of healthy live, weak live and crushed-mortality piglets at farrowing. Piglets listed as crushed or mortality were included in the “live” category because necropsy findings confirmed these piglets were alive at birth and died shortly thereafter due to trauma. Both the low titer and high titer groups exhibited significantly higher percentages of live piglets per litter at farrowing compared with the challenge control (**P≤0.0455**), thus this criterion for vaccine efficacy was met. Although no

significant differences were detected between the low and high titer vaccine groups and the challenge control group with respect to the mean number of live piglets per litter at farrowing (P≥0.1857), the low titer and high titer groups did exhibit considerably higher mean number of live piglets per litter at farrowing (mean 8.3 and 8.6 piglets per litter, respectively) in relationship to the challenge control group (mean 6.5 piglets per litter) thus, providing further evidence and support that a beneficial vaccine treatment effect was observed in these animals post-challenge.

[0357] Live piglets per litter (either percent or number) at 20 days of age was the second criterion for determining the MID of PRRS 94881 MLV because gilt PRRS immunity will influence *in utero* infection of piglets and shedding of virus from gilts to live piglets. Piglets infected with PRRS *in utero* and born alive or infected with virulent PRRS post-farrowing via shedding from the gilt usually die before weaning secondary to PRRS. In this study, the challenge control, low titer, high titer and negative control group exhibited 43.6%, 73.8%, 83.8% and 100% live piglets per litter, respectively, at 20 days of age (**P≤0.0203**). Likewise, the challenge control, low titer, high titer and negative control groups had a mean number of 2.9, 6.2, 6.9 and 10.8 piglets per litter, respectively, at 20 days of age (**P≤0.0063**). Both vaccine groups had significantly higher percentage and number of live piglets at weaning (**P≤0.0203**), thus this criterion of the study objective was met.

[0358] Further analyses of farrowing data revealed more information that supports vaccine efficacy following PRRSv challenge, especially with respect to the high titer group. The high titer group exhibited statistically a higher percentage and a higher mean number of healthy piglets at birth (**P≤0.0211**); while exhibiting significantly lower percentages and mean numbers of weak and mummified feti (**P≤0.0090**), in comparison with the challenge control group. These data support that the high vaccine dose induced protective immunity against a virulent and heterologous PRRSv challenge strain. The low titer group also exhibited vaccine efficacy at farrowing, as evident by a higher percentage of

healthy live piglets per litter (**P=0.0138**) and significantly lower percentages and mean numbers of mummified feti (**P≤0.0190**). Conversely, no differences were detected between groups for the percentage or number of stillborn feti or crushed/mortalities at farrowing (P≥0.1681).

[0359] Seven days after challenge (D125), the low titer and high titer groups had significantly lower percentages of gilts positive for PRRSv RNA by qPCR testing, as well as significantly lower viral load for both groups, in comparison to the challenge control group (**P≤0.0001**). These data further support that both vaccine dose levels induced adequate immunity in gilts to significantly lower viral replication following challenge. Likewise, the low and high titer groups had significantly lower percentages of gilts qPCR positive on DOF 0 and DOF+13, as well as lower viral load for both groups on these study days (**P≤0.0155**). The low titer group had significantly lower percentage of gilts qPCR positive and lower viral load on D132 (**P≤0.0290**); while no statistical differences were detected between the high titer and the challenge control group for the same set of parameters (P≥0.1144). No statistical differences were detected between vaccine groups and challenge control group for percentage of gilts qPCR positive or viral load on DOF+7 and DOF+20 (P≥0.1719).

[0360] Typically PRRSv does not induce clinical disease in gilts and sows, other than abortion. In this study 25%, 25%, 38% and 60% of challenge control, low titer, high titer and negative control gilts, respectively, exhibited clinical disease (received a clinical observation score > 0) for at least one day post-challenge. No significant differences were detected between the vaccine groups and the challenge control group with respect to percentage of gilts with clinical disease for at least one day from D116 to DOF +20 (P≥0.7043). Gilts that exhibited some form of clinical disease did so at peri-parturition and not immediately after challenge. The high percentage of negative control gilts (60%) that exhibited clinical disease and the fact that clinical disease was noted primarily around the time of farrowing for all groups in this study supports that clinical disease was not

attributed to PRRS disease but rather to physiological changes associated with parturition.

[0361] All gilts in the study were PRRS ELISA seronegative on D0 thus providing confirmation of the inclusion criteria for the test animals entering the study. Likewise, all gilts were PRRS ELISA seronegative on D7. Vaccinated gilts began to exhibit PRRS ELISA seropositive results on D14 and the low and high dose groups exhibited their highest rate of seroconversion of 65% and 60%, respectively, on D56 (**P<0.0001**). Conversely, the challenge control group remained PRRS ELISA seronegative until 7 days post-challenge (D125). From D132 to study conclusion, all low titer, high titer and challenge control gilts were PRRS ELISA seropositive. The percentage of viremia positive gilts post-vaccination peaked on D7 for both vaccine groups as evidenced by 50% and 36% for the low and high titer groups, respectively (**P≤0.0007**). Viremia quickly dropped to 4% (1 of 28, No. 64) and 0% (0 of 28) for the low titer and high titer groups, respectively on D14 (P=1.0000 or no test conducted). Viremia remained at 4% for low titer (1 of 28, No. 56) and high titer (1 of 28, No. 91) groups on D21. On D56, one of 26 (4%, No. 89) low titer gilts and one of 25 (4%, No. 66) high titer gilts were positive for viremia. All gilts were negative for viremia on D84 and D118.

[0362] No significant differences were detected between both vaccine titer groups and the challenge control group with respect to percentage of gilts per group post-vaccination with an abnormal clinical assessment for at least one day from D1 to D113 (P=1.0000). Individually, only three gilts exhibited any abnormal assessments during this time frame. Two gilts exhibited lameness (one challenge control gilt and one negative control gilt) and one - low titer gilt exhibited swelling in the left neck region. Since vaccine was administered in the right neck region, no adverse events associated with this vaccine were noted.

[0363] Piglet PRRS viremia results on the DOF gave further insight to the level of protection in gilts in preventing cross-placental infection of piglets. On the DOF, a mean of 58.1 % and 55.0% piglets per gilt in the low titer and high titer groups, respectively, were qPCR positive. Conversely, a mean of 86.3% piglets

per gilt in the challenge control group were qPCR positive in serum/body fluids, which was significantly higher than both vaccine groups (**P≤0.0381**). When piglet viral load on DOF 0 was examined, high titer piglets had significantly lower viral load in comparison to challenge control piglets (**P=0.0030**); while no difference was detected for viral load between low titer and challenge control piglets (P=0.0620). Significant reductions (P≤0.05) in the percentage of piglets per gilt positive for viremia indicate reduced vertical transmission of virulent PRRSv from vaccinated gilt to off-spring when immunized with either dose of EU PRRS 94881 MLV. In addition, the high titer group had a median qPCR piglet value per gilt of 3.00 $\log_{10}$ GE/ml on the DOF; while the challenge control group had a median qPCR piglet value per gilt of 6.40 $\log_{10}$ GE/mL in serum/body fluids (**P=0.0030**). No significant difference was detected between the low dose group and the challenge control group for piglet viral load on DOF (P=0.0620). This data further supports the efficacy of the high dose of PRRS 94881 MLV when administered to gilts and sows.

[0364] The low titer and high titer groups exhibited means of 32.5% and 33.4%, respectively, for piglets per litter with clinical disease (a clinical observation score of > 0) for least one day from DOF+1 to DOF +20. These results were significantly lower than for the challenge control group, which exhibited a mean of 91.6% piglets per litter for the same parameter (**P≤0.0001**), further supporting vaccine efficacy for both dose levels.

[0365] No significant difference was detected between groups for piglet mean body weights on DOF 0 (P≥0.2972); while both vaccine groups had significantly higher body weights on DOF+20 and ADWG from DOF 0 to DOF+20 (**P≤0.0028**). Once again, these results support the efficacy of both doses of PRRS 94881 MLV.

[0366] Necropsy results confirmed the correct categorization of almost all feti at farrowing. Due to the very small number of feti that were listed as crushed that were actually stillborns and stillborns that were actually crushed at farrowing, in comparison to the overall number of feti correctly categorgized at farrowing, no

changes were made to the gilt performance data before it was analyzed. One-challenge control piglet died subsequently to blood collection. Since this situation only involved one piglet in comparison to the large overall number of piglets in the challenge control group, this piglet was not removed from analyses.

[0367] Lung samples were collected from 141, 79, 75 and 4 dead feti/piglets from the challenge control, low titer, high titer, and negative control groups, respectively. A mean qPCR lung value of 4.68, 4.10, 3.55 and 0.00 log_{10} GE/mL was determined for the challenge control, low titer, high titer and negative control groups, respectively. No analyses were conducted on these data since piglets alive at 20 days of age were not necropsied, but these results highlight that gilts vaccinated with PRRS 94881 MLV resulted in lower viral load in the lungs of piglets when gilts were challenged with a virulent PRRSv.

[0368] In conclusion, results from this study demonstrated significantly higher percentages of live piglets per litter at farrowing (**P≤0.0455**) and higher percentages and numbers of piglets per litter at weaning (**P≤0.0203**) for both vaccine groups in comparison to the challenge control group. Thus, the study objective was met and data from this study establishes the MID of PRRS 94881 MLV in gilts as $1 \times 10^{2.43}$ $TCID_{50}$/2 mL. These results were achieved 118 days days after vaccination, which in addition establishes duration of immunity (DOI) in gilts of approximately 4 months.

[0369] When supportive data was examined, the high dose of PRRS 94881 MLV ($1 \times 10^{3.90}$ $TCID_{50}$/2 mL) was associated with a higher percentage and number of healthy piglets per gilt at farrowing (**P≤0.0211**), a lower percentage and number of weak and mummified feti (**P≤0.0090**), a lower percentage of qPCR positive gilts and lower viral load in gilts post-challenge on D125, DOF 0 and DOF+13 (**P≤0.0155**), a lower percentage of piglets per gilt qPCR positive and lower piglet viral load on DOF 0 (**P≤0.0030**), a lower percentage of piglets per gilt with clinical disease (**P<0.0001**), and higher piglet body weights on DOF+20 and ADWG (**P<0.0013**).

[0370] The low dose group was associated with a higher percentage of healthy piglets per gilt at farrowing (**P=0.0138**), a lower percentage and number of mummified feti (**P≤0.0190**), a lower percentage of qPCR positive gilts and lower viral load in gilts post-challenge on D125, D132, DOF 0 and DOF+13 (**P≤0.0290**), a lower percentage of piglets per gilt qPCR positive on DOF 0 (**P=0.0381**), a lower percentage of piglets per gilt with clinical disease (**P<0.0001**), and higher piglet body weight on DOF+20 and ADWG (**P<0.0028**).

[0371] **Example 7** Evaluation of the onset of immunity PRRS 94881 MLV in susceptible piglets following challenge with a heterologous European isolate of PRRS at two weeks post-vaccination

[0372] The objective of this vaccination-challenge study was to assess the onset of immunity (OOI) two weeks after the administration of the vaccine candidate Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, European-derived Isolate 94881, Modified Live Virus (PRRS 94881 MLV) to 14 ± 3 days of age susceptible piglets. The primary efficacy criterion to satisfy an OOI of 2 weeks post vaccination was if the vaccinate group (Group 1) demonstrated a significant difference ($p \leq 0.05$) for lung lesions post-challenge compared to the unvaccinated challenge control group (Group 2). Secondary parameters included clinical assessments after vaccination, clinical observations after challenge, rectal temperatures, average daily weight gain, assessment of PRRS antibodies and viremia in serum samples and quantitation of PRRS virus in lung samples collected at necropsy.

[0373] Piglets were randomly assigned to either Group 1 (PRRS 94881 MLV-vaccine containing $1 \times 10^{3.82}$ $TCID_{50}$/mL and challenged; n=20), Group 2 (placebo vaccine and challenged; n=20) or Group 3 (placebo vaccine and not challenged; n=10). Piglets were housed in plastic pens with raised floors (n=5/pen). Each treatment group was housed in a different room to avoid transmission of PRRSv through mechanical routes, including aerosolization.

[0374] All animals assigned to this study completed the study. No adverse events were reported during this study. The mean lung lesion scores on D24 were

27.4% and 54.8% for the PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs and the challenge controls, respectively. The mean lung lesion score for the PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs was significantly lower than the challenge controls (**p=0.0002**), and therefore the primary efficacy variable was met and the OOI was established at 2 weeks following a single vaccination. A significantly higher proportion of PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs had positive PRRS-antibody titers on D14, D17 and D21 compared to challenge controls (**p≤0.0012**). The mean AUC for viremia was significantly lower for PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs compared to challenge controls for D17-D24 (50.72 and 54.61 log_{10} GE/mL, respectively; **p=0.0039**) post challenge. PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs exhibited no signs of lethargy (0%) after challenge compared with 45% of the challenge control pigs (**p=0.0012**). PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs had higher weight gains during the post-challenge phase (SD14-SD24) of the study compared to challenge controls (0.3 and 0.1 kg, respectively; **p=0.0003**).

[0375] The significant (p≤0.05) reduction of the lung lesions, clinical signs, replication of the virus in the blood and lungs post-challenge as well as the improvement of the growth performances in vaccinated animals demonstrate vaccine efficacy against virulent PRRSv when the challenge is performed 2 weeks post vaccination. It therefore supports the demonstration of an onset of immunity of at least 2 weeks post-vaccination with PRRS 94881 MLV.

[0376] Objectives/Purpose of Study

[0377] The objective of this vaccination-challenge study was to assess the onset of immunity (OOI) two weeks after the administration of the vaccine candidate Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, European-derived Isolate 94881, Modified Live Virus (PRRS 94881 MLV) to 14 ± 3 days of age susceptible piglets. The primary efficacy criterion to satisfy an OOI of 2 weeks post vaccination was if the vaccinate group (Group 1) demonstrated a significant difference (p≤0.05) for decreased lung lesions post-challenge compared to the unvaccinated, challenge control group (Group 2).

[0378] The secondary efficacy parameters analyzed between the vaccine group and the challenge control group included clinical assessments post-vaccination, PRRS serology, PRRS viremia post-challenge, clinical observations post-challenge, average daily weight gain (ADWG), rectal temperatures and lung PRRSv quantitation.

[0379] A negative control group (Group 3), which was not vaccinated or challenged, was included in the study to demonstrate the source herd was free of PRRSv infection throughout the trial period and that biosecurity was not breached during this trial.

[0380] Schedule of Events

[0381] Table 7.1 Schedule of Events

Study Day	Dates	Key Study Event
-8	14Dec09	Screen for negative PRRS ELISA status
-1	21Dec09	Arrival at VRI; Health Exam
-1 to 12	21Dec09 to 03Jan10	Clinical Assessments
0	22Dec09	Collect body weights Vaccinate Group 1 with IVP, Vaccinate Groups 2 & 3 with CP
7	29Dec09	Blood sample
13 to 24	04Jan10 to 15Jan10	Clinical Observations and Rectal Temperatures
14	05Jan10	Collect body weights and blood sample; Challenge Groups 1 & 2 with heterologous European PRRS isolate
17 and 21	08Jan10 and 12Jan10	Blood sample
24	15Jan10	Euthanize and necropsy pigs after data and sample collection; Score lungs for pathology; collect lung tissues

[0382] Study Design

[0383] Table 7.2 Study Design

Group	Number of Piglets on D0	Treatment on D0 (14 ± 3 days of age)	Challenge on D14 with 1 mL/nostril and 1 mL IM of PRRSv 205817	Euthanize and Necropsy on D24

1	20	1.0 mL IM of IVP (1 x $10^{3.82}$ $TCID_{50}$/mL)	Yes	Yes
2	20	1.0 mL IM of Control Product (CP; Placebo matched product without PRRS 94881 MLV)	Yes	Yes
3	10	1.0 mL IM of CP	No	Yes

[0384] Blinding Criteria

[0385] The Study Investigator and designees were blinded to the assigned treatment groups throughout the in-life phase of the study. To maintain this blinding, an individual who did not participate in assessments of the pigs (i.e., clinical assessments, clinical observations or necropsies) performed the randomization and administered the assigned IVP and CP treatments on D0. BIVI laboratory personnel were blinded to the treatment each pig received while conducting their respective tasks.

[0386] Materials

[0387] Investigational Veterinary Product (IVP) and Control Product (CP)

[0388] Table 7.3 IVP

Generic Product Name:	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, Modified Live Virus
Strain:	94881
Production and Formulation:	BIVI-Production produced PRRS 94881 MLV, Lot 390-005 (Appendix 4) in accordance with Outline of Production, Code 19S1.U_ and EU Dossier Part 2b. On D0, BIVI-Ames reconstituted/diluted PRRS 94881 MLV vaccine Lot 390-005 (Appendix 4) with Phosphate buffered saline (PBS; Lot 809-003, Appendix 5) to formulate the IVP, Lot No. 257-086. Transcribed formulation records for the IVP are presented in Appendix 7 (original records available upon request).
Manufacturer:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506, USA
Lot No.:	N257-086
Expiry Date:	An expiration date of 22 Dec 09 was assigned to the IVP for study purposes only.
Storage Conditions:	Lyophilized vaccine: 2-8 °C Rehydrated/diluted IVP: 2-8 °C or on ice
Testing:	Batch 390-005 was tested by BIVI-QC in accordance with draft Outline of Production and EU dossier Part 2F. At the start and end of the vaccination procedure, BIVI-Ames personnel were contacted. BIVI-Ames laboratory personnel tested pre- and post-vaccination aliquots for the IVP for virus titer in accordance with the PRRSv Titer Procedure (Appendix 1, Attachment 6).
Test Results:	Serial 390-005: Results were satisfactory (Appendix 4). IVP Lot N257-086: Mean titer of $1 \times 10^{3.82}$ $TCID_{50}$/mL (Appendix 7).
IVP Retention:	IVP was formulated for this study only and was not retained.

[0389] Table 7.4 CP

Generic Product Name:	Placebo
Formulation:	BIVI-Production produced lyophilized placebo product containing inert material comprised in the vaccine serial without PRRS 94881 MLV (Lot N240-191-062409, Appendix 6). On D0, BIVI-Ames reconstituted Lot N240-191-062409 with Phosphate buffered saline (PBS; Lot 809-003, Appendix 5) to formulate the CP, Lot No. 257-085. Transcribed formulation records for the CP are presented in Appendix 7 (original records available upon request).
Manufacturer:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506, USA
Lot Number:	N257-085
Expiry Date:	An expiration date of 22 Dec 09 was assigned to the CP for study purposes only.
Storage Conditions:	Lyophilized vaccine: 2-8 °C Rehydrated CP: 2-8 °C or on ice
Testing:	CP was tested by BIVI-QC for EP sterility in accordance with Special Outline No. 96 (Appendix 1, Attachment 5).
Test Results:	CP was determined to be sterile (Appendix 7).
CP Retention:	CP was formulated for this study only and was not retained.

[0390] Challenge Material

[0391] Table 7.5 Challenge Material

Name/number of isolate	PRRS isolate 205817
Location and date of isolation incl. clinical symptoms	The European PRRS virus isolate 205817 was derived from isolate 190136 originally obtained from lung tissue of a newborn piglet from a farm showing typical reproductive signs of PRRS (abortions in sows and weakness in newborn piglets) during an outbreak in Lower Saxony, Germany, in April 2004. The attending veterinarians submitted the lung samples to bioScreen (sample arrived on 21 April, 2004) for diagnostic testing. Isolate #190136 was directly propagated on MA 104 cells and a pure culture challenge stock was prepared for use in future BIVI clinical trials. A pure culture of isolate 190136 was used to inoculate pigs for evaluation of its ability to reproduce PRRS-specific respiratory disease in a controlled, laboratory trial. Challenged animals exhibited respiratory distress and revealed evidence of interstitial pneumonia upon histopathological examination. PRRS virus was successfully re-isolated from lung lesions was given the isolate designation 205817. Isolate 205817 was directly propagated on MA104 cells and a pure culture challenge stock was prepared for use in future BIVI clinical trials.
Formulation:	Challenge virus was thawed and diluted with MEM (Minimum Essential Medium) to a targeted titer of approximately 1 x 10^6 $TCID_{50}$/3 mL on D14. An adequate volume of challenge material was prepared. Two aliquots were removed from challenge material.
Lot Number:	N257-093
Manufacture:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. - USA
Storage conditions	Bulk challenge material was stored at -70 ± 10°C. Once prepared, diluted challenge material was maintained on ice until it was administered.
Testing:	At the start and end of the challenge procedure, BIVI-Ames was contacted. BIVI-Ames laboratory personnel tested pre- and post-challenge aliquots for virus titer in accordance with the PRRSv Titer Procedure
Test Results:	The challenge material had a mean titer of 1 x $10^{4.71}$ $TCID_{50}$/3 mL dose
Administration route	1.0 mL/nostril and 1.0 mL IM in the left neck (administered to all pigs in Groups 1 and 2 on D14).
Challenge material retention:	Challenge material was formulated for this study only and was not retained.

[0392] Treatments

[0393] Dosing Justification

[0394] The IVP was administered as a 1.0 mL dose to assigned pigs to evaluate OOI of PRRS 94881 MLV at 2 weeks post-vaccination. The CP was administered as a 1.0 mL dose to Groups 2 and 3 as a placebo vaccine.

[0395] Dosing Regimen

[0396] IVP or CP was administered to an assigned pig in the right neck region IM on D0 using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe and a sterile 20g x 1 inch (2.54 cm) or 18g x ¾ inch (1.91 cm) needle by a person not collecting study data. The dosing regimen is shown below in Table 7.6.

[0397] Table 7.6 Dosing Regimen

Group	Number	Treatment	Dose/Route	Study Day
1	20	IVP	1.0 mL IM	D0
2	20	CP	1.0 mL IM	D0
3	10	CP	1.0 mL IM	D0

[0398] Animal Information

[0399] Details of Study Animals

[0400] Table 7.7 Animal Information

Source:	Wilson Prairie View Farm N5627 Highway DD Burlington, WI 53105 USA		
Number of piglets:	50		
Arrival date:	Pigs arrived at the Veterinary Resources, Inc. (VRI) Cambridge facility on 21 December 2009 (D-1).		
Arrival treatment:	The 50 pigs assigned to the study were administered EXCEDE® at label dose IM in the right ham after arrival.		
Identification:	Individually ear tagged with unique number		
Species:	Porcine		
Breed:	Commercial crossbred		
Gender:	Mixed (females and castrated males)		
Age range:	11 to 17 days of age on D0		
Weight range:	3.2 to 5.5 to kg on D0		
Ownership of test animals:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.		
Physiological status:	On D-1, pigs selected for assignment to the study were observed by the Study Investigator and determined to be in good health and nutritional status. Observations were recorded on the Animal Health Examination Record form.		
Group – Pig Assignments	Group 1 (n=20): 55, 56, 60, 72, 75,	Group 2 (n=20): 57, 61, 62, 68, 78,	Group 3 (n=10): 51, 69, 80, 85, 104,

	76, 77, 83, 87, 91, 99, 102, 116, 117, 124, 141, 142, 144, 156 and 162	81, 86, 89, 97, 110, 129, 132, 135, 150, 152, 154, 160, 165, 167 and 168	105, 128, 131, 133 and 155

[0401] INCLUSION/EXCLUSION CRITERIA

[0402] All piglets enrolled in this study were PRRS ELISA negative and were healthy at the time of vaccination as determined by observation.

[0403] POST-INCLUSION REMOVAL CRITERIA

[0404] No pigs were removed from the study.

[0405] ANIMAL MANAGEMENT AND HOUSING

[0406] Animal Housing

[0407] Piglets were housed at Veterinary Resources, Inc. (VRI) in Cambridge, IA for the duration of the study. Groups 1, 2 and 3 were housed in uniform but separate rooms to ensure biosecurity. Piglets were housed in multiple pens (5 piglets/pen) within each room. Group 1 was housed in 4 pens in Room 5, Group 2 was housed in 4 pens in Room 6 and Group 3 was housed in 2 pens in Room 4. Pens consisted of plastic tubs on raised stands with plastic slatted flooring. Each pen contained a plastic 6-hole feeder and a nipple waterer. Each isolation room was constructed identical to the others and all are biohazard level 2 (BL2) compliant, hepafiltered, mechanically ventilated with thermostat regulated temperature control.

[0408] Treatment group isolation was necessary in this study as it is well known within the scientific community that PRRSv readily spreads from pig to pig via various mechanisms including aerosolization. This includes avirulent live PRRS vaccines as these biological products include attenuated virus particles that mimic the characteristics of virulent wild-type PRRS without the capability to cause disease. Proper methods were in place to ensure that biosecurity was maintained and that vaccinated animals did not accidentally cross-contaminate non-vaccinated, PRRSv naïve negative control animals. Appropriate measures were

taken by test facility staff to adequately clean and disinfect each room prior to its usage for this study.

[0409] Each room in the facility has fans and heaters to aid in sufficient air circulation and heating. The ventilation system is separate yet identical for each room, so air is not shared between rooms.

[0410] Solid feed was stored in bags, free from vermin. Water was *ad libitum*. Piglets were fed a commercial ration (Lean Metrics Infant, Purina Mills, St. Louis, MO) medicated with tiamulin (35 gm/ton) and chlortetracycline (400 gm/ton) *ad libitum* appropriate for their size, age, and condition; according to acceptable animal husbandry practices for the region.

[0411] The pigs were in good health and nutritional status before initiation of the study as determined by the Study Investigator.

[0412] During the study, select animals were observed with mild loss of body condition, rough haired appearance, swollen joints and varying degrees of lameness. The Study Investigator considered all of these to be non-specific conditions that commonly occur in groups of pigs housed in confinement. Coughing, sneezing, rapid respiration, dyspnea and mild to moderate lethargy were also noted in select pigs after challenge and were considered typical clinical signs associated with pneumonia, although non-specific for etiology. The Study Investigator determined that concomitant treatments were not required for any animals during this study.

[0413] All pigs assigned to this study were disposed of by commercial incineration after euthanasia and necropsy on D24. No food products from animals enrolled in this study entered the human food chain.

[0414] ASSESSMENT OF EFFICACY

[0415] To assess the OOI of PRRS 94881 MLV at 2 weeks post-vaccination, Groups 1 & 2 were challenged on D14 and lung lesions post-challenge were evaluated. An OOI of 2 weeks post-vaccination was achieved if Group 1 (minimum immunizing dose of PRRS 94881 MLV) demonstrated

significantly decreased ($p \leq 0.05$) lung pathology post-challenge compared with the challenge control group (Group 2).

[0416]

[0417] The secondary efficacy parameters analyzed between the vaccine group and the challenge control group included clinical assessments after vaccination, clinical observations after challenge, rectal temperatures, body weight and average daily weight gain (ADWG), assessment of PRRS antibodies and viremia in serum samples and quantitation of PRRS virus in lung samples collected at necropsy.

[0418] A negative control group (Group 3), which was not challenged, was included in the study to demonstrate the source herd was free of PRRS infection and that biosecurity was maintained throughout the study.

[0419] CRITERIA FOR A VALID TEST

[0420] Pre-purchase and D0 serum samples were all required to be negative for PRRS antibodies.

[0421] Serum samples collected from Groups 2 and 3 up to the day of challenge and from Group 3 until study completion had to be free of PRRS antibodies for the study to be valid.

[0422] PRIMARY OUTCOME PARAMETER

[0423] The primary efficacy variable for statistical evaluation was total lung lesion scores at D24 of the study.

[0424] Total Lung Lesion Scores

[0425] On Day 24 after data and samples were collected and recorded, all study pigs were euthanized following VRI SOP PRC1027 (Appendix 1, Attachment 8). Each pig was necropsied in accordance with VRI SOP PRC 1028 The thoracic cavity was exposed by a designee and the heart and lungs were removed. The Study Investigator examined each set of lungs, described any gross pathology noted and determined the % pathology for each lung lobe.

Observations and data were recorded on the Necropsy Report Record form. A total lung lesion score was determined for each pig by using the EP formula.

[0426] SUPPORTIVE PARAMETERs

[0427] Other parameters to be analyzed between Group 1 and Group 2 included clinical assessments post-vaccination, PRRS serology, viremia post-vaccination, clinical observations post-challenge, ADWG, rectal temperatures and lung virus quantitation post challenge. These parameters were analyzed as supportive parameters and did not serve as primary parameters to satisfy the study objective.

[0428] Clinical Assessment

[0429] All pigs were observed on the days outlined in Table 7,1 for clinical assessments post-vaccination by the Study Investigator or designees. Observations were recorded on the Clinical Assessment Record form.

[0430] PRRS Serology

[0431] Venous whole blood was collected on the days outlined in Table 3. Briefly, approximately 2-5 mL of blood was collected from each piglet into an appropriate sized serum separator tube (SST). Sample collections were recorded on the Sample Collection Record form. Blood in SSTs was allowed to clot at room temperature. Blood samples were delivered to BIVI-Ames on the day of collection and Specimen Delivery Record form was completed. BloodBlood samples were spun down by BIVI-Ames and serum was harvested, split and transferred to appropriate tubes. Each tube was labeled with the piglet's ID number, the study number, the date of collection, the study day and the sample type. At BIVI-Ames, one set of serum samples was held at 2-8 ºC and the other set of serum samples was held at -70 ± 10 °C.

[0432]

[0433] The serum samples collected days 0, 7, 14, 17, 21 and 24 and held at 2-8 ºC were tested by BIVI-Ames for PRRS antibodies. Results were reported as negative (ELISA S/P ratio of < 0.4) or positive (ELISA S/P ratio of ≥ 0.4).

[0434] PRRS Viremia

[0435] The other set of serum samples collected on days 0, 7, 14, 17, 21 and 24 and held at -70 ± 10 °C at BIVI-Ames until the in-life phase of the study was completed.

[0436] A completed Specimen Delivery Record form was included with the shipment. bioScreen tested serum samples for PRRSv RNA by qPCR. Results were reported as genome equivalent/mL (log GE/mL).

[0437] Clinical Observations Post-challenge

[0438] Piglets were observed for clinical signs of disease on the days outlined in Table 7.1. Observations were conducted by the Study Investigator or designees and were recorded on the Clinical Observation Record form. Piglets were observed each day for respiration, behavior and cough based on the clinical observation scoring system outlined below in Table 7.8.

[0439] Table 7.8 Clinical Observation Scoring System

Respiration	**Behavior**	**Cough**
0 = normal respiration 1 = panting/rapid respiration 2 = dyspnea 3 = dead	0 = normal 1 = mild to moderate lethargy 2 = severely lethargic or recumbent 3 = dead	0 = none 1 = soft or intermittent cough 2 = harsh or severe, repetitive cough 3 = dead

[0440] Average Daily Weight Gain (ADWG)

[0441] Individual body weights were collected on the days outlined in Table 3. Each pig was weighed on a calibrated scale by the Study Investigator or designees. Results were reported in kg on the Body Weight Record form. Average daily weight gain was determined from the D0 to D14 and from D14 to D24.

[0442] Rectal Temperatures

[0443] Rectal temperatures were collected by the Study Investigator or designees on the days outlined in Table 6.1. Rectal temperatures were recorded in ºC on the Clinical Observation Record form.

[0444] PRRS Virus Quantitation in Lung Tissue

[0445] For each set of lungs, two samples from the Left and Right Apical lobes, the Left and Right Cardiac lobes, the Left and Right Diaphragmatic lobes and the Intermediate lobe, were retained. Each lung sample was approximately 1 inch (2.54 cm) x 1 inch (2.54 cm). For one set of lung samples, all three samples from the left side were combined into one container; while all three samples from the right side and the Intermediate lung lobe sample were combined into another container. Each container was filled with a sufficient amount of 10% formalin solution. For the other set of lung samples, all three lung samples from the left side were combined into one Whirlpak®; while all three samples from the right side and the Intermediate lung lobe sample were combined into another Whirlpak®. All containers and Whirlpaks® were appropriately labeled with animal number, study number, date of collection, study day, sample type and whether the samples are from the left or right side. Lung samples in Whirlpaks® were stored on dry ice until transported to BIVI-Ames while samples in formalin were stored at room temperature. Sample collections were recorded on the Necropsy Report Record form. Formalin fixed lung tissue samples and Whirlpak® lung samples were transferred to BIVI-Ames. A completed Specimen Delivery Record form was included with each shipment.

[0446] A completed Specimen Delivery Record form was included with the shipment. bioScreen tested lung samples for PRRSv RNA by qPCR (Appendix 1, Attachment 7). Left lung tissues were homogenized and tested. Right lung tissues and intermediate lung lobe samples were homogenized and tested. Results were reported as genome equivalent (log GE/mL) for left and right lung samples.

[0447] ADVERSE EVENTS

[0448] No adverse events were reported during this study.

[0449] STATISTICAL METHODS

[0450] EXPERIMENTAL UNIT

[0451] Treatment groups had to be housed in separate rooms in this study to avoid transmission of PRRSv to non-vaccinated groups. Therefore, room was the experimental unit. However, for the purposes of this analysis, possible bias due to confounding "room" and "treatment" effects were ignored, and piglet was used as the experimental unit.

[0452] RANDOMIZATION

[0453] Fifty (50) piglets were blocked by weight (n=5 piglets/block). Each pig was assigned a random number using the random number function in Excel. Within each weight block, pigs were ranked in ascending numerical order of the assigned random number. The treatment groups were then assigned to pigs in this numerical order: the 2 lowest random numbers were assigned to Group 1, the next 2 numbers were assigned to Group 2 and the highest number was assigned to Group 3. Groups 1 & 2 each contained 20 pigs and Group 3 contained 10 pigs.

[0454] ANALYSIS

[0455] The statistical analyses and data summaries were conducted by Dr. rer. hort. Martin Vanselow, Biometrie & Statistik, Zum Siemenshop 21, 30539 Hannover, Germany, +49(0) 511 606 777 650, m.vanselow@t-online.de.

[0456] Data were analyzed assuming a completely random design structure. The statistical analyses were performed using SAS software release 8.2 (SAS, Cary, USA/North Carolina, SAS Institute Inc. All tests on differences were designed as two-sided tests at $\alpha = 5\%$.

[0457] Total Lung Lesion Scores

[0458] The total lung lesion score on the day of necropsy (D24) was measured as the percentage of lung involvement calculated according to the weighting formula recommended in the draft monograph Porcine Enzootic Pneumonia Vaccine (inactivated). This formula takes into account the relative weight of each of the seven lung lobes. The assessed percentage of lung lobe area with typical lesions was multiplied by the respective factor per lung lobe

giving the total weighted lung lesions score. The factors for the respective lung lobes are presented in Table 7.9.

[0459] Table 7.9 Factors for Calculating Lung Lesion Scores

Lung lobe	Factor
Left apical	0.05
Left cardiac	0.06
Left diaphragmatic	0.29
Right apical	0.11
Cardiac	0.10
Right diaphragmatic	0.34
Right accessory/intermediate	0.05

[0460] The treatment groups were compared on differences using the Wilcoxon Mann-Whitney test.

[0461] Clinical Assessment Post-vaccination

[0462] Frequency tables of animals with at least one positive finding between D1 and D12 were generated. Differences between treatment groups were tested by Fisher's exact test.

[0463] PRRS Serology

[0464] Frequency tables of positive ELISA results were generated. Differences between treatment groups were tested by Fisher's exact test.

[0465] PRRS Viremia

[0466] The viremia data were evaluated separately for each day of investigation. Additionally, for viral load the areas under the individual response curves between D14 and D24 (AUC D14-D24) and between D17 and D24 (AUC D17-D24) were analyzed.

[0467] The quantitative PCR data (PRRS viral load [$\log_{10}$ GE/mL]) were used for comparisons between the treatment groups by the Wilcoxon Mann-Whitney test. Prior to the calculations the analytical result 'not detected' was replaced by a $\log_{10}$ GE/mL value of 0.0 and 'positive' was replaced by 3.0. The

treatment groups were tested on differences using the Wilcoxon Mann-Whitney test.

[0468] Clinical Observations Post-challenge

[0469] Frequency tables of animals with at least one positive finding between D15 and D24 were generated. Differences between treatment groups were tested by Fisher's exact test.

[0470] The maximum scores and the mean scores per animal from D15 to D24 for respiration, behavior, coughing and for all three added together (total) were used for the statistical evaluation. Differences between treatment groups were tested by the Wilcoxon Mann-Whitney test.

[0471] Body Weight and Average Daily Weight Gain

[0472] Individual daily weight gains were calculated for the time periods between D0 and D14 and between D14 and D24. For each day of investigation and for each time period descriptive statistics were calculated. Differences between treatment groups were tested using analysis of variance and subsequent t-tests. Least squares means of the groups and differences between least squares means with 95% confidence intervals were calculated from the analysis of variance.

[0473] Rectal Temperatures

[0474] Differences between treatment groups with respect to the original temperature data were tested using analysis of variance and subsequent t-tests. Least squares means of the groups and differences between least squares means with 95% confidence intervals were calculated from the analysis of variance.

[0475] PRRS Virus Quantitation In Lung Tissues

[0476] The quantitative PCR data (PRRS viral load [$\log_{10}$ GE/mL]) from lungs collected on D24 were used for comparisons between the treatment groups by the Wilcoxon Mann-Whitney test. The average ($\log_{10}$ GE/mL) of the left and right lung qPCR results were used for the evaluation. Prior to the calculations the

analytical result 'not detected' was replaced by log_{10} GE/mL of 0.0 and 'positive' was replaced by 3.0.

[0477] Frequency tables of positive qPCR results were generated. Differences between treatment groups were tested by Fisher's exact test.

[0478] RESULTS

[0479] Total Lung lesion Scores

[0480] A summary of the group total lung lesion scores and the associated p-value is shown below in Table 7.10.

[0481] Table 7.10 Total Lung Lesion Scores (%)

Group[1]	N	Min.	Max.	Median	95 % CI		QRange	Mean	p value
1	20	0.06	59.30	27.550	12.270	40.600	29.515	27.368	**0.0002**
2	20	13.86	91.60	55.200	47.300	66.500	21.850	54.841	
3	10	0.00	0.06	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	NI

[0482] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine at MID, challenged; Group 2 = placebo-treated, challenged; Group 3 = placebo-treated, not challenged. NI = Not included in statistical analysis.

[0483] Mean piglet D24 total lung lesion scores were 27.368% and 54.841% for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and challenge controls, respectively. The lesion score for the PRRS-vaccinated pigs was significantly lower than the mean lesion score for the challenge controls (**p=0.0002**).

[0484] PRRS Viremia

[0485] A summary of the PRRSv RNA detected in serum by qPCR data is shown below in Table 7.11.

[0486] Table 7.11 PRRSv RNA Detected by qPCR in Serum (log_{10} GE/mL) by Day

Day	Group[1]	N	Min.	Max.	Median	95 % CI		QRange	Mean	p value
7	1	20	0.00	5.34	3.00	3.00	3.79	0.82	3.17	**<0.0001**
	2	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	3	10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
14	1	20	0.00	4.29	3.32	3.00	3.77	0.84	3.30	**<0.0001**
	2	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	3	10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
17	1	20	5.54	8.07	6.72	6.47	7.08	0.80	6.78	**<0.0001**
	2	20	6.44	9.02	8.18	7.47	8.47	1.09	8.00	
	3	10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
21	1	20	6.18	8.73	7.38	7.13	8.08	0.98	7.51	0.0565
	2	20	7.22	8.86	7.87	7.62	8.11	0.57	7.88	
	3	10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
24	1	20	5.82	8.54	7.15	6.73	7.84	1.16	7.26	0.6251
	2	20	6.53	8.29	7.27	6.97	7.60	0.67	7.34	
	3	10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
AUC 14-24	1	20	56.95	78.02	65.10	60.39	70.05	9.76	65.84	0.4945
	2	20	58.74	74.30	67.02	64.38	68.24	4.83	66.61	
	3	10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
AUC 17-24	1	20	42.98	59.51	49.52	47.46	54.30	7.14	50.72	**0.0039**
	2	20	49.08	60.99	54.35	52.93	55.38	3.63	54.61	
	3	10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI

[0487] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine at MID, challenged; Group 2 = placebo-treated, challenged; Group 3 = placebo-treated, not challenged. NI = Not included in statistical analysis. AUC = Area under the curve; GE/ml per day

[0488] PRRSv RNA was not detected in the serum of any piglets on D0. PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs had mean values of 3.17 and 3.30 $\log_{10}$ GE/mL on D7 and D14, respectively. The values were significantly higher than challenge controls on both of these days (**p<0.0001**), as challenge controls did not have any PRRSv RNA detected until D17. On that day, mean values were 6.78 and 8.00 $\log_{10}$ GE/mL for PRRS 94881 MLV-vaccinated piglets and challenge controls, respectively. The D17 value for challenge controls was significantly higher than the PRRS 94881 MLV-vaccinated piglets (**p<0.0001**). Mean values for PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs on D21 and D24 were 7.51 and 7.26 $\log_{10}$ GE/mL on

D21 and D24 respectively, compared to 7.88 and 7.34 log_{10} GE/mL for challenge controls on the same days. There were no significant differences between PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs on D21 or 24 ($p \geq 0.0565$). No PRRSv RNA was detected in serum from any negative control pig during this study.

[0489] There were no differences between the AUC 14-24 for PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs and challenge controls pigs (65.84 and 66.61, respectively; p=0.4945). PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs had a significantly lower AUC for D17-D24 compared to challenge controls (50.72 and 54.61, respectively; **p=0.0039**).

[0490] PRRS Virus Quantitation In Lung Tissues

[0491] Individual PRRSv qPCR results from lung tissues collected at necropsy on D24 are presented in Addendum 1, Table 30. A summary of the PRRSv RNA detected in lung tissues by qPCR data is shown below presented in Table 7.12 and a summary of the frequency of animals with positive qPCR at necropsy is shown below in Table 7.13.

[0492] Table 7.12 Lung Viruse Isolation, qPCR (mean log10 GE/mL) at Necropsy (D24)

Group[1]	N	Min.	Max.	Median	95 % CI		QRange	Mean	p value
1	20	6.63	8.26	7.46	7.07	7.86	0.84	7.47	**0.0101**
2	20	6.55	8.67	7.99	7.69	8.14	0.54	7.88	
3	10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI

[0493] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine at MID, challenged; Group 2 = placebo-treated, challenged; Group 3 = placebo-treated, not challenged. NA = Not applicable because of lack of variability. NI = Not included in statistical analysis.

[0494] Table 7.13 Frequency of Animals with Posible PRRSv RNA aPCR from Lung Tissues Collected at Necropsy (D24)

Day	Group	N	%	95 % CI		Total	P
24	1	20	100	83.2	100.0	20	NA
	2	20	100	83.2	100.0	20	
	3	0	0	0.0	30.8	10	NI

[0495] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine at MID, challenged; Group 2 = placebo-treated, challenged; Group 3 = placebo-treated, not challenged. NA = Not applicable because of lack of variability. NI = Not included in statistical analysis.

[0496] PRRSv RNA was detected in the lung tissues of all piglets in both the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and all piglets in the challenge control group. There was no difference between these groups. PRRSv RNA was not detected in the lung samples of any negative control piglets.

[0497] Clinical Observations Post-challenge

[0498] The frequency of piglets with at least one positive clinical assessment score in the post-challenge period (D15-D24) is shown below in Table 7.14.

[0499] Table 7.14 Frequency of Piglets with a Positive Clinical Observation Post Challenge (D15-D24)

Parameter	Group[1]	N positive	% positive	95 % CI		Total	p value
Respiration	1	2	10	1.2	31.7	20	0.2351
	2	6	30	11.9	54.3	20	
	3	0	0	0.0	30.8	10	NI
Behaviour	1	0	0	0.0	16.8	20	**0.0012**
	2	9	45	23.1	68.5	20	
	3	0	0	0.0	30.8	10	NI
Coughing	1	6	30	11.9	54.3	20	0.2003
	2	11	55	31.5	76.9	20	
	3	0	0	0.0	30.8	10	NI
Total	1	6	30	11.9	54.3	20	0.0562
	2	13	65	40.8	84.6	20	
	3	0	0	0.0	30.8	10	NI

[0500] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine at MID, challenged; Group 2 = placebo-treated, challenged; Group 3 = placebo-treated, not challenged. NI = Not included in statistical analysis.

[0501] Abnormal respiration was observed in both the PRRS 94881 MLV-vaccinated group (10%) and in the challenge control group (30%), however, these values were not significantly different (p=0.2351).

[0502] Abnormal behavior was only observed in the challenge control group (45%), and not in the PRRS 94881 MLV-vaccinated group (0%). The PRRS 94881 MLV-vaccinated group had a significantly lower incidence of abnormal behavior than the challenge controls (**p=0.0012**).

[0503] Coughing was observed in both the PRRS 94881 MLV-vaccinated group (30%) and in the challenge control group (55%). These values were not significantly different (p=0.2003).

[0504] The percentages of piglets with total clinical scores > 0 were 30% and 65% for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group, respectively. These values were not significantly different (p=0.0562).

[0505] No clinical signs were observed in the negative control group at any time after challenge.

[0506] A summary of the group maximum clinical observation scores for the post-challenge period (D15 through D24) is shown below in Table 7.15.

[0507] Table 7.15 Post-Challenge Maximum Clinical Scores, D15 through D24

Parameter	Group[1]	N	Min.	Max.	Median	95 % CI		QRange	Mean	p value
Respiration	1	20	0	1	0	0	0	0	0.1	0.1872
	2	20	0	2	0	0	1	1	0.4	
	3	10	0	0	0	0	0	0	0.0	NI
Behaviour	1	20	0	0	0	0	0	0	0.0	**0.0012**
	2	20	0	1	0	0	1	1	0.5	
	3	10	0	0	0	0	0	0	0.0	NI
Coughing	1	20	0	1	0	0	1	1	0.3	0.1129
	2	20	0	2	1	0	1	1	0.7	
	3	10	0	0	0	0	0	0	0.0	NI
Total	1	20	0	1	0	0	1	1	0.3	**0.0072**
	2	20	0	4	1	0	2	2	1.2	
	3	10	0	0	0	0	0	0	0.0	NI

[0508] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine at MID, challenged; Group 2 = placebo-treated, challenged; Group 3 = placebo-treated, not challenged. NI = Not included in statistical analysis.

[0509] Abnormal respiration was observed in both the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge controls after challenge administration, with maximum scores of 1 (panting/rapid respiration) and 2 (dyspnea), respectively. There was no significant difference between these respiration scores (**p=0.1872**). The median maximum respiration score was 0 for both groups.

[0510] No abnormal behavior was observed in the PRRS 94881 MLV-vaccinated group in the post-challenge period (maximum score = 0). In contrast, the challenge control group had a maximum behavior score of 1 (mild to moderate lethargy; p=0.0012) although the median score for this group was 0. The maximum score for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group was significantly lower than the score for the challenge control group (**p=0.0012**). Median maximum behavior scores were 0 for both groups.

[0511] Coughing was observed in both the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and in the challenge control group after challenge. Maximum scores were 1 (soft or intermittent cough) and 2 (harsh or severe, repetitive cough), and median scores were 0 and 1, for PRRS 94881 MLV-vaccinated and challenge controls, respectively. There were no significant differences between these groups (**p=0.1129**). Median maximum coughing scores were 0 and 1 for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and challenge control group, respectively.

[0512] Maximum total scores were 1 and 4 and median total scores were 0 and 1 for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group, respectively. The maximum score for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group was significantly lower than the score for the challenge control group (**p=0.0072**). Median total scores were 0 and 1 for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and challenge control group, respectively.

[0513] No clinical signs were observed from D15 through D24 in the non-challenged negative control group during this study. This group had a maximum score of 0 for each parameter.

[0514] A summary of the group mean clinical observation scores for the post-challenge period (D15 through D24) is shown below in Table 7.16.

[0515] Table 7.16 Post-Challenge Mean Clinical Scores, D15 through D24

Parameter	Group[1]	N	Min.	Max.	Median	95 % CI		QRange	Mean	p value
Respiration	1	20	0.0	0.2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.1394
	2	20	0.0	0.6	0.00	0.00	0.10	0.10	0.07	
	3	10	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
Behaviour	1	20	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	**0.0012**
	2	20	0.0	0.8	0.00	0.00	0.10	0.10	0.12	
	3	10	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
Coughing	1	20	0.0	0.4	0.00	0.00	0.10	0.10	0.07	0.0835
	2	20	0.0	0.7	0.10	0.00	0.30	0.35	0.17	
	3	10	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
Total	1	20	0.0	0.4	0.00	0.00	0.10	0.15	0.08	**0.0103**
	2	20	0.0	1.4	0.25	0.00	0.40	0.50	0.35	
	3	10	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI

[0516] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine at MID, challenged; Group 2 = placebo-treated, challenged; Group 3 = placebo-treated, not challenged. NI = Not included in statistical analysis

[0517] Mean clinical observation scores followed a pattern similar to maximum clinical scores with significant differences only observed between the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group for mean behavior score (**p=0.0012**) and mean total score (**p=0.0103**).

[0518] Mean respiration scores were 0.02 and 0.07 for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group, respectively. Mean behavior scores were 0.00 and 0.12 for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group, respectively. Mean coughing scores were 0.07 and 0.17 for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group, respectively. Mean total scores were 0.08 and 0.35 for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and challenge control group, respectively.

[0519] No clinical signs were observed from D15 through D24 in the non-challenged negative controls during this study. This group had a mean score of 0 for each parameter.

[0520] Body Weight and Average Daily Weight Gain

[0521] A summary of the body weights on D0, D14 and D24 and ADWG for D0 to D14 and D14 to D24 are shown below in Table 7.17.

[0522] Table 7.17 Body Weight and Average Daily Weight Gain (kg and kg/d)

Day(s)	Group[1]	N	Min.	Max.	Median	Mean	SD
0	1	20	3.3	5.5	3.95	4.14	0.589
	2	20	3.2	5.2	4.05	4.17	0.603
	3	10	3.4	5.1	4.00	4.07	0.556
14	1	20	5.6	9.4	7.60	7.64	1.029
	2	20	6.0	8.9	7.30	7.39	0.909
	3	10	5.5	9.3	6.95	7.22	1.187
24	1	20	7.0	13.9	10.40	10.26	1.693
	2	20	6.4	10.9	8.80	8.87	1.328
	3	10	6.8	12.9	10.90	10.64	1.807
ADWG 0 – 14	1	20	0.164	0.343	0.2571	0.2500	0.05254
	2	20	0.179	0.307	0.2357	0.2304	0.03939
	3	10	0.150	0.307	0.2071	0.2250	0.04906
ADWG 14 – 24	1	20	0.090	0.460	0.2600	0.2620	0.08907
	2	20	-0.060	0.290	0.1600	0.1475	0.09060
	3	10	0.130	0.440	0.3700	0.3420	0.10130

[0523] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine at MID, challenged; Group 2 = placebo-treated, challenged; Group 3 = placebo-treated, not challenged.

[0524] Mean body weights on D0 were 4.1 and 4.2 kg for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group, respectively. By D14, mean body weights were 7.6 and 7.4 kg for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group, respectively. On D24, mean body weights were 10.3 and 8.9 kg for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group, respectively. Average daily weight gains (ADWG) for the vaccination period (D0 to D14) were 0.25 and 0.23 kg/d for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group, respectively. ADWGs for the challenge period (D14 to D24) were 0.26 and 0.15 kg/d for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and challenge control group, respectively. ADWGs for the negative controls were 0.23 and 0.34 kg/d for D0-D14 and D14-D24, respectively.

[0525] Negative control piglets had mean body weights of 4.1, 7.2 and 10.6 kg on D0, D14 and D28, respectively.

[0526] A summary of the LS Mean and statistical analysis of body weights and ADWG for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group is shown below in Table 7.18.

[0527] Table 7.18 LS Mean Body Weight and Daily Gain (kg)

Day(s)	Group[1]	LS Mean	95% confidence interval		p value
0	1	4.14	3.865	4.405	0.8743
	2	4.17	3.895	4.435	
	Diff. 1-2	-0.03	-0.411	0.351	
14	1	7.64	7.196	8.074	0.4297
	2	7.39	6.951	7.829	
	Diff. 1-2	0.25	-0.376	0.866	
24	1	10.26	9.566	10.944	**0.0063**
	2	8.87	8.176	9.554	
	Diff. 1-2	1.39	0.416	2.364	
ADWG 0 – 14	1	0.2500	0.22898	0.27102	0.1889
	2	0.2304	0.20934	0.25138	
	Diff. 1-2	0.0196	-0.01008	0.04937	
ADWG 14 – 24	1	0.2620	0.22133	0.30267	**0.0003**
	2	0.1475	0.10683	0.18817	
	Diff. 1-2	0.1145	0.05699	0.17201	

[0528] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine at MID, challenged; Group 2 = placebo-treated, challenged.

[0529] Day 0 LS Mean body weights were 4.14 and 4.17 kg for the PRRS 94881 MLV-vaccinated piglets and the challenge control group, respectively. The difference was -0.03 kg, which was not significantly different (p=0.8743). On D14, LS Mean body weights were 7.64 and 7.39 kg for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group, respectively. The difference was 0.25 kg, which was also not significantly different (p=0.4297). On D24, the LS Mean body weights were 10.26 and 8.87 for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group, respectively. The difference on this day

was 1.39 kg, and the vaccinated group weight was significantly higher than the challenge control group (**p=0.0063**).

[0530] LS Mean ADWGs for the vaccination period (D0-D14) were 0.25 and 0.23 kg/d for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group, respectively. These values were not significantly different (p=0.1889). LS Mean ADWGs during the post-challenge period (D14-D24) were 0.26 and 0.15 for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group, respectively. The ADWG for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group was significantly higher than the ADWG for the challenge control group (**p=0.0003**).

[0531] Rectal Temperatures

[0532] A summary of rectal temperatures is shown below in Tables 7.19 and 7.20. A summary of the LS Mean and statistical analysis of rectal temperature for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group is shown below in Tables 7.21 and 7.22.

[0533] Table 7.19 Rectal Temperature (ºC) Day 13-22

Day	Group[1]	N	Min.	Max.	Median	Mean	SD
13	1	20	39.3	40.3	39.80	39.77	0.247
	2	20	38.9	40.0	39.35	39.39	0.292
	3	10	39.0	39.7	39.15	39.26	0.267
14	1	20	39.4	40.2	39.75	39.76	0.226
	2	20	39.0	39.8	39.40	39.37	0.220
	3	10	39.1	40.3	39.40	39.51	0.375
15	1	20	39.3	40.4	39.65	39.69	0.258
	2	20	39.4	41.1	39.70	39.90	0.538
	3	10	39.1	40.3	39.40	39.52	0.371
16	1	20	39.9	41.3	40.80	40.68	0.417
	2	20	39.3	40.3	39.75	39.77	0.279
	3	10	39.1	39.9	39.45	39.46	0.263
17	1	20	39.2	40.6	39.80	39.89	0.363
	2	20	39.4	40.6	39.85	39.90	0.285
	3	10	39.2	40.0	39.50	39.53	0.226
18	1	20	39.3	41.0	39.95	39.99	0.492
	2	20	39.5	41.2	40.20	40.29	0.472
	3	10	38.9	39.7	39.30	39.30	0.211
19	1	20	39.7	41.6	40.35	40.40	0.464
	2	20	39.5	41.1	40.65	40.55	0.451
	3	10	39.0	39.6	39.20	39.22	0.199
20	1	20	39.7	41.5	40.50	40.52	0.449
	2	20	39.5	41.5	40.65	40.61	0.531
	3	10	39.1	40.1	39.40	39.49	0.281
21	1	20	39.6	41.1	40.30	40.22	0.413
	2	20	39.4	41.0	40.10	40.12	0.371
	3	10	39.2	40.2	39.45	39.59	0.351
22	1	20	39.8	41.0	40.20	40.34	0.391
	2	20	39.6	41.2	40.30	40.41	0.437
	3	10	39.0	40.0	39.40	39.45	0.276

[0534] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine at MID, challenged; Group 2 = placebo-treated, challenged; Group 3 = placebo-treated, not challenged.

[0535] Table 7.20 Rectal Temperature (ºC) Day 23-24

Day	Group[1]	N	Min.	Max.	Median	Mean	SD
23	1	20	39.6	41.2	40.25	40.36	0.454
	2	20	39.5	41.6	40.60	40.60	0.482
	3	10	39.3	40.1	39.70	39.68	0.290
24	1	20	39.8	41.3	40.30	40.39	0.421
	2	20	39.7	41.6	40.30	40.50	0.531
	3	10	39.1	40.2	39.60	39.66	0.389

[0536] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine at MID, challenged; Group 2 = placebo-treated, challenged; Group 3 = placebo-treated, not challenged

[0537] Table 7.21 LS Mean Rectal Temperature (ºC) Day 13 – 20

Day	Group[1]	LSMean	95 % confidence interval		p value
13	1	39.77	39.648	39.892	**<0.0001**
	2	39.39	39.268	39.512	
	Diff. 1-2	0.38	0.207	0.553	
14	1	39.76	39.654	39.856	**<0.0001**
	2	39.37	39.269	39.471	
	Diff. 1-2	0.39	0.242	0.528	
15	1	39.69	39.494	39.876	0.1241
	2	39.90	39.704	40.086	
	Diff. 1-2	-0.21	-0.480	0.060	
16	1	40.68	40.514	40.836	**<0.0001**
	2	39.77	39.609	39.931	
	Diff. 1-2	0.91	0.678	1.132	
17	1	39.89	39.737	40.033	0.8852
	2	39.90	39.752	40.048	
	Diff. 1-2	-0.02	-0.224	0.194	
18	1	39.99	39.767	40.203	0.0528
	2	40.29	40.072	40.508	
	Diff. 1-2	-0.31	-0.614	0.004	
19	1	40.40	40.188	40.602	0.3065
	2	40.55	40.338	40.752	
	Diff. 1-2	-0.15	-0.443	0.143	
20	1	40.52	40.293	40.737	0.5659
	2	40.61	40.383	40.827	
	Diff. 1-2	-0.09	-0.405	0.225	

[0538] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine at MID, challenged; Group 2 = placebo-treated, challenged; Group 3 = placebo-treated, not challenged

[0539] Table 7.22 LS Mean Rectal Temperature (ºC) Day 21 – 24

Day	Group[1]	LSMean	95 % confidence interval		p value
21	1	40.22	40.037	40.393	0.4489
	2	40.12	39.942	40.298	
	Diff. 1-2	0.10	-0.156	0.346	
22	1	40.34	40.152	40.528	0.6231
	2	40.41	40.217	40.593	
	Diff. 1-2	-0.07	-0.331	0.201	
23	1	40.36	40.143	40.567	0.1062
	2	40.60	40.388	40.812	
	Diff. 1-2	-0.25	-0.545	0.055	
24	1	40.39	40.168	40.602	0.4526
	2	40.50	40.283	40.717	
	Diff. 1-2	-0.12	-0.422	0.192	

[0540] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine at MID, challenged; Group 2= placebo-treated, challenged; Group 3 = placebo-treated, not challenged

[0541] Mean and LS Mean rectal temperature for the PRRS 94881 MLV-vaccinated piglets were 39.77 ºC on the day before challenge, and ranged from 39.69 ºC (D15) to 40.68 ºC (D16) after challenge. Mean and LS Mean rectal temperature for the challenge controls were 39.39 ºC on the day before challenge and ranged from 39.77 ºC (D16) to 40.61ºC (D20) after challenge. Least square Means rectal temperatures were significantly lower for challenge controls compared to PPRS 94881 MLV-vaccinated piglets before challenge administration (D13 and D14) and on D16 after challenge (**p<0.0001**). There were no other significant differences in rectal temperatures between PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs and challenge controls in this study (p≥0.0528). Mean and LS Mean rectal temperatures for the negative controls remained ≤ 39.68 ºC throughout the study.

[0542] Clinical Assessment Post-vaccination

[0543] A summary of the percentage of piglet with at least one positive assessment from D1 through D12 is shown below in Table 7.23.

[0544] Table 7.23 Percentage of Piglets With at Least One Positive Clinical Assessments from D1-D12

Group[1]	N positive	% positive	95 % CI		Total	p value
1	0	0	0.0	16.8	20	1.0000
2	1	5	0.1	24.9	20	
3	0	0	0.0	30.8	10	NI

[0545] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine at MID, challenged; Group 2 = placebo-treated, challenged; Group 3 = placebo-treated, not challenged. NI = Not included in statistical analysis.

[0546] No piglets in either the PRRS 94881 MLV-vaccinated group or the negative controls had any clinical assessment findings during the vaccination period D-1 through D12. Piglet 110 in challenge control group was observed with a sore behind the right front leg beginning on D9. There was no significant difference between PRRS 94881 MLV-vaccinated piglets and challenge controls for this parameter (p=1.0000).

[0547] PRRS Serology

[0548] A summary of the frequency of piglets with positive PRRS-antibody titers is shown below in Table 7.24.

[0549] Table 7.24 Frequency of Piglets with Positive PRRS-Antibody Titer by Dav

Day	Group[1]	N positive	% positive	95 % CI		Total	p value
7	1	0	0	0.0	16.8	20	NA
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	30.8	10	NI
14	1	17	85	62.1	96.8	20	**<0.0001**
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	30.8	10	NI
17	1	19	95	75.1	99.9	20	**<0.0001**
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	30.8	10	NI
21	1	20	100	83.2	100.0	20	**0.0012**
	2	11	55	31.5	76.9	20	
	3	0	0	0.0	30.8	10	NI
24	1	20	100	83.2	100.0	20	1.0000
	2	19	95	75.1	99.9	20	
	3	0	0	0.0	30.8	10	NI

[0550] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine at MID, challenged; Group 2 = placebo-treated, challenged; Group 3 = placebo-treated, not challenged. NA = Not applicable, no analysis conducted. NI = Not included in statistical analysis.

[0551] All piglets in all treatment groups were PRRS-antibody negative on D0 and D7. By D14, 85% of the PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs had positive PRRS antibody titers. This number increased to 95% on D17 and was 100% on both D21 and D24. No pigs in the challenge control group developed positive PRRS-antibody titers until D21 (7 days after challenge administration) when 55% of the pigs had positive titers. This value increased to 95% by D24. On D14, D17 and D21, the PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs had a significantly higher proportion of pigs with positive PRRS antibody titers compared to the challenge control group (**$p \leq 0.0012$**). No pigs in the negative control group developed PRRS antibody titers during this study.

[0552] DISCUSSION/CONCLUSION

[0553] To achieve the study objective, three groups were included in the study design on D0: a vaccine group that received 1 x $10^{3.82}$ $TCID_{50}$ of PRRS 94881 MLV (Group 1); a challenge control group that received control product (Group 2) and a negative control group (Group 3) that also received control product.

[0554] Twenty (20) healthy, PRRS susceptible and seronegative piglets were inoculated IM with 1 ml of PRRS 94881 MLV at approximately 14 days of age. Thirty (20 piglets – challenge control group and 10 piglets – negative control group) PRRS susceptible and seronegative piglets were inoculated IM with 1 ml of control product at approximately 14 days of age.

[0555] To determine if an onset of immunity of 2 weeks for PRRS 94881 MLV was achieved, the vaccine group and the challenge control group were challenged 14 days post-vaccination with a heterologous European isolate of PRRSv (isolate 205817) and evaluated post-challenge for relevant reduction in lung lesions.

[0556] Validation of the study (Negative Control Group 3)

[0557] To ensure that source piglets were free of PRRSv and that no extraneous PRRSv exposure or cross-contamination among treatment and control groups occurred during the study, a negative control group (Group 3) was included in the study design. Piglets in the negative control group were negative for PRRSv (viremia; qPCR) as well as for PRRS antibodies throughout the study, thus validating this trial.

[0558] Validation of the challenge model (Challenge Control Group 2)

[0559] A challenge model that induces sufficient PRRS clinical disease is necessary to adequately evaluate PRRS vaccine onset of immunity in a laboratory setting. Following inoculation with European PRRS isolate 205817 by the method described earlier, the challenge control group exhibited a mean rectal temperature of ≥ 40.50 °C on D19, D20 D23 and D24 (≤ 39.68 °C on same days, negative control group), a mean ADWG of 0.15 kg/day compared with a mean ADWG of

0.34 kg/day for the negative control group from D14 to D24, abnormal behavior, coughing, and a median lung lesion score of 55.2% (0.00%; negative control group). These results highlight that severe PRRS-specific clinical disease was induced in the challenge control group even though the challenge virus titer was slightly lower than the targeted dose, thus validating this challenge model as an adequate clinical laboratory tool to evaluate PRRS vaccine efficacy and more specifically, the OOI of PRRS 94881 MLV.

[0560] Determination of two week onset of immunity of PRRS 94881 MLV (Group 1)

[0561] Determination of an onset of immunity (OOI) for PRRS 94881 MLV of 2 weeks post-vaccination was based upon the vaccine group exhibiting a significant ($p \leq 0.05$) reduction in post-challenge lung lesions compared with the challenge control group.

[0562] Lung lesions were selected as the primary parameter for determination of 2 week OOI because this parameter provides the most clinically relevant and convincing evidence of efficacy when evaluating a new vaccine within the PRRS respiratory challenge model in pigs. Lung lesion development is one of the hallmarks of PRRS respiratory disease in pigs. Lung lesions are often accompanied by subsequent manifestations of secondary PRRSv disease characteristics such as clinical signs, pyrexia, decreased ADWG, etc.

[0563] The PRRS 94881 MLV-vaccinated group exhibited a significant reduction in gross lung pathology post-challenge, as evidenced by median total lung lesion score of 27.6% in comparison to the challenge control group, which exhibited a median total lung lesion score of 55.2% (**p=0.0002**). Thus, an OOI of 2 weeks for PRRS 94881 MLV at dosage of $1 \times 10^{3.82}$ $TCID_{50}$ was established based upon the primary parameter of a significant reduction for lung lesions post-challenge. This result was achieved with a vaccine dose slightly lower than the minimum immunizing dose of $1 \times 10^{4.5}$ $TCID_{50}$/dose.

[0564] Viremia post-challenge was selected as the most important secondary parameter because it represents the level of viral replication and persistence occurring within the host animal upon exposure. A significant ($p \leq 0.05$) reduction in viremia would correspond with a PRRS vaccine that induces adequate immunity to limit PRRS pathogenesis within the host. At 3 days post-challenge (D17), PRRS 94881 MLV-vaccinated group was associated with a significant reduction in median viremia (qPCR) compared with the challenge control group (6.72 GE/mL vs. 8.18 GE/mL; **$p \leq 0.0001$**). To further evaluate viremia post-challenge between groups, the quantity of the viral load over a specific duration of time post challenge was calculated, as represented as "area under curve" or AUC. The PRRS 94881 MLV-vaccinated group had a median AUC value from D17 to D24 of 49.52 GE/mL/day; while the challenge control group had a median AUC value of 54.35 GE/ml/day. The median AUC value was significantly lower for the vaccine group compared with the challenge control group from D17 to D24 (**$p=0.0039$**). Whether viremia was examined 3 days post-challenge or over the course of the post-challenge period, PRRS 94881 MLV administered 2 weeks prior to challenge with a virulent heterologous European strain of PRRS significantly ($p \leq 0.05$) reduced viremia after challenge inoculation.

[0565] In association with a reduction of PRRS viremia post-challenge, a significant ($p \leq 0.05$) reduction in the viral load in lung tissue would also be of great importance from the standpoint of PRRS vaccine immunity. A reduction of viral load in the lung tissue maybe associated with reduced viral stability, replication and persistence within the host and may secondarily lead to reduced shedding of PRRSv to other pigs. In this study, lung tissues from PRRS 94881 MLV-vaccinated group had a median lung qPCR result of 7.46 $\log_{10}$ GE/mL 10 days post challenge (D24) while the challenge control group had a median lung qPCR result of 7.88 $\log_{10}$ GE/mL. The difference between the vaccine group and the challenge control group was significant (**$p=0.0101$**), thus further supporting an OOI of 2 weeks.

[0566] A marked reduction in severity and frequency of clinical signs post-challenge in piglets would also be supportive of PRRS vaccine efficacy and establishment of an OOI of 2 weeks for PRRS 94881 MLV. Abnormal respiration of sufficient severity and frequency was not noted in either group post-challenge and no differences were detected ($p \geq 0.1394$). Conversely, the severity and frequency of coughing was about equal between groups and no differences were detected ($p \geq 0.0835$). Differences were detected between groups for severity and frequency of abnormal behavior (lethargy) post-challenge. Zero of 20 (0%) and 9 of 20 (45%), PRRS 94881 MLV-vaccinated and challenge control piglets, respectively, exhibited abnormal behavior for at least one day post-challenge (**$p=0.0012$**). Likewise, the PRRS 94881 MLV-vaccinated group exhibited lower maximum abnormal clinical scores and mean abnormal clinical post-challenge compared with the challenge control group (**$p=0.0012$**). Total clinical scores (summation of respiration, behavior and coughing scores) were significantly different between groups when maximum scores and mean scores from D15 to D24 were analyzed. Due to the influence of abnormal behavior scores on total scores, the PRRS 94881 MLV-vaccinated group had a significantly lower maximum total score and lower mean total score compared with the challenge control group (**$p \leq 0.0103$**). The differences between groups for severity and frequency of abnormal behavior further support an OOI of 2 weeks post-vaccination.

[0567] Pre-challenge, the PRRS 94881 MLV-vaccinated group had slightly higher mean rectal temperatures compared with the challenge control group on D13 (39.77 ºC vs. 39.39 ºC, respectively; **$p<0.0001$**) and on D14 (39.76 ºC vs. 39.37 ºC, respectively; **$p<0.0001$**). Although significant ($p \leq 0.05$) differences were detected between groups pre-challenge, these differences were not biologically relevant. Post-challenge, the only day in which a significant ($p \leq 0.05$) difference was detected between groups for mean rectal temperature was on D16 (2 days post-challenge). On D16, vaccinated and challenge control groups had mean rectal temperatures of 40.68 ºC and 39.77 ºC, respectively, and difference between groups was significant (**$p<0.0001$**). The mean rectal temperature 4-5

days post challenge elevated above 40°C and remained above 40°C until the end of the study for both groups.

[0568] The presence of significant abnormal behavior, viremia, lung pathology and viral load in lung tissues due to PRRS in the challenge control group resulted in significant ($p \leq 0.05$) differences between groups for ADWG post-challenge. In this study, the vaccinated and challenge control groups had mean ADWG from D14 to D24 of 0.3 kg/day and 0.1 kg/day, respectively, and the difference between groups was significant (**p=0.0003**). A significant ($p \leq 0.05$) difference between groups for ADWG post-challenge further supports the establishment of an OOI of 2 weeks post-vaccination.

[0569] Post-Vaccination Parameters Examined In This Study

[0570] No abnormal clinical assessments related to PRRS 94881 MLV vaccination or control product were observed in piglets following inoculation on D0. One-challenge control piglet exhibited a sore behind the right front leg beginning on D9 which appeared not to be associated with administration of the control product.

[0571] All piglets were PRRS ELISA serology negative on D0, thus confirming that all piglets met the inclusion criterion of being PRRS negative upon entry into the study. The majority of piglets receiving PRRS 94881 MLV PRRS sero-converted by D14 and all PRRS-vaccinated piglets were seropositive by 7 days post-challenge (D21). Conversely, the challenge control remained seronegative until 7 days post-challenge, when this group began to demonstrate PRRS seroconversion. The negative control group remained PRRS seronegative throughout the entire study.

[0572] At 7 and 14 days post-vaccination, the PRRS 94881 MLV-vaccinated group exhibited mean qPCR results of 3.17 and 3.30, $\log_{10}$ GE/mL, respectively. These results highlight that within 2 weeks post-vaccination, a dosage of $1 \times 10^{3.82}$ $TCID_{50}$ of PRRS 94881 MLV induced sufficient replication of the MLV that is often required to build protective immunity already at 2 weeks after vaccination.

Conversely, the challenge control group and the negative control group were negative for PRRSv viremia from D0 to D14.

[0573] Conclusion

[0574] The significant ($p \leq 0.05$) reduction of the lung lesions, clinical signs, replication of the virus in the blood and lungs post-challenge as well as the improvement of the growth performances support the establishment of a 2 week OOI following vaccination with a single dose of PRRS 94881 MLV at $1 \times 10^{3.82}$ $TCID_{50}$/mL in piglets at approximately 14 days of age.

[0575] Example 8 Evaluation of duration of immunity of PRRS 94881 MLV in susceptible two week old pigs following challenge with a heterologous European isolate of PRRS at 26 weeks post-vaccination

[0576] The objective of this vaccination-challenge study was to evaluate the duration of immunity (DOI) 26 weeks after the administration of the vaccine candidate Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, European-derived Isolate 94881, Modified Live Virus (PRRS 94881 MLV) to 14 ± 3 days of age PRRS seronegative pigs. The primary efficacy criterion to satisfy a DOI of 26 weeks post-vaccination was a significant reduction in ($p \leq 0.05$) lung lesions scores (gross or histological) post-challenge in the PRRS 94881 MLV vaccinate group (Group 1) compared to the challenge control group (Group 2).

[0577] On Day 0 (D0), 22 pigs assigned to the vaccinate group received 1.0 mL IM of PRRS 94881 MLV ($1 \times 10^{4.27}$ $TCID_{50}$) IM (Group 1), 22 pigs assigned to the challenge control group received 1.0 mL IM of control product (product-matched placebo without PRRS 94881 MLV, Group 2) and 12 pigs assigned to the negative control group also received 1.0 mL IM of control product (Group 3). Groups 1 and 2 were challenged on D179 (Day post-challenge {DPC} 0) with a virulent strain of European PRRSv and pigs were monitored 10 days post-challenge for clinical signs, average daily weight gain, and viremia. Pigs were necropsied on D189 (DPC 10) and gross and histological lung lesions, and lung viral load were determined.

[0578] Median gross lung lesion scores on D189 (DPC 10) were 0.1% and 13.8% for PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs and challenge controls, respectively (**p<0.0001**). Median histological lung lesion scores on DPC 10 were 6.0 and 19.5 for PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs and challenge controls, respectively (**p<0.0001**). PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs had significantly less serum viral load at 3, 7 and 10 days post-challenge compared to challenge controls (**p≤0.0001**). The post-challenge area under the curve (AUC) analysis for viremia from DPC 0 to DPC 10 and DPC 3 to DPC 10 were also significantly lower for PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs (15.54 and 8.88 $\log_{10}$ GE/mL per day, respectively) compared with the challenge control group (44.77 and 36.43 $\log_{10}$ GE/mL per day, respectively, **p<0.0001**). The median qPCR values for lung tissues collected at necropsy were 3.69 and 6.25 $\log_{10}$ GE/mL for PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs and challenge controls, respectively (**p<0.0001**). There were no significant differences in clinical signs post-challenge (p≥0.4878).

[0579] A significant reduction (p≤0.05) of gross and histological lung lesions, viral load in lung tissues collected at necropsy and post-challenge viremia for PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs compared to challenge controls supported vaccine efficacy against virulent PRRSv when challenged 26 weeks post-vaccination. The results of this study establish a 26 week duration of immunity post-vaccination in pigs vaccinated with PRRS 94881 MLV at 2 weeks of age. These results were achieved with a vaccine dose of $1 \times 10^{4.27}$ $TCID_{50}$/mL, which was slightly below the minimum immunizing dose ($1 \times 10^{4.5}$ $TCID_{50}$/mL) for this investigational veterinary product.

[0580] OBJECTIVE(S)/PURPOSE OF THE STUDY

[0581] The objective of this vaccination-challenge study was to evaluate the duration of immunity (DOI) of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, European-derived Isolate 94881, Modified Live Virus, Code 19S1.U (PRRS 94881 MLV) administered to PRRS seronegative pigs, 14 ± 3 days of age against a virulent challenge with a heterologous European isolate of PRRS at 26 weeks post-vaccination. The primary efficacy criterion to satisfy a DOI of 26 weeks post-

vaccination was a significant reduction ($p \leq 0.05$) in lung lesions scores (gross or histological) post-challenge in the PRRS 94881 MLV vaccinate group (Group 1) compared to the challenge control group (Group 2)

[0582] Secondary efficacy parameters included post-vaccination and post-challenge viremia, clinical assessments after vaccination, PRRS serology, post-challenge clinical observations, average daily weight gain (ADWG), rectal temperatures and lung PRRSv quantitation. Viremia post-challenge was considered to be the most important secondary parameter since it is an objective and quantifiable parameter. Rectal temperature and clinical observations were then considered supportive in the DOI definition process. Lastly, growth performance, serology and virus detection in lungs were used as supportive parameters towards the primary parameters in satisfying the study objective.

[0583] Schedule of Events

[0584] Table 8.1 Schedule of Events

Study Day	Dates	Key Study Event
-7	04Feb10	Blood samples collected to screen for negative PRRS ELISA status
-2	09Feb10	Health Exam performed
-1 to 21	10Feb10-04Mar10	Clinical Assessments performed daily
0	11Feb10	Body weights recorded; Blood samples collected for serology and viremia; Group 1 vaccinated with IVP, Groups 2 & 3 vaccinated with CP
7	18Feb10	Blood samples collected for serology and viremia
13	24Feb10	Pigs vaccinated with 1.0 mL CircoFlex® vaccine Microchip inserted SC in the left neck of each study pig
14	25Feb10	Blood samples collected for serology and viremia
21	04Mar10	Blood samples collected for serology and viremia
22 to 177	05Mar10-07Aug10	Clinical Assessments at least 3 times/week
28	11Mar10	Blood samples collected for serology and viremia
56	08Apr10	Blood samples collected for serology and viremia
84	06May10	Blood samples collected for serology and viremia
112	03Jun10	Blood samples collected for serology and viremia
140	01Jul10	Blood samples collected for serology and viremia
168	29Jul10	Blood samples collected for serology and viremia
D178	08Aug10-	Daily Clinical Observations and Rectal Temperatures

Study Day	Dates	Key Study Event
(DPC-1) to D189 (DPC 10)	19Aug10	
D179 (DPC 0)	09Aug10	Body weights collected; Blood samples collected for serology and viremia; Groups 1 and 2 challenged with heterologous European PRRS isolate
D182 (DPC 3)	12Aug10	Blood samples collected for serology and viremia
D186 (DPC 7)	16Aug10	Blood samples collected for serology and viremia
D188 (DPC 9)	18Aug10	Body weights collected
D189 (DPC 10)	19Aug10	Blood samples collected for serology and viremia Pigs euthanized and necropsied Lung lesions scored for pathology Lung tissues collected for virus isolation and histopathology

[0585] Study Design

[0586] This was a blinded vaccination-challenge efficacy study conducted in 56 weaned, PRRS seronegative pigs, 14 ± 3 days of age on Day 0 (D0). A summary of the study is provided in Table 8.2.

[0587] Table 8.2 Study Design

Group	Number of Pigs on D0	Treatment on D0 (14 ± 3 days of age)	Challenged on D179 (DPC 0) with 1.0 mL/nostril and 1.0 mL IM of PRRSv 205817 (mean 1 x $10^{6.27}$ $TCID_{50}$/3 mL)	Euthanized and Necropsied on D189 (DPC 10)
1	22	1.0 mL IM of IVP (PRRS 94881 MLV)	Yes	Yes
2	22	1.0 mL IM of Control Product (CP; Placebo matched product without PRRS 94881 MLV)	Yes	Yes
3	12	1.0 mL IM of CP	No	Yes

[0588] Blinding Criteria

[0589] The Study Investigator and designees were blinded to the assigned treatment groups throughout the in-life phase of the study. To maintain this blinding, the BIVI monitor performed the randomization and an individual who did not participate in assessments of the pigs (i.e., clinical assessments, clinical observations or necropsies) administered the assigned IVP and CP treatments on D0. BIVI laboratory personnel were blinded to the treatment each pig received while conducting their respective tasks.

[0590] Materials

[0591] Investigational Veterinary Product (IVP) and Control Product

[0592] Table 8.3 IVP

Generic Product Name:	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, Modified Live Virus
Strain:	94881
Production and Formulation:	BIVI-St. Joseph Production produced PRRS 94881 MLV, Lot 390-005 (Section 15.4) in accordance with Outline of Production, Code 19S1.U_ and EU Dossier Part 2b. On D0, BIVI-Ames reconstituted/diluted PRRS 94881 MLV vaccine Lot 390-005 with Phosphate buffered saline (PBS; Lot 809-002, Section 15.5) to formulate the IVP, Lot No. N257-137 at a target dosage of approximately 1 x $10^{4.5}$ $TCID_{50}$/mL.
Manufacturer:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506, USA
Lot No.:	390-005, reconstituted to Lot N257-137
Expiry Date:	An expiration date of 11Feb10 was assigned to the IVP for study purposes only.
Storage Conditions:	Lyophilized vaccine: 2-8 °C Rehydrated/diluted IVP: on ice
Testing:	PRRS 94881 MLV, Lot 390-005 and PBS, Lot 809-002 were tested by BIVI-QC in accordance with draft Outline of Production (Section 15.1) and as further specified in the EU dossier Part 2.F. BIVI-Ames laboratory personnel tested pre- and post-vaccination aliquots of the IVP for virus titer in accordance with the PRRSv Titer Procedure (Section 15.1).
Test Results:	Lot 390-005: Results were satisfactory (Section 15.4). Lot 809-002: Results were satisfactory (Section 15.5). IVP Lot N257-137: Mean titer of 1 x $10^{4.27}$ $TCID_{50}$/mL (Section 15.7).
IVP Retention:	IVP was reconstituted / diluted for immediate use in this study only and was not retained beyond the vaccination event.

[0593] Table 8.4 CP

Generic Product Name:	Placebo
Formulation:	BIVI-Production produced lyophilized placebo product containing inert material comprised in the vaccine serial without PRRS 94881 MLV (Lot N240-191-062409, Section 15.6). On D0, BIVI-Ames reconstituted Lot N240-191-062409 with Phosphate buffered saline (PBS; Lot 809-002, Section 15.5) to formulate the CP, Lot No. N257-134
Manufacturer:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506, USA
Lot Number:	Lot N240-191-062409, reconstituted to Lot N257-134
Expiry Date:	An expiration date of 11Feb10 was assigned to the CP for study purposes only.
Storage Conditions:	Lyophilized vaccine: 2-8 °C Rehydrated CP: 2-8 °C or on ice
Testing:	Lot N240-191-062409 and Lot N257-134were tested by BIVI-QC for EP sterility
Test Results:	Lot N240-191-062409: Results were satisfactory for sterility (Section 15.6). Lot 809-002: Results were satisfactory for sterility CP was determined to be sterile (Section 15.7).
CP Retention:	CP was reconstituted for use in this study only and was not retained beyond the vaccination event.

[0594] Challenge Material

[0595] Table 8.5 Challenge Material

Name/number of isolate	PRRS isolate 205817
Location and date of isolation incl. clinical symptoms	The European PRRS virus isolate 205817 was derived from isolate 190136 originally obtained from lung tissue of a newborn pig from a farm with typical reproductive signs of PRRS (abortions in sows and weakness in newborn pigs) during an outbreak in Lower Saxony, Germany, in April 2004. The attending veterinarians submitted the lung samples to bioScreen (sample arrived on 21 April, 2004) for diagnostic testing. Isolate 190136 was directly propagated on MA 104 cells and a pure culture challenge stock was prepared. A pure culture of isolate 190136 was used to inoculate pigs for evaluation of its ability to reproduce PRRS-specific respiratory disease in a controlled, laboratory trial. Challenged animals exhibited respiratory distress and revealed evidence of interstitial pneumonia upon histopathological examination. PRRS virus successfully re-isolated from lung lesions was given the isolate designation of 205817. Isolate 205817 was directly propagated on MA104 cells and a pure culture challenge stock was prepared for use in future BIVI clinical trials.
Formulation:	Challenge virus was propagated in AK-MA104 cells and formulated to a targeted titer of approximately 1 x 10^6 $TCID_{50}$/3 mL dose on D179. An adequate volume of challenge material was prepared. Two x 5 mL aliquots were removed from challenge material for assay purposes before the challenge material was transported to VRI.
Lot Number:	N270-179
Manufacture:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. - USA
Storage conditions	Bulk challenge material was stored at -70 ± 10 °C. Once prepared, diluted challenge material was maintained on ice until it was administered.
Testing:	BIVI-Ames laboratory personnel tested pre- and post-challenge aliquots for virus titer in accordance with the PRRSv Titer Procedure
Test Results:	The challenge material had a mean titer of 1 x $10^{6.27}$ $TCID_{50}$/3 mL dose
Administration route	1.0 mL/nostril and 1.0 mL IM in the right neck
Challenge material retention:	Challenge material was thawed / diluted for this study only and was not retained beyond the challenge event.

[0596] Treatments

[0597] Dosing Justification

[0598] The IVP was administered as a 1.0 mL dose to assigned pigs to evaluate DOI of PRRS 94881 MLV at 26 weeks post-vaccination. The CP was administered as a 1.0 mL dose to Groups 2 and 3 as a placebo vaccine.

[0599] Dosing Regimen

[0600] IVP or CP IVP or CP was administered was administered to an assigned pig in the right neck region IM on D0 using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe and a sterile 20 g x 1 inch (2.54 cm) needle by a person not collecting study data. The dosing regimen is shown below in Table 8.6

[0601] Table 8.6 Dosing Regimen

Group	Number	Treatment	Dose/Route	Study Day
1	22	IVP	1.0 mL IM	D0
2	22	CP	1.0 mL IM	D0
3	12	CP	1.0 mL IM	D0

[0602] Concomitant Treatments

[0603] Due to the fact that several pigs were found dead early in the study subsequent to bacterial infections, the Investigator and Study Monitor agreed upon the administration of the following additional concomitant treatments to all study animals (Section 15.10):

[0604] Day 20: Mu-Se® (Vitamin E/Selenium, Intervet/Schering Plough Animal Health, USA), 0.1 mL IM in the right ham

[0605] Day 21: EXCEDE® (Ceftiofur, Pfizer Animal Health, USA), 0.5 mL in the left ham

[0606] Day 35: EXCEDE® (Ceftiofur, Pfizer Animal Health, USA), 1.0 mL in the right ham.

[0607] Day 42: EXCEDE® (Ceftiofur, Pfizer Animal Health, USA), 1.0 mL in the left ham.

[0608] Day 47: BAYTRIL 100® (Enrofloxacin, Bayer Animal Health, USA), 1.5 mL SC in the left neck

[0609] Vitamin E/Selenium was administered for the prevention of mulberry heart disease and the antibiotic treatments were administered for the treatment/prevention of bacterial infections.

[0610] ANIMAL INFORMATION

[0611] Details of Animal Studies

[0612] Table 8.7 Animal Information

Source:	Prairie View Farms, N5627 Hwy DD, Burlington, WI 53105		
Number of pigs:	56		
Arrival day:	Pigs arrived at the Veterinary Resources, Inc. (VRI) Cambridge facility on D-2 (09Feb10).		
Identification:	Each animal was identified with individual double ear tags at arrival on D-2. Each animal also had an electronic microchip inserted SC in the left neck on D13.		
Species:	Porcine		
Breed:	Commercial crossbred		
Gender:	Females or castrated males.		
Age range:	13 to 17 days of age on D0		
Weight range:	2.4 to 5.4 kg on D0		
Ownership of test animals:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.		
Physiological status:	On D-2, pigs selected for assignment to the study were observed by the Study Investigator and determined to be in good health and nutritional status. Observations were recorded on the Animal Health Examination Record form.		
Group – Pig Assignments	Group 1 (n=22): 117, 118, 119, 121, 127, 128, 129, 131, 133, 136, 139, 141, 142, 144, 146, 147, 153, 154, 162, 163, 164 and 179	Group 2 (n=22): 123, 124, 125, 130, 134, 137, 138, 148, 149, 150, 156, 157, 158, 160, 161, 165, 167, 169, 170, 172, 177 and 178	Group 3 (n=12): 116, 120, 126, 132, 135, 145, 151, 152, 155, 159, 166 and 171

[0613] INCLUSION/EXCLUSION CRITERIA

[0614] All pigs enrolled in this study were PRRS ELISA negative (ELISA S/P ratio of <0.4) and were healthy at the time of vaccination (D0) as determined by observation.

[0615] POST-INCLUSION REMOVAL CRITERIA

[0616] No pigs were removed from the study. Three pigs were found dead before challenge administration. Further results on these three pigs are presented in Section 12.8.

[0617] ANIMAL MANAGEMENT AND HOUSING

[0618] Pigs were housed at Veterinary Resources, Inc. (VRI) in Cambridge, IA for the duration of the study. Pigs were housed in multiple pens (11 or 12 pigs/pen) within each room, with vaccinated (Group 1) and control animals (Groups 2 and 3) housed in uniform but separate rooms to ensure biosecurity. PRRS 94881 MLV pigs were housed in Room CB8 until D78, then in CC1 until D105, and then CC3 for the remainder of the study. Challenge control pigs were housed in Room CC2 throughout the study. Negative control pigs were housed in Room CB6 until D73 and then in CB7 for the remainder of the study. Animal pens were elevated with plastic slatted flooring, with age appropriate feeders and nipple cup drinkers. Each isolation room was constructed identical to the others and all were biohazard level 2 (BL2) compliant, hepafiltered, mechanically ventilated with thermostat regulated temperature control.

[0619] Treatment group isolation was necessary in this study as it is well known within the scientific community that PRRSv readily spreads from pig to pig via various mechanisms including aerosolization. This includes avirulent live PRRS vaccines as these biological products include attenuated virus particles that mimic the characteristics of virulent wild-type PRRS without the capability to cause disease. Proper methods were in place to ensure that biosecurity was maintained and that vaccinated animals did not accidentally cross-contaminate non-vaccinated, PRRSv naïve negative control animals.

[0620] Appropriate measures were taken by test facility staff to adequately clean and disinfect each room prior to its usage for this study.

[0621] Each room in the facility had fans and heaters to aid in sufficient air circulation and heating. The ventilation system was separate yet identical for each room, so air was not shared between rooms.

[0622] Feed was stored in bags, free from vermin. Feed and water were available *ad libitum*. Pigs were fed Lean Metrics Infant Medicated feed (Purina Mills LLC, St. Louis, MO) from arrival to D5, when they were switched to Lean

Metrics Senior Medicated feed (Purina Mills LLC, St. Louis, MO). On D64 the pigs were switched to Lean Metrics Complete 85 feed (Purina Mills LLC, St. Louis, MO), and on D82 they were switched to Lean Metrics Complete CE85, T40 (Purina Mills LLC, St. Louis, MO), which they were fed for the remainder of the study. Throughout the study, the feeds provided were appropriate for the size, age, and condition of the pigs according to acceptable animal husbandry practices for the region.

[0623] The pigs were in good health and nutritional status before initiation of the study as determined by the Study Investigator. During the study, select animals were observed with other conditions, including thinness, coughing, swellings, rough hair coat, depression, abscesses, and poor body condition. The Study Investigator considered all of these conditions to be typical of group housed growing/maturing pigs. These conditions were considered transient or inconsequential and were not treated.

[0624] ASSESSMENT OF EFFECTIVENESS

[0625] To assess the DOI of PRRS 94881 MLV at 26 weeks post-vaccination, the PRRS 94881 MLV and challenge control groups were challenged on D179 (DPC 0) and lung lesions post-challenge were evaluated 10 days later (DPC 10). A DOI of 26 weeks post-vaccination was achieved if PRRS 94881 MLV group had significantly decreased ($p \leq 0.05$) lung pathology (gross or histological) post-challenge compared with the challenge control group.

[0626] The secondary efficacy parameters analyzed between the vaccine group and the challenge control group included post-vaccination and post-challenge viremia, post-challenge clinical observations, post-challenge rectal temperatures, post-vaccination clinical assessments, average daily weight gain (ADWG) and PRRS serology. Viremia post-challenge was considered to be the most important secondary parameter since it is an objective and quantifiable parameter. Rectal temperature and clinical observations were then considered supportive in the DOI definition process. Lastly, growth performance, serology

and virus detection in lungs were used as supportive parameters towards the primary parameters in satisfying the study objective.

[0627] CRITERIA FOR A VALID TEST

[0628] All pigs were required to be PRRS ELISA negative (ELISA S/P ratio of <0.4) at pre-purchase screening and on D0. Challenge control pigs were required to be negative for PRRS antibodies up to challenge and the negative control group was required to be negative for PRRS antibodies throughout the study.

[0629] PRIMARY OUTCOME PARAMETER

[0630] The primary efficacy outcome variable was lung pathology (gross and histological lesions) at D189 (DPC 10) of the study.

[0631] Gross Lung Lesion Scores

[0632] On D189, after samples and data were collected and recorded, all remaining study pigs were euthanized following VRI SOP PRC1027 (Section 15.1). Each pig was necropsied in accordance with VRI SOP PRC 1028 (Section 15.1). The thoracic cavity of each pig was exposed by a designee and the heart and lungs were removed. The Study Investigator examined each set of lungs, described any gross pathology and determined the percentage of pathology for each lung lobe. Observations and data were recorded on the Necropsy Report Record form.

[0633] Histological Lung Lesion Scores

[0634] For each set of lungs, two samples from the Left and Right Apical lobes, the Left and Right Cardiac lobes, the Left and Right Diaphragmatic lobes and the Intermediate lobe were retained. Each lung sample was approximately 1 inch (2.54 cm) x 1 inch (2.54 cm). For one set of lung samples, all three samples from the left side were combined into one container; while all three samples from the right side and the Intermediate lung lobe sample were combined into another container. Each container was filled with a sufficient amount of 10% formalin solution. For the other set of lung samples, all three lung samples from the left

side were combined into one Whirlpak®; while all three samples from the right side and the Intermediate lung lobe sample were combined into another Whirlpak®. All containers and Whirlpaks® were appropriately labeled with animal number, study number, date of collection, study day, sample type and whether the samples were from the left or right side. Lung samples in formalin were stored at room temperature while lung samples in Whirlpaks® were stored on dry ice until transported to BIVI-Ames. Sample collections were recorded on the Necropsy Report Record form. Formalin fixed lung tissue samples and Whirlpak® lung samples were transferred to BIVI-Ames. A completed Specimen Delivery Record form was included with each shipment.

[0635] Formalin fixed lung tissue samples were held by BIVI-Ames at room temperature until submitted to Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory (ISU VDL) by BIVI-Ames. Lung samples were handled and processed by ISU VDL personnel according to ISU VDL procedures within one week of necropsy. A single slide was generated for each pig containing seven sections (one each of all seven lung lobes). Each H & E slide was identified with a unique identifier code. ISU VDL provided a computer record containing the study number, identifier codes and associated pig tissues.

[0636] Once daily, on the days in which the study slides were read for histopathology, an ISU VDL pathologist (K. Schwartz) first read the EU PRRS positive and negative control slides. Afterwards, the pathologist read the H & E stained lung slides for pneumocytic hypertrophy and hyperplasia, septal infiltration with mononuclear cells, necrotic debris, intra-alveolar accumulation of inflammatory cells and perivascular accumulation of inflammatory cells. Results were recorded in an Excel spreadsheet. The lung histopathology scoring system is shown below in Table 8.8.

[0637] Table 8.8 Lung Histopathology Scoring System

Pneumocytic hypertrophy and hyperplasia	**Intra-alveolar accumulation of inflammatory cells**
0 = Not present 1 = Mild 2 = Moderate 3 = Severe	0 = Not present 1 = Mild 2 = Moderate 3 = Severe
Septal infiltration with mononuclear cells	**Perivascular accumulation of inflammatory cells**
0 = Not present 1 = Mild 2 = Moderate 3 = Severe	0 = Not present 1 = Mild 2 = Moderate 3 = Severe
Necrotic debris	**Definitions of scoring system applied to histological parameters (except necrotic debris):**
0 = Not present 3 = Yes present	**0 = not present:** no detectable lesions present within an area of view **1 = Mild lesions:** few positive cells (1-5 cells/area) present within an area of view **2 = Moderate lesions:** multiple positive cells (>5 cells/area) at single location or few cells (1-5 cells/area) at multiple locations within an area of view. **3 = Severe lesions:** multiple positive cells (>5 cells/area) at multiple locations within an aread of view.

[0638] Upon completion of the reading of all slides, slides were returned to the Sponsor Representative and will be archived at Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., St. Joseph, MO upon completion of the final report.

[0639] Secondary PARAMETERs

[0640] Secondary variables included post-vaccination and post-challenge viremia, post-challenge clinical observations, post-challenge rectal temperatures, average daily weight gain (ADWG), lung PRRSv quantitation, post-vaccination clinical assessments, and PRRS serology.

[0641] Serum PRRS qPCR

[0642] Venous whole blood was collected at pre-purchase and on Days 0, 7, 14, 21, 28, 56, 84, 112, 140, 168, 179 (DPC 0), 182 (DPC 3), 186 (DPC 7), and 189 (DPC 10). Briefly, approximately 2-5 mL of blood was collected from each pig

into an appropriate sized serum separator tube (SST). Sample collections were recorded on the Sample Collection Record form. Blood in SSTs was allowed to clot at room temperature. Blood samples were delivered to BIVI-Ames on the day of collection and Specimen Delivery Record form was completed. Blood samples were spun down by BIVI-Ames and serum was harvested, split and transferred to appropriate tubes. Each tube was labeled with the pig's ID number, the study number, the date of collection, the study day and the sample type. At BIVI-Ames, one set of serum samples was held at 2-8 ºC and the other set of serum samples was held at -70 ± 10 °C.

[0643] Clinical Observations Post-Challenge

[0644] Pigs were observed for clinical signs of disease from D178 (DPC -1) to D189 (DPC 10). Observations were conducted by the Study Investigator or designees and were recorded on the Clinical Observation Record form. Pigs were observed each day for respiration, behavior and cough based on the clinical observation scoring system outlined below in Table 8.9.

[0645] Table 8.9 Clinical Observation Scoring System

Respiration	Behavior	Cough
0 = normal respiration 1 = panting/rapid respiration 2 = dyspnea 3 = dead	0 = normal 1 = mild to moderate lethargy 2 = severely lethargic or recumbent 3 = dead	0 = no coughing 1 = soft or intermittent cough 2 = harsh or severe, repetitive cough 3 = dead

[0646] Rectal Temperatures

[0647] Rectal temperatures were collected by the Study Investigator or designees from D178 (DPC -1) to D189 (DPC 10). Rectal temperatures were recorded in ºC units on the Clinical Observation Record form.

[0648] Body Weight and Average Daily Weight Gain

[0649] Individual body weights were collected on D0, D179 (DPC 0) and D188 (DPC 9). Each pig was weighed on a calibrated scale by the Study Investigator or designees. Results were recorded in kg units on the Body Weight

Record form. Average daily weight gain was determined from the D179 (DPC 0) to D188 (DPC 9).

[0650] Lung PRRS qPCR

[0651] Lung tissue samples in Whirlpaks® were held at -70 ± 10 °C at BIVI-Ames until shipped to address listed in Section 9.3.1. A completed Specimen Delivery Record form was included with the shipment. bioScreen tested lung samples for PRRSv RNA by qPCR (Section 15.1). Left lung tissues were homogenized and tested. Right lung tissues and intermediate lung lobe samples were homogenized and tested. Results were reported as genome equivalent (log_{10} GE/mL) for left and right lung samples. A geometric mean titer of right and left GE/mL values will be calculated for each pig by the statistician using SAS program.

[0652] Clinical Assessment Post-Vaccination

[0653] All pigs were observed for clinical assessments post-vaccination by the Study Investigator or designees. Observations were conducted daily from D-1 to D21 and then at least three times a week from D22 to D177. Observations were recorded on the Clinical Assessment Record form.

[0654] PRRS Serology

[0655] The serum samples collected at pre-purchase and on Days 0, 7, 14, 21, 28, 56, 84, 112, 140, 168, 179 (DPC 0), 182 (DPC 3), 186 (DPC 7), and 189 (DPC 10) and held at 2-8 ºC were tested by BIVI-Ames for PRRS antibodies (Section 15.1). Results were reported as negative (ELISA S/P ratio of < 0.4) or positive (ELISA S/P ratio of ≥ 0.4).

[0656] ADVERSE EVENTS

[0657] No adverse events attributed to PRRS 94881 MLV were noted in this study.

[0658] STATISTICAL METHODS

[0659] EXPERIMENTAL UNIT

[0660] Treatment groups were housed in separate rooms in this study to avoid transmission of PRRSv to non-vaccinated groups. Therefore, room was the experimental unit. However, for the purposes of analyses, possible bias due to confounding "room" and "treatment" effects were ignored, and pig was used as the statistical unit.

[0661] RANDOMIZATION

[0662] Fifty-six (56) pigs were randomly assigned to one of three groups. Randomization was performed by the BIVI. At the time of shipment Nos. 140 and 143 (challenge control group), as well as No. 168 (PRRS 94881 MLV group), were culled. Number 178 was randomly selected to replace No. 140, No. 177 was randomly selected to replace 143, and No. 179 was randomly selected to replace No. 168 from a pool of five extra pigs that met the inclusion criteria.

[0663] ANALYSIS

[0664] Statistical analyses and data summaries were conducted by Dr. rer. hort. Martin Vanselow, Biometrie & Statistik, Zum Siemenshop 21, 30539 Hannover, Germany, +49(0) 511 606 777 650, m.vanselow@t-online.de. Data were analyzed assuming a completely random design structure. The statistical analyses were performed using SAS software release 8.2 or higher (SAS, 2001, Cary, USA/North Carolina, SAS Institute Inc.). PRRS 94881 MLV pig 179 and challenge control pigs 124 and 161 died before challenge and were excluded from post-challenge analyses. All tests on differences were designed as two-sided tests at $\alpha = 5\%$. The statistician's report is presented in Section 15.9.

[0665] Gross Lung Lesion Scores

[0666] The gross lung lesion score for each pig was calculated using the factors shown below in Table 8.10 multiplied by the % pathology for a specific lung lobe. Calculations were conducted using SAS program.

[0667] Table 8.10 Factors for Calculating Gross Lung Lesion Scores

Lung lobe	Factor
Left apical	0.05
Left cardiac	0.06
Left diaphragmatic	0.29
Right apical	0.11
Cardiac	0.10
Right diaphragmatic	0.34
Right accessory/intermediate	0.05

[0668] Treatment groups were compared on differences using the Wilcoxon Mann-Whitney test.

[0669] Histological Lung Lesion Scores

[0670] Individual histological scores of the lung samples were accumulated per lobe and animal. This sum score was divided by the number of lobes examined per animal. The results were used as single values for the comparison between treatment groups. Treatment groups were tested on differences using the Wilcoxon Mann-Whitney test.

[0671] Lung PRRS qPCR

[0672] The quantitative PCR data (PRRS viral load [$\log_{10}$ GE/mL]) from lungs collected on D189 were used for comparisons between the treatment groups by the Wilcoxon Mann-Whitney test. The average ($\log_{10}$ GE/mL) of the left and right lung qPCR results were used for the evaluation. Prior to the calculations the analytical result 'not detected' was replaced by $\log_{10}$ GE/mL of 0.0 and 'positive' was replaced by 3.0.

[0673] Frequency tables of positive qPCR results were generated. Differences between treatment groups were tested by Fisher's exact test.

[0674] Serum PRRS qPCR

[0675] The viremia data were evaluated separately for each day of investigation. Additionally, for viral load the areas under the individual response

curves between D179 and D189 (AUC 0-10) and between D182 and D189 (AUC 3-10) were analyzed.

[0676] The quantitative PCR data (PRRS viral load [log_{10} GE/mL]) were used for comparisons between the treatment groups by the Wilcoxon Mann-Whitney test. Prior to the calculations the analytical result 'not detected' was replaced by a log_{10} GE/mL value of 0.0 and 'positive' was replaced by 3.0. The treatment groups were tested on differences using the Wilcoxon Mann-Whitney test.

[0677] Frequency tables of positive qPCR results were generated. Differences between treatment groups were tested by Fisher's exact test.

[0678] Clinical Observations Post-Challenge

[0679] Frequency tables of animals with at least one positive finding between D180 and D189 were generated. Total scores were the summation of respiration score + behavior score + cough score. Calculations were conducted using SAS program. Differences between treatment groups were tested by Fisher's exact test.

[0680] The maximum scores and the mean scores per animal from D180 to D189 for respiration, behavior, coughing and for all three added together (total) were used for the statistical evaluation. Differences between treatment groups were tested by the Wilcoxon Mann-Whitney test.

[0681] Body Weight and Average Daily Weight Gain

[0682] Individual daily weight gains were calculated for the time period between D179 to D188. For each day of investigation and for the time period descriptive statistics were calculated. Differences between treatment groups were tested using analysis of variance and subsequent t-tests. Least squares means of the groups and differences between least squares means with 95% confidence intervals were calculated from the analysis of variance.

[0683] Rectal Temperatures

[0684] Differences between treatment groups with respect to the original temperature data were tested using analysis of variance and subsequent t-tests. Least squares means of the groups and differences between least squares means with 95% confidence intervals were calculated from the analysis of variance.

[0685] Clinical Assessment Post-vaccination

[0686] Frequency tables of animals with at least one positive finding between D1 and D21 were generated. Differences between treatment groups were tested by Fisher's exact test.

[0687] PRRS Serology

[0688] Frequency tables of positive ELISA results were generated for each time point. Differences between treatment groups were tested by Fisher's exact test.

[0689] RESULTS

[0690] gross Lung lesion Scores

[0691] Median gross lung lesion scores on D189 (DPC 10) were 0.1% and 13.8% for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and challenge controls, respectively. The median gross lung lesion score for PRRS-vaccinated pigs was significantly lower than the median gross lung lesion score for the challenge controls (**p<0.0001**). The median gross lung lesion score for the negative control group was 0.0%.

[0692] Number 123 (challenge control group) could not be scored for lung lesions on D189 due to diffuse pleuritis and adhesions. *Moraxella osloensis, Staphylococcus warneri, Staphyloccous hyicus* and *Pseudomonas* species were isolated from this pig's lung tissues post necropsy.

[0693] A summary of group gross lung lesion scores and the associated p-value is shown below in Table 8.11.

[0694] Table 8.11 Summary of Group Gross Lung Lesion Scores (%) on D189

Group[1]	N[3]	Min.	Max.	Median	95 % CI		Q Range	Mean	p value
1	21	0.00	12.40	0.060	0.050	0.550	0.400	1.099	**<0.0001**
2	19[2]	0.06	69.20	13.800	2.690	22.650	20.850	15.842	
3	12	0.00	0.59	0.000	0.000	0.110	0.085	0.093	NI

[0695] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. [2]No. 123 was not scored due to diffuse pleuritis and adhesions due to bacterial infections. [3]One PRRS 94881 MLV pig and two challenge control pigs died pre-challenge and were not included in analysis. NI = Not included in statistical analysis

[0696] Histological Lung Lesion Scores

[0697] Median histological lung lesion scores were 6.0 and 19.5 for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and challenge controls, respectively. The median histological lung lesion score for the PRRS-vaccinated group was significantly lower than the median histological lung lesion score for challenge controls (**p<0.0001**). The median histological lung lesion score for the negative control group was 9.0.

[0698] A summary of the group histological lung lesion scores and the associated p-value is shown below in Table 8.12.

[0699] Table 8.12 Summary of Group Histological Lung Lesion Scores

Group[1]	N[2]	Min.	Max.	Median	95 % CI		Q Range	Mean	p value
1	21	2	20	6.0	3.0	8.0	5.0	6.6	**<0.0001**
2	20	8	47	19.5	15.0	23.0	10.0	20.2	
3	12	0	15	9.0	7.0	14.0	6.5	9.1	NI

[0700] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. [2]One PRRS 94881 MLV pig and two challenge control pigs died pre-challenge and were not included in analysisNI = Not included in statistical analysis

[0701] Lung PRRS qPCR

[0702] Median qPCR lung values from lung tissues were 3.69 and 6.25 log_{10} GE/mL for PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs and challenge controls, respectively. The median qPCR value for PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs was significantly lower than the median qPCR value for challenge controls (**p<0.0001**). No PRRSv RNA was detected in lung samples of any negative control pigs.

[0703] A summary of group lung qPCR values and test result (p value) is below in Table 8.13.

[0704] Table 8.13 Summary of Group Lung qPCR (mean log_{10} GE/mL) Values

Group[1]	N[2]	Min.	Max.	Median	95 % CI		Q Range	Mean	p value
1	21	0.00	6.83	3.69	1.50	5.21	3.18	3.36	<0.0001
2	20	4.80	7.40	6.25	5.62	6.68	1.26	6.22	
3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI

[0705] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. [2]One PRRS 94881 MLV pig and two challenge control pigs died pre-challenge and were not included in analysis. NI = Not included in statistical analysis

[0706] PRRSv RNA was detected in lung tissues of 90% and 100% of PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs and challenge control pigs, respectively. There was no statistical difference between the vaccinated group and challenge controls (p=0.4878).

[0707] A summary of group frequency of PRRS qPCR positive lung tissues from pigs at necropsy is shown below in Table 8.14.

[0708] Table 8.14 Group Frequency of PRRSv qPCR Positive Lung Tissues

Group[1]	N Positive	% Positive	95 % CI		Total Number[2]	p value
1	19	90	69.6	98.8	21	0.4878
2	20	100	83.2	100.0	20	
3	0	0	0.0	26.5	12	NI

[0709] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. [2]One PRRS 94881 MLV pig and two challenge control pigs died pre-challenge and were not included in analysis. NI = Not included in statistical analysis

[0710] Serum PRRS qPCR

[0711] PRRSv RNA was not detected in the serum of any pigs on D0. Post-vaccination, PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs had median values of 3.00, 0, 0, 3.00, 0, 0, 0, 0 and 0 $\log_{10}$ GE/mL on D7, D14, D21, D28, D56, D84, D112, D140 and D168 respectively. The values were significantly higher than challenge controls on D7, D14, D21 and D28 (**p≤0.0013)**, as challenge controls did not have any PRRSv RNA detected until D182 (DPC 3).

[0712] PRRSv RNA was not detected in the serum of any pigs on D179 (DPC 0). Post-challenge, PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs had median values of 4.44, 0 and 0 $\log_{10}$ GE/mL on D182 (DPC 3), D186 (DPC 7), and D189 (DPC 10), respectively, compared with 5.88, 5.30 and 4.24 $\log_{10}$ GE/mL for challenge controls on the same days. Median values for the challenge controls were higher than the PRRS 94881 MLV group on all post-challenge days (**p≤0.0001**).

[0713] No PRRSv RNA was detected in serum from any negative control pig during this study.

[0714] The median AUC values for PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs were 15.54 and 8.88 $\log_{10}$ GE/mL per day from DPC 0 to DPC 10 and from DPC 3 to DPC 10, respectively. In contrast, the median AUC values for challenge controls were 44.77 and 36.43 $\log_{10}$ GE/mL per day from DPC 0 to DPC 10 and from DPC 3 to DPC 10, respectively. Median values for the PRRS MLV group were

significantly lower than median values for the challenge controls for both periods (**p<0.0001**).

[0715] Summaries of serum PRRS qPCR data are shown below in Tables 8.15 and 8.16.

[0716] Table 8.15 Summary of Serum PRRS qPCR Results (log_{10} GE/mL) from D0 to D168

Day	Group[1]	N	Min.	Max.	Median	95 % CI		QRange	Mean	p value
0	1	22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0000
	2	22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
7	1	21	3.00	4.63	3.00	3.00	3.00	0.00	3.23	**<0.0001**
	2	22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
14	1	21	0.00	3.00	0.00	0.00	3.00	3.00	1.43	**0.0005**
	2	21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
21	1	21	0.00	3.00	0.00	0.00	3.00	3.00	1.29	**0.0013**
	2	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
28	1	21	0.00	3.88	3.00	0.00	3.00	3.00	1.93	**<0.0001**
	2	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
56	1	21	0.00	3.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.57	0.1069
	2	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
84	1	21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0000
	2	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
112	1	21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0000
	2	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
140	1	21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0000
	2	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
168	1	21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0000
	2	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI

[0717] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. NI = Not included in statistical analysis

[0718] Table 8.16 Summary of Serum PRRS qPCR Results (log_{10} GE/mL) from D179 to D189

Day	Group[1]	N	Min.	Max.	Median	95 % CI		QRange	Mean	p value
179 (DPC 0)	1	21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0000
	2	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
182 (DPC 3)	1	21	3.00	5.58	4.44	3.93	5.28	1.51	4.42	**<0.0001**
	2	20	5.09	6.33	5.88	5.75	6.00	0.32	5.81	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
186 (DPC 7)	1	21	0.00	3.74	0.00	0.00	0.00	0.00	0.61	**<0.0001**
	2	20	3.66	6.57	5.30	4.86	5.69	1.08	5.30	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
189 (DPC 10)	1	21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	**<0.0001**
	2	20	0.00	5.88	4.24	3.71	4.42	1.18	3.97	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
AUC DPC 0-10	1	21	10.50	31.22	15.54	13.76	19.53	5.95	17.61	**<0.0001**
	2	20	36.86	52.16	44.77	43.23	48.03	6.24	44.84	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
AUC DPC 3-DPC 10	1	21	6.00	23.45	8.88	7.86	11.16	3.40	10.97	**<0.0001**
	2	20	27.77	43.02	36.43	34.60	38.53	5.23	36.12	
	3	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI

[0719] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. NI = Not included in statistical analysis. AUC = Area under the curve; log_{10} GE/mL per day

[0720] Post-vaccination, the PRRS 94881 MLV group had significantly higher proportions of qPCR positive pigs on D7, D14, D21 and D28 compared with the challenge control group. (**p≤0.0013)**. No significant difference was detected between groups on D56 for the proportion of qPCR positive pigs (p=0.1069).

[0721] On D182 (DPC 3), 100% of pigs in the PRRS 94881 MLV and challenge control groups were qPCR positive (no test conducted). On D186 (DPC 7) and D189 (DPC 10), the PRRS MLV group had significantly lower proportion of qPCR positive pigs compared with the challenge control group **(<0.0001**).

[0722] Summaries of group proportions of qPCR positive data are shown below in Tables 8.17 and 8.18.

[0723] Table 8.17 Summary of Group Proportion of Serum qPCR Positive Results Post-Vaccination

Day	Group [1]	N Positive	% Positive	95 % CI		Total Number	p value
0	1	0	0	0.0	15.4	22	n.a.
	2	0	0	0.0	15.4	22	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
7	1	21	100	83.9	100.0	21	**<0.0001**
	2	0	0	0.0	15.4	22	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
14	1	10	48	25.7	70.2	21	**0.0005**
	2	0	0	0.0	16.1	21	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
21	1	9	43	21.8	66.0	21	**0.0013**
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
28	1	13	62	38.4	81.9	21	**<0.0001**
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
56	1	4	19	5.4	41.9	21	0.1069
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
84	1	0	0	0.0	16.1	21	n.a.
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
112	1	0	0	0.0	16.1	21	n.a.
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
140	1	0	0	0.0	16.1	21	n.a.
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
168	1	0	0	0.0	16.1	21	n.a.
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI

[0724] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. n.a. = no test conducted; NI = Not included in statistical analysis

[0725]

[0726] Table 8.18 Summary of Group Proportion of Serum qPCR Positive Results Post-Challenge

Day	Group [1]	N Positive	% Positive	95 % CI		Total Number	p value
179 (DPC 0)	1	0	0	0.0	16.1	21	n.a.
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
182 (DPC 3)	1	21	100	83.9	100.0	21	n.a.
	2	20	100	83.2	100.0	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
186 (DPC 7)	1	4	19	5.4	41.9	21	**<0.0001**
	2	20	100	83.2	100.0	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
189 (DPC 10)	1	0	0	0.0	16.1	21	**<0.0001**
	2	19	95	75.1	99.9	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI

[0727] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. n.a. = no test conducted; NI = Not included in statistical analysis

[0728] Clinical Observations Post-challenge

[0729] Abnormal respiration was not observed in any PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs after challenge, compared with one - challenge control pig (No. 149) which demonstrated a score of "1" on D185 (DPC 6). No difference was detected between groups for the percentage of pigs that demonstrated abnormal respiration for at least one day post-challenge (p=0.4878).

[0730] Abnormal behavior and coughing were not observed post-challenge in any PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs or in challenge control pigs.

[0731] The percentages of pigs with total clinical scores > 0 for at least one day post-challenge were 0% and 5% for the PRRS 94881 MLV-vaccinated group

and the challenge control group, respectively. These values were not significantly different (p=0.4878).

[0732] No clinical signs were observed in the negative control group from D179 to D189.

[0733] A summary of group frequencies of pigs with at least one positive clinical observation score during the post-challenge period is shown below in Table 8.19.

[0734] Table 8.19 Summary of Group Frequencies of Pigs with at least One Positive Clinical Observation Score Post-challenge

Parameter	Group[1]	N Positive	% Positive	95 % CI		Total Number[2]	p value
Respiration	1	0	0	0.0	16.1	21	0.4878
	2	1	5	0.1	24.9	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
Behaviour	1	0	0	0.0	16.1	21	NA
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
Coughing	1	0	0	0.0	16.1	21	NA
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
Total	1	0	0	0.0	16.1	21	0.4878
	2	1	5	0.1	24.9	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI

[0735] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. [2]One PRRS 94881 MLV pig and two challenge control pigs died pre-challenge and were not included in analysis. NI = Not included in statistical analysis; NA=test not applicable due to lack of variability

[0736] There was no difference between groups for maximum respiration scores or maximum total scores post-challenge (p=0.4878).

[0737] A summary of the group maximum clinical observation scores for the post-challenge period (DPC 1 through DPC 10) is shown below in Table 8.20.

[0738] Table 8.20 Summary of Group Post-Challenge Maximum Clinical Scores

Parameter	Group[1]	N[2]	Min.	Max.	Median	95 % CI		QRange	Mean	p value
Respira-tion	1	21	0	0	0	0	0	0	0.0	0.4878
	2	20	0	1	0	0	0	0	0.1	
	3	12	0	0	0	0	0	0	0.0	NI
Behav-iour	1	21	0	0	0	0	0	0	0.0	1.0000
	2	20	0	0	0	0	0	0	0.0	
	3	12	0	0	0	0	0	0	0.0	NI
Cough-ing	1	21	0	0	0	0	0	0	0.0	1.0000
	2	20	0	0	0	0	0	0	0.0	
	3	12	0	0	0	0	0	0	0.0	NI
Total	1	21	0	0	0	0	0	0	0.0	0.4878
	2	20	0	1	0	0	0	0	0.1	
	3	12	0	0	0	0	0	0	0.0	NI

[0739] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. [2]One PRRS 94881 MLV pig and two challenge control pigs died pre-challenge and were not included in analysis. NI = Not included in statistical analysis

[0740] Mean clinical observation scores followed a pattern similar to the percentage of pigs with positive clinical scores. There were no significant differences between the PRRS 94881 MLV-vaccinated group and the challenge control group ($p \geq 0.4878$).

[0741] A summary of the group mean clinical observation scores for the post-challenge period (DPC 1 through DPC 10) is shown below in Table 8.21.

[0742] Table 8.21 Summary of Group Post-Challenge Mean Clinical Scores

Parameter	Group[1]	N[2]	Min.	Max.	Median	95 % CI		QRange	Mean	p value
Respiration	1	21	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.4878
	2	20	0.0	0.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	
	3	12	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
Behaviour	1	21	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0000
	2	20	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	3	12	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
Coughing	1	21	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0000
	2	20	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	3	12	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI
Total	1	21	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.4878
	2	20	0.0	0.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	
	3	12	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NI

[0743] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. [2]One PRRS 94881 MLV pig and two challenge control pigs died pre-challenge and were not included in analysis. NI = Not included in statistical analysis

[0744] Body Weight and Average Daily Weight Gain

[0745] The difference between groups was not significant (p=0.2389). On D179 (DPC 0), mean and LS Mean body weights were 134.6 and 128.2 kg for the PRRS 94881 MLV group and the challenge control group, respectively. The difference was not significantly different (p=0.1090). On D188 (DPC 9), the mean and LS Mean body weights were 138.3 and 130.3 kg for the PRRS 94881 MLV group and the challenge control group, respectively. The body weight for the vaccinated group was significantly higher than the challenge control group on D188 (**p=0.0455**).

[0746] LS Mean ADWGs for the challenge period (DPC 0 through DPC 9) were 0.4 and 0.2 kg/d for the PRRS 94881 MLV group and the challenge control group, respectively. These values were not significantly different (p=0.1041).

[0747] Negative control pigs had mean body weights of 2.7, 117.2 and 120.0 kg on D0, D179 and D188, respectively. The ADWG for the negative control group from D179 to D188 was 0.5 kg/d.

[0748] A summary of the group mean body weights on D0, D179 (DPC 0) and D188 (DPC 9) and ADWG from DPC 0 to DPC 9 are shown below in Table 8.22. A summary of LS Mean and statistical analysis of body weights and ADWG for the PRRS 94881 MLV group and the challenge control group is shown below in Table 8.23.

[0749] Table 8.22 Summary of Group Body Weight and Average Daily Weight Gain (kg and kg/d)

Day(s)	Group[1]	N	Min.	Max.	Median	Mean	SD
0 Body Weights	1	22	2.8	5.4	4.00	3.96	0.730
	2	22	2.4	4.8	3.75	3.72	0.547
	3	12	2.7	4.5	3.60	3.71	0.552
D179 Body Weights (DPC 0)	1	21	108.5	155.0	136.60	134.57	12.737
	2	20	103.3	152.6	130.10	128.15	12.288
	3	12	117.2	156.5	133.05	134.61	10.900
D188 Body Weights (DPC 9)	1	21	112.2	157.8	141.50	138.28	12.879
	2	20	109.4	150.9	131.90	130.27	11.896
	3	12	120.0	162.5	136.60	139.11	11.922
ADWG DPC 0 to DPC 9	1	21	-0.422	0.956	0.4111	0.4124	0.31653
	2	20	-0.589	0.844	0.2889	0.2350	0.36530
	3	12	-1.600	2.656	0.5111	0.5000	0.92391

[0750] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group

[0751] Table 8.23 Summary of Group LS Mean Body Weight and Daily Gain (kg and kg/d)

Day(s)	Group[1]	LS Mean	95% confidence interval		p value
0 Body Weights	1	3.96	3.674	4.241	0.2389
	2	3.72	3.446	4.000	
	Diff. 1-2	0.23	-0.162	0.631	
D179 Body Weights (DPC 0)	1	134.57	129.040	140.093	0.1090
	2	128.15	122.487	133.813	
	Diff. 1-2	6.42	-1.496	14.329	
D188 Body Weights (DPC 9)	1	138.28	132.800	143.756	**0.0455**
	2	130.27	124.652	135.878	
	Diff. 1-2	8.01	0.170	15.856	
ADWG DPC 0 to DPC 9	1	0.4124	0.26180	0.56297	0.1041
	2	0.2350	0.08070	0.38930	
	Diff. 1-2	0.1774	-0.03822	0.39299	

[0752] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group

[0753] Rectal Temperatures

[0754] Mean rectal temperature for the PRRS 94881 MLV group was 39.3 ºC on the day of challenge (D179), and means ranged from 39.1 ºC (D189, DPC 10) to 39.8 ºC (D181, DPC 2) after challenge. Mean rectal temperature for the challenge control group was 39.1 ºC on the day of challenge, and means ranged from 39.1 ºC (D183, DPC 4) to 39.9 ºC (D182, DPC 3) after challenge. Mean rectal temperatures for negative control group remained ≤ 39.3 ºC throughout the same time period.

[0755] A summary of group rectal temperatures is shown below in Table 8.24.

[0756] Table 8.24 Summary of Group Rectal Temperature (ºC) Days D179 (DPC 0) through D189 (DPC 10)

Day	Group[1]	N[2]	Min.	Max.	Median	Mean	SD
D179 (DPC 0)	1	21	38.5	40.0	39.40	39.33	0.360
	2	20	38.6	40.0	39.00	39.07	0.380
	3	12	38.8	39.7	39.30	39.27	0.257
D180 (DPC 1)	1	21	38.7	40.4	39.40	39.46	0.370
	2	20	38.9	40.9	39.60	39.61	0.527
	3	12	38.8	39.5	39.00	39.09	0.227
D181 (DPC 2)	1	21	39.0	41.0	39.80	39.82	0.473
	2	20	38.6	40.5	39.35	39.42	0.487
	3	12	38.8	39.2	38.80	38.90	0.141
D182 (DPC 3)	1	21	38.5	40.6	39.50	39.52	0.542
	2	20	39.0	41.1	40.05	39.86	0.588
	3	12	38.7	39.4	39.00	39.05	0.254
D183 (DPC 4)	1	21	38.9	40.8	39.50	39.52	0.411
	2	20	38.4	40.3	39.00	39.08	0.508
	3	11	38.8	39.4	39.10	39.08	0.209
D184 (DPC 5)	1	21	39.0	40.3	39.70	39.72	0.360
	2	20	38.7	39.7	39.10	39.15	0.302
	3	12	38.8	39.5	39.10	39.10	0.191
D185 (DPC 6)	1	21	39.1	40.5	39.60	39.66	0.376
	2	20	38.9	40.9	39.25	39.48	0.546
	3	12	38.4	39.4	38.85	38.88	0.313
D186 (DPC 7)	1	21	38.1	40.4	39.20	39.22	0.413
	2	20	38.6	40.4	39.35	39.39	0.479
	3	12	38.5	39.6	38.90	38.98	0.328
D187 (DPC 8)	1	21	38.8	39.9	39.20	39.23	0.290
	2	20	38.8	40.8	39.45	39.58	0.573
	3	12	38.5	39.5	38.85	38.93	0.296
D188 (DPC 9)	1	21	38.8	39.9	39.10	39.17	0.288
	2	20	38.3	40.5	39.00	39.20	0.598
	3	12	38.4	39.1	38.85	38.85	0.173
D189 (DPC 10)	1	21	38.7	39.7	39.00	39.06	0.256
	2	20	39.0	40.8	39.50	39.51	0.408
	3	12	38.6	39.3	39.05	39.00	0.226

[0757] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. [2]One PRRS 94881 MLV pig and two challenge control pigs died pre-challenge and were not included in analysis

[0758] Least square Mean rectal temperatures were significantly higher for PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs compared to challenge controls on DPC 0 (**p=0.0281**), DPC 2 (**p=0.0095**), DPC 4 (**p=0.0034**) and DPC 5 (**p<0.0001**). Least square Mean rectal temperatures were significantly lower for PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs compared to challenge controls on DPC 8 (**p=0.0183**) and on DPC 10 (**p=0.0001**). No significant differences were detected between groups for the remaining days post-challenge (p≥0.0642). A summary of group LS Mean and statistical analysis of rectal temperature is shown below in Table 8.25.

[0759] Table 8.25 Summary of Group LS Mean Rectal Temperature (ºC) D179 (DPC 0) through D189 (DPC 10)

Day	Group[1]	LSMean	95 % confidence interval		p value
D179 (DPC 0)	1	39.33	39.170	39.496	**0.0281**
	2	39.07	38.903	39.237	
	Diff. 1-2	0.26	0.030	0.497	
D180 (DPC 1)	1	39.46	39.257	39.657	0.3025
	2	39.61	39.400	39.810	
	Diff. 1-2	-0.15	-0.434	0.138	
D181 (DPC 2)	1	39.82	39.612	40.036	**0.0095**
	2	39.42	39.198	39.632	
	Diff. 1-2	0.41	0.105	0.712	
D182 (DPC 3)	1	39.52	39.274	39.773	0.0642
	2	39.86	39.604	40.116	
	Diff. 1-2	-0.34	-0.693	0.021	
D183 (DPC 4)	1	39.52	39.320	39.727	**0.0034**
	2	39.08	38.867	39.283	
	Diff. 1-2	0.45	0.158	0.740	
D184 (DPC 5)	1	39.72	39.572	39.866	**<0.0001**
	2	39.15	38.999	39.301	
	Diff. 1-2	0.57	0.359	0.779	
D185 (DPC 6)	1	39.66	39.457	39.869	0.2164
	2	39.48	39.269	39.691	
	Diff. 1-2	0.18	-0.112	0.478	
D186 (DPC 7)	1	39.22	39.027	39.421	0.2408
	2	39.39	39.188	39.592	
	Diff. 1-2	-0.17	-0.448	0.116	
D187 (DPC 8)	1	39.23	39.034	39.432	**0.0183**
	2	39.58	39.376	39.784	
	Diff. 1-2	-0.35	-0.631	-0.062	
D188 (DPC 9)	1	39.17	38.966	39.377	0.8454
	2	39.20	38.989	39.411	
	Diff. 1-2	-0.03	-0.323	0.266	
D189 (DPC 10)	1	39.06	38.908	39.207	**0.0001**
	2	39.51	39.352	39.658	
	Diff. 1-2	-0.45	-0.662	-0.234	

[0760] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group

[0761]

[0762] Three of 21 (14%) PRRS 94881 MLV vaccinated pigs and 5 of 20 (25%) challenge controls had a rectal temperature ≥ 40.5 °C for at least one day post-challenge. No difference was detected between groups for the proportion of pigs that exhibited a rectal temperature ≥ 40.5 °C for at least one day post-challenge (p=0.4537). A summary of group proportion of pigs with pyrexia (≥ 40.5 °C) for at least one day post-challenge is shown below in Table 8.26.

[0763] Table 8.26 Summary of Group Proportion of Pyrexia (≥ 40.5 °C) for at Least One Day Post-Challenge

Day	Group[1]	N Positive	% Positive	95 % CI		Total Number[2]	p value
D180 (DPC 1) to D189 (DPC 10)	**1**	3	14	3.0	36.3	21	0.4537
	2	5	25	8.7	49.1	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI

[0764] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. [2]One PRRS 94881 MLV pig and two challenge control pigs died pre-challenge and were not included in analysis. NI = Not included in statistical analysis

[0765] Clinical Assessment Post-vaccination

[0766] Four of 22 (18%) PRRS 94881 MLV pigs, 8 of 22 (36%) challenge control pigs and 2 of 12 (17%) negative control pigs exhibited an abnormal clinical assessment for at least one day from D1 to D21. There was no significant difference between groups for this parameter (p=0.3102).

[0767] A summary of group percentage of pigs with at least one abnormal clinical assessment from D1 through D21 is shown below in Table 8.27.

[0768] Table 8.27 Summary of Group Percentage of Pigs with At Least One Abnormal Clinical Assessments from D1-D21

Group[1]	N Positive	% Positive	95 % CI		Total Number	p value
1	4	18	5.2	40.3	22	0.3102
2	8	36	17.2	59.3	22	
3	2	17	2.1	48.4	12	NI

[0769] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. NI = Not included in statistical analysis

[0770] Overall, 7 PRRS 94881 MLV pigs exhibited an abnormal clinical assessment for at least one day between D1 to D177:

[0771] Pig 121 exhibited belly swelling from D61 to D146, a swollen sheath from D147 to D167, belly swelling on D168, a swollen sheath from D169-172 and belly swelling from 173 to 177. Pig 141 was thin from D4-D10, was depressed from D4-D6 and rough hair coat on D5. Pig 144 exhibited coughing on D26. Pig 146 exhibited swelling on the sternum on D82. Pig 147 was weak on legs from D84-D86 and was shaking on D84. Pig 154 was thin from D4-D6. Pig 179 was thin from D2-D5, exhibited rough hair coat on D5 and was found dead on D6. Thirteen pigs in the challenge control group exhibited an abnormal clinical assessment for at least one day from D1 to D177: Pig 124 exhibited shaking and tremors on D20 and was found dead on D21. Pig 134 exhibited a swollen sheath from D46-D68, belly swelling from D69-D143, an umbilical hernia on D144, and belly swelling from D145 to D177. Pig 137 exhibited a swollen sheath from D108-D143. Pig 138 exhibited a swollen sheath from D115-D143. Pig 148 exhibited lameness or a swollen leg from D16-20 and coughing on D35. Pig 149 was thin from D5-D9 and on D12, and exhibited rough hair coat from D12-D15. Pig 150 was thin from D4-D9 and on D13, exhibited poor body condition from D10-D12, and was depressed on D11. Pig 161 was thin from D4-D9, exhibited rough hair coat and central nervous system signs on D9 and was found dead on D10. Pig 167 exhibited a swollen sheath from D117-D143. Pig 170 was thin from D4-D7 and exhibited depression on D7. Pig 172 exhibited a sore or a swollen dew claw from D120-D143. Pig 177 exhibited depression on D19 and swelling on the neck from D156-D159. Pig 178 exhibited depression on D5, from D17-20, and from D28-D36, was lame and/or

swollen leg from D15-D47, was thin from D16-D18, and was stiff on legs from D39-D47. Six pigs in the negative control exhibited an abnormal clinical assessment for at least one day from D1 to D177. Pig 120 exhibited coughing from D5-7 and on D12. Pig 126 was thin from D2-18, exhibited depression from D4-D5, on D10, and from D17-D19, rough hair coat on D5, and labored respiration from D18-D22. Pig 132 exhibited an abscess from D49-D56. Pig 145 exhibited a swollen sheath from D37-D43 and from D46 to D74, and a sore on the sheath from D75-D83 and from D85 to D87. Pig 151 exhibited lameness and/or a swollen leg from D78-D83 and on D85. Pig 155 exhibited an abscess on D69-D77.

[0772] Three mortalities occurred prior to challenge. Pig 179 (PRRS 94881 MLV, D6): Necropsy revealed minimal lesions (thin, poor body condition). Laboratory testing showed mild macrophagic interstitial pneumonia. Immunohistochemistry was negative for PRRS. Intestinal samples were autolysed but did not show evidence of severe necrosis or severe inflammation. Smooth *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp were isolated (Section 15.9). Pig 124 (Challenge control, D21): No gross lesions were identified at necropsy. Laboratory testing revealed severe suppurative to pyogranulomatous meningoencephalitis with suppurative perivasculitis. Marked pulmonary and hepatic congestion were also evident. The diagnosis was *Streptococcus suis* associated meningoencephalitis. Pig 161 (Challenge control, D10): Necropsy revealed minimal lesions (thin, poor body condition). *Bordetella bronchiseptica, Streptococcus* alpha haemolytic and *Staphylococcus auricularis* were isolated from lung tissues.

[0773] PRRS Serology

[0774] All pigs were PRRS ELISA negative on D0 and D7. By D14, 90% of PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs had positive PRRS ELISA titers. This number increased to 95% on D21 and was 100%, 100%, 100%, 90%, 100% and 95% on D28, D56, D84, D112, D140 and D168, respectively. None of the challenge control pigs developed PRRS antibody titers during the vaccination phase of this study, and from D14 through D168, a significantly higher percentage of PRRS

94881 MLV-vaccinated pigs had positive PRRS antibody titers compared to challenge controls (**p<0.0001**).

[0775] During the challenge phase of the study, the percentages of PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs with positive PRRS ELISA titers were 95%, 95%, 100% and 100% on DPC 0, DPC 3, DPC 7 and DPC10, respectively. In contrast, challenge control pigs did not develop PRRS antibody titers until DPC 7, when 30% had titers. This increased to 80% on DPC 10. The PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs had higher percentages of animals with positive PRRS antibody titers throughout the challenge phase of the study (**p≤0.0478**).

[0776] Pigs in the negative control group were PRRS ELISA seronegative throughout the study with the exception of two pigs on D112. Numbers 116 and 120 were PRRS ELISA seropositive on D112.

[0777] A summary of group percentages of pigs with positive PRRS-antibody titers before challenge is shown below in Table 8.28. Data from the challenge portion of the study are shown below in Table 8.29.

[0778] Table 8.27 Summary of Group Frequency of Pigs with Positive PRRS-Antibody Titer by Day, Days 0-168

Day	Group[1]	N Positive	% Positive	95 % CI		Total Number	p value
0	1	0	0	0.0	15.4	22	NA
	2	0	0	0.0	15.4	22	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
7	1	0	0	0.0	16.1	21	NA
	2	0	0	0.0	15.4	22	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
14	1	19	90	69.6	98.8	21	**<0.0001**
	2	0	0	0.0	16.1	21	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
21	1	20	95	76.2	99.9	21	**<0.0001**
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
28	1	21	100	83.9	100.0	21	**<0.0001**
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
56	1	21	100	83.9	100.0	21	**<0.0001**
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
84	1	21	100	83.9	100.0	21	**<0.0001**
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
112	1	19	90	69.6	98.8	21	**<0.0001**
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	2	17	2.1	48.4	12	NI
140	1	21	100	83.9	100.0	21	**<0.0001**
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
168	1	20	95	76.2	99.9	21	**<0.0001**
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI

[0779] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. NI = Not included in statistical analysis. NA = Not applicable, no analysis conducted

[0780] Table 8.29 Summary of Group Frequency of Pigs with Positive PRRS-Antibody Titer by Day, DPC 0 through DPC 10

Day	Group[1]	N Positive	% Positive	95 % CI		Total Number	p value
D179 (DPC 0)	1	20	95	76.2	99.9	21	**<0.0001**
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
D182 (DPC 3)	1	20	95	76.2	99.9	21	**<0.0001**
	2	0	0	0.0	16.8	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
D186 (DPC 7)	1	21	100	83.9	100.0	21	**<0.0001**
	2	6	30	11.9	54.3	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI
D189 (DPC 10)	1	21	100	83.9	100.0	21	**0.0478**
	2	16	80	56.3	94.3	20	
	3	0	0	0.0	26.5	12	NI

[0781] [1] Group 1 = PRRS 94881 MLV vaccine; Group 2 = Challenge control group; Group 3 = Negative control group. NI = Not included in statistical analysis.

[0782] DISCUSSION/CONCLUSION

[0783] To achieve the study objective, twenty-two (22) healthy, PRRS susceptible and seronegative pigs were inoculated IM with 1 mL of PRRS 94881 MLV at approximately 14 days of age. Thirty-four (22 pigs – challenge control group and 12 pigs – negative control group) PRRS susceptible and seronegative pigs were inoculated IM with 1 mL of control product at approximately 14 days of age.

[0784] Validation of the study and challenge model

[0785] Pigs in the negative control group remained negative for PRRSv (viremia; qPCR) throughout the study. Two pigs (Nos. 116 and 120) in the negative control group had positive ELISA titers on D112, while all other ELISA results for this group were negative. Considering that no viremia was detected in these pigs or in the group as whole; likewise, all other serum samples were ELISA negative, the results for these two pigs on D112 were considered false positives possibly due to an unassignable lab error. Thus, this was a valid study.

Unrelated to the establishment of a valid study, the negative control group had a median histological lung lesion score of 9.0 on D189 in contrast to a median gross lesion score of 0.0%. These data highlight that pigs housed under normal swine husbandry conditions for an extended period of time develop minor lung lesions that are inconsequential and not related to specific pathogens.

[0786] Following inoculation with European PRRS isolate 205817 by the method described earlier, the challenge control group exhibited a mean ADWG from DPC 0 to DPC 9 of 0.2 kg/day (a mean ADWG of 0.5 kg/day for the negative control group), a median gross lung lesion score of 13.8% (0.0% for the negative control group), a median histological lung lesion score of 19.5 (9.0 for the negative control group) and a median value of 6.25 $\log_{10}$ GE/mL for the detection of PRRSv RNA in lung tissue (median of 0.0 $\log_{10}$ GE/mL for negative control group). These results highlight that PRRS-specific clinical disease was induced in the challenge control group, thus validating this challenge model as an adequate clinical laboratory tool to evaluate PRRS vaccine efficacy and more specifically, 26 week duration of immunity of PRRS 94881 MLV.

[0787] Determination of 26 week duration of immunity of PRRS 94881 MLV

[0788] Determination of DOI for PRRS 94881 MLV of 26 weeks post-vaccination was based upon the vaccine group exhibiting a significant reduction ($p \leq 0.05$) in post-challenge lung lesions (gross or histological) compared with the challenge control group.

[0789] Gross and histological lung lesions were selected as the primary parameter for determination of 26 week DOI because this parameter provides the most clinically relevant and convincing evidence of efficacy when evaluating a new vaccine within the PRRS respiratory challenge model in pigs. Lung lesion development is one of the hallmarks of PRRS respiratory disease in pigs and can be considered the source for all subsequent manifestations of secondary PRRSv disease characteristics such as clinical signs, pyrexia, decreased ADWG, etc.

[0790] The PRRS 94881 MLV group exhibited a significant reduction in gross lung pathology post-challenge, as evidenced by a median gross lung lesion score of 0.1% in comparison to the challenge control group, which exhibited a median gross lung lesion score of 13.8% (**p<0.0001**). In addition, the PRRS 94881 MLV group exhibited a significant reduction in histological lung lesion scores, as evidenced by a median histology lung lesion score of 6.0 for the PRRS 94881 MLV group compared with a median histology lung lesion score of 19.5 for the challenge control group (**p<0.0001**). Thus, DOI of 26 weeks for PRRS 94881 MLV at dosage of 1 x $10^{4.27}$ $TCID_{50}$ was established based upon the primary parameter of a significant reduction for lung lesions post-challenge. This result was achieved with a vaccine dose slightly lower than the targeted minimum immunizing dose of 1 x $10^{4.5}$ $TCID_{50}$/mL. One challenge control pig (No. 123) could not be scored for gross lung lesions because of pleuritis and adhesions due to bacterial infections, but was scored for histological lung lesions. The omission of this pig from the challenge control group's gross lung lesion score analysis did not affect the outcome of this study.

[0791] Viremia post-challenge was selected as the most important secondary parameter because it represents the level of viral replication and persistence occurring within the host animal upon exposure. A significant reduction ($p \leq 0.05$) in viremia would correspond with a PRRS vaccine that induces adequate immunity to limit PRRS pathogenesis within the host. At 3, 7 and 10 days post-challenge, the PRRS 94881 MLV-vaccinated group demonstrated a significant reduction in viremia (qPCR) compared with the challenge control group (**p<0.0001**). To further evaluate post-challenge viremia between groups, the quantity of the viral load over a specific duration of time post-challenge was calculated, as represented as "area under curve" or AUC. The PRRS 94881 MLV-vaccinated group had a median AUC value from DPC 0 to DPC 10 of 15.54 log_{10} GE/mL/day; while the challenge control group had a median AUC value of 44.77 log_{10} GE/mL/day (**p<0.0001**). In addition, the PRRS 94881 MLV-vaccinated group had a median AUC value from DPC 3 to DPC 10 of 8.88 log_{10} GE/mL/day; while the challenge control group had a median AUC value for this period of 36.43 log_{10}

GE/mL/day (**p<0.0001**). Whether viremia was examined at specific time points post-challenge or over the course of the post-challenge period, PRRS 94881 MLV administered 26 weeks prior to challenge with a virulent heterologous European strain of PRRS significantly (p≤0.05) reduced viremia after challenge inoculation.

[0792] In association with a reduction of PRRS viremia post-challenge, a significant (p≤0.05) reduction in the viral load in lung tissue would also be of great importance from the standpoint of PRRS vaccine immunity. A reduction of viral load in the lung tissue may be associated with reduced viral stability, replication and persistence within the host and may secondarily lead to reduced shedding of PRRSv to other pigs. In this study, lung tissues from the PRRS 94881 MLV group had a median lung qPCR result of 3.69 $\log_{10}$ GE/mL 10 days post challenge (DPC 10) while the challenge control group had a median lung qPCR result of 6.25 $\log_{10}$ GE/mL. The difference between the vaccine group and the challenge control group was significant (**p<0.0001**), thus further supporting duration of immunity of 26 weeks.

[0793] A marked reduction in severity and frequency of clinical signs post-challenge in pigs would also be supportive of PRRS vaccine efficacy and establishment of DOI of 26 weeks for PRRS 94881 MLV. Only one pig exhibited clinical signs following challenge: pig 149 (challenge control) had a respiratory score of "1" (panting/rapid respiration) on D185. No pigs in the PRRS 94881 MLV-vaccinated group exhibited clinical signs during the post-challenge phase of this study and there were no statistical differences between the vaccinated and challenge control groups (p=0.4878 or no test conducted). Clinical signs post-challenge were not strong enough in this study to assess the DOI.

[0794] Pyrexia between groups varied post-challenge. PRRS 94881 MLV-vaccinated pigs exhibited significantly lower LS Mean rectal temperatures on two days (DPC 8 and DPC 10; (**p≤0.0183**) and higher LS Mean rectal temperatures on four days (DPC 0, DPC 2, DPC 4 and DPC 5; **p≤0.0281**) compared with challenge control pigs. Otherwise, no significant differences were detected between groups post-challenge (p≥0.0642). Although statistical differences between groups were

detected post-challenge, these differences were not biologically meaningful, considering that mean rectal temperatures remained ≤ 39.9 ºC (challenge control group, D182) for all groups. No difference was detected between groups with respect to the proportion of pigs with pyrexia for at least one day post-challenge (p=0.4537).

[0795] The presence of significant viremia, lung pathology and viral load in lung tissues due to PRRS in the challenge control group resulted in a significant (p≤0.05) difference between groups for body weight on DPC 9. In this study, the vaccinated and challenge control groups had LS mean body weights on DPC 9 of 138.3 kg and 130.3 kg, respectively (**p=0.0455**). The LS mean ADWG from DPC 0 to DPC 9 were 0.4 kg/day and 0.2 kg/day, for vaccinated and challenge groups, respectively. This difference was not statistically significant (p=0.1041).

[0796] Post-Vaccination Parameters Examined In This Study

[0797] Three pigs were found dead during the vaccination phase of this study. Pig 179 (PRRS 94881 MLV-vaccinated) was found dead on D6 associated with smooth *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. infections. Pig 161 (challenge control group) was found dead on D10 associated with *Bordetella bronchiseptica, Streptococcus* alpha haemolytic and *Staphylococcus auricularis* infections. Pig 124 (challenge control group) was found dead on D21 associated with a *Streptococcus suis* infection that lead to meningoencephalitis. To control and prevent any more deaths, pigs were mass treated with injectable vitamins and antibiotics. Following treatments, no more deaths occurred. Since deaths occurred in both treatment groups it can be assumed that the IVP itself was not associated with infections. More likely, pigs arrived at the research facility harboring these infections. Data for these pigs were included when available. Gross and histological lung lesion scores from these pigs were omitted from lung lesion analyses since these pigs died before challenge administration. The loss of one – PRRS 94881 MLV pig and two – challenge control pig during the extended time period from vaccination to challenge did not affect the outcome of the study.

[0798] No abnormal clinical assessments related to PRRS 94881 MLV vaccination or control product were observed in pigs following inoculation on D0. Seven pigs in the PRRS 94881 MLV-vaccinated group had abnormal assessments post-vaccination; while thirteen challenge control pigs had abnormal assessments. Excluding the three pigs that died due to bacterial infections, these abnormal assessments included thinness, coughing, swellings, rough hair coat, depression, abscesses and poor body condition at various time points, none of which lasted an extended period of time. In the author's opinion, these findings were not related to the administration of either experimental product, but rather are typical findings in growing/maturing pigs, under group housing situations, over an extended period of time.

[0799] All pigs were PRRS ELISA serology negative on D0, thus confirming that all pigs met the inclusion criterion of being PRRS sero-negative upon entry into the study. The majority of pigs (90%) receiving PRRS 94881 MLV sero-converted to PRRS by D14 and all PRRS-vaccinated pigs were seropositive by D28. Conversely, the challenge control pigs remained seronegative until 7 days post-challenge, when this group began to demonstrate PRRS seroconversion. As covered earlier, two – negative control pigs were PRRS ELISA seropositive on D112, which was considered an incidental finding, possible due to an unassignable lab error.

[0800] At 7, 14, 21 and 28 days post-vaccination, the PRRS 94881 MLV-vaccinated group exhibited median qPCR results of 3.00, 0, 0 and 3.00 $\log_{10}$ GE/mL, respectively. These results highlight that within 4 weeks post-vaccination, a dosage of $1 \times 10^{4.27}$ $TCID_{50}$ of PRRS 94881 MLV induced sufficient replication of the MLV that is often required to build protective immunity already at 4 weeks after vaccination. Conversely, the challenge control group was negative for PRRS viremia until three days post-challenge.

[0801] Conclusion

[0802] A significant reduction ($p \leq 0.05$) of gross and histological lung lesions at necropsy, viral load in lung tissues at necropsy and viremia post-challenge for

the PRRS 94881 MLV group compared to challenge control group demonstrated vaccine efficacy against virulent PRRSv when vaccinated at 2 weeks of age and challenged 26 weeks post-vaccination. The results of this study therefore support the demonstration of duration of immunity of 26 weeks post-vaccination with PRRS 94881 MLV. These results were achieved with a vaccine dose of $1 \times 10^{4.27}$ $TCID_{50}$/mL, which was slightly lower than the minimum immunizing dose ($1 \times 10^{4.5}$ $TCID_{50}$/mL).

[0803]

[0804] The sequences of the PRRSV 94881 attenuated strain and the parental strain are as follow:

SEQ ID NO:1: FULL LENGTH NUCLEOTIDE SEQUENCE OF PRRS Master Seed Virus of 94881

```
   1 TTTGTGTACC TTGGAGGCGT GGGTACAGCC CTGCCCCACC CTTTGGTCCC TGTTCTAGCC
  61 CGACAAGTAC CCTTCTCTCT CGGGGCGAGC GCGCCGCCTG CTGCTCCCTT GCGGCGGGAA
 121 GGACCTCCCG AGTATTTCCG GAGAGCACCT GCTTTACGGG ATCTCCGCCC TTTAACCATG
 181 TCTGGGATGT TCTCCCGGTG CATGTGCACC CCGGCTGCCC GGGTATTTTG GAACGCCGGC
 241 CAAGTCTATT GCACACGGTG TCTCAGTGCA CGGTCTCTTC TCTCTCCAGA ACTTCAGGAC
 301 ACGGACCTCG GTGCAGTTGG CTTGTTTCAC AAGCCTAAAG ACAAGCTCCA TTGGAAAGTT
 361 CCCATTGGTA TCCCCCAGGT GGAATGTTCT CCATCTGGGT GTTGCTGGCT GTCAACCATT
 421 TTTCCTTTAG CGCGCATGAC CTCCGGCAAT CACAACTTCC TTCAACGACT CGTGAAGGTT
 481 GCTGATGTAT TGTACCGTGA CGGTTGCTTA ACCCCTAGAC ACCTCCGTGA ACTCCAAGTT
 541 TACGAGCGTG GTTGCAATTG GTATCCGATT ACGGGGCCTG TGCCTGGGAT GGCTGTGTAC
 601 GCGAACTCCA TGCACGTGTC CGACCAACCG TTCCCTGGTG CCACTCATGT GTTAACAAAT
 661 TCCCCTTTGC CTCAACGGGC TTGTCGGCAG CCGTTCTGTC CGTTCGAAGA GGCCCATTCT
 721 AGCATATACA GGTGGGAAAA ATTTGTAATT TTTATGGATT CCTCCTCCGA CGGTCGATCT
 781 CGCATGATGT GGACTCCGGA ATCCGATGAC TCCACGGCTT TGGAAGTTCT GCCGCCCGAG
 841 CTAGAACACC AGGTCAAGGT CCTTGTTCGG AGCTTTCCCG CCCATCACCT TGTCGACCTT
 901 GCCGATTGGG AGCTCACTGA GTCCCCTGAT AACGGTTTTT CCTTCAGCAC GTCACATCCT
 961 TGCGGCTACC TTGTTCGGGA CCCGGCTGTA TCCGAAGGCA AGTGTTGGCT TTCCTGCTTT
1021 TTGAGCCAGT CAGCCGAAGT GCTCAGTCGC GAGGCGCATC TGGCTACCGC CTATGGTTAC
1081 CAAACCAAGT GGGGTGTGCC TGGCAAGTAC ATCCAGCGCA GACTTCAAGT TCACGGTCTC
1141 CGTGCTGTGG TCGACCCTGA TGGTCCCATT CACGTTGAAG CATTGTCTTG CCCCCAGTCT
1201 TGGATCAGGC ACTTGACCCT GAATGATGAT GTCACCCCGG GATTCGTTCG CCTAATGTCT
1261 CTTCGCATTG TGCCGAACAC AGAGCCTACC ACACACCGGA TCTTTCGTTT TGGAGTGCAC
1321 AAGTGGTATG GTGCCGCCGG CAAACGGGCC CGTGGCAAGC GTGCCGCCAA AAGTGAGAAA
1381 GACTCGGCTT CCACCCTCAA GGTTGCCCGA CCGACTTCCA CCAGTGGAAT CGTCACCTAC
1441 TCCCCACCTG CGGACGGGTC TTGTGGTTGG CATGCCCTTG CCGCCATACT GAACCGGATG
1501 ATTAATAATG ACTTCACGTC CCCTCTGCCT CGGTACAACA GGCCGGAGGA CGATTGGGCT
1561 TCTGATGGTG ACCTTGCTCA GGCCATTCAA TGTTTGCAAC TACCTGCCGC CATAGCTCGG
1621 AACCGCGCCT GCCCTAACGC CAAATACCTC ATAAAACTCA ACGGAGTTCA TTGGGAGGTA
1681 GAGGTGAGGC CTGGAATGGC TCCTCGCTCC CTCTCTCGTG AGTGCGTTGT TGGCGTCTGC
1741 TCTGAAGGCT GTGTCGCGTC GCCTTACCCG GAGGACGGGT TGCCTAAACG TGCACTTGAG
1801 GCCCTGGCGT CTGCTTATAG ACTGCCTTCA GACTGTGTTT GTGATGGTAT TATTGACTTC
1861 CTTGCCAATC CACCTCCCCA GGAGTTCTGG ACTCTTGACA AAATGTTGAC TTCCCCGTCA
1921 CCGGAGCAGT CCGGCTTCTC TAGTCTGTAT AAATTGTTGT TAGAGATCTT GCCGCAGAAA
1981 TGCGGATCCA CAGAAGGGGA ATTCATCTAT ACTGTTGAGA GGATGTTGAA GGATTGTCCG
2041 AGCTCCAAAC AGGCCATGGC CCTCCTTGCA AAAATTAAGG TCCCATCCTC AAAGGCCCCA
2101 TCCGTGACTC TGAACGAGTG CTTCCCCACG GATGTTCCAG TCAACTCTGA GTTAATATCT
2161 TGGGAAGAGC CCAAAGACCC TGGCGCTGCT GTTGTCCTAT GTCCATCGGA TGCAAAAGAA
2221 TCTAAGGAAA CAGCCCCTGA AGAAGCTCAA GCGAGAAACC GTAAGGTCCT TCACCCTGTG
2281 GTCCTTACCG AGGAACTTAG CGAGCAACAG GTGCAGGTGG TTGAGGGTGA TCAGGATATG
2341 CCACTGGATT TGACTTGGCC AACCTTAACC GCTACGGCGA CCCCTGTTAG AGGGCCGGTA
2401 CCGGACAATT TGAGCTCTGG CATTGGTGCC CAGCCCGCTA CCGTTCAAGA ACTCATTCTG
2461 GCGAGGCCTG CACCCCGTCT TGTTGAGCGC TGTGGCACGG AGTCGAACGG CAGCAGTTCA
2521 TTTCTGGATT TGCCTGACGT GCAGACCTCG GACCAGCCTT TAGACCTGTC CCTGGCCGCG
```

```
2581 TGGCCTGTAA GGGCTACCGC GTCTGACCCC GGTTGGATCC ACGGTAGGCG TGAGCCTGTC
2641 TTTGTGAAGC CTCGAGGTGT TTTCTCTGAT GGCGAGTCGG CCCTTCAGTT CGGAGAGCTT
2701 TCCGAAGCCA GTTCTGTCGT CGATGACCGG ACAAAAGAAG CTCCGGTGGT TGACGCCCCC
2761 ATCGATTTGA CAACTTCGAA CGAGACGCTC TCTGGGTCTG ACCCCTTTGA ATTCGCCAAA
2821 TTCAGGCGCC CGCGTTTCTC CGCGCAAGCT TTAATCGACC GAGGTGGTCC GCTTGCCGAT
2881 GTTCATGCAA AGATAAAGAG TCGGGTATAT GAACAATGCC TTCAAGCTTG TGAACCTGGT
2941 AGTCGTGCGA CCCCAGCCAC CAAGAAGTGG CTCGACAAAA TGTGGGACAG GGTGGACATG
3001 AAAACTTGGC GCTGCACCTC GCAGTTCCAA GCTGGTCACA TTCTTGAGTC CCTCAAATTC
3061 CTCCCTGACA TGATTCAAGA CACACCGCCT CCTGTTCCCA GGAAGAACCG AGCTGGTGAC
3121 AGTGCCGGCC TGAAGCAACT GGTGGCGCAG TGGGATAGGA AATCGAGTGT GACACCCCCC
3181 ACAAAACCGG TTGGACCGGT GCTTGACCAG GCCGTCCCTC TGCCTATGGA CATCCAGCAA
3241 GGAGATGCCA TCTCCGCTGA CAAGCCACCC CATTCGCAAA ACCCTTCTAG TCAAGTAGAT
3301 GTGGGTGGAG GTTGGAAAAG TTTTATGCTC TCCGGCACCC GTTTCGCGGG GTCCGTTAGT
3361 CAGCGCCTTA CGACATGGGT TTTTGAGGTT CTCTCCCATC TCCCAGCTTT TATGCTCACA
3421 CTTTTCTCGC CACGGGGCTC TATGGCTCCA GGTGATTGGC TGTTTGCAGG TGCTGTTCTA
3481 CTTGCTCTCC TGCTCTGCCG TTCTTACCCA ATACTCGGAT GCCTTCCCTT ATTGGGTGTC
3541 TTTTCTGGTT CTGTGCGGTG TGTTCGTTTG GGTGTTTTTG GTTCTTGGAT GGCTTTTGCT
3601 GTATTTTTAT TCTCGACTCC ACCCGACCCA GTCGGTTCTT CTTGTGACCA CGATTCGCCG
3661 GAGTGTCATG CTGAGCTTTT GGCTCTTGAG CAGCGCCAAC TTTGGGAACC TGTGCGCAGC
3721 CTTGTGGTCG GGCCATCGGG CCTCTTATGC GTCATTCTTG GCAAGTTACT CGGTGGGTCA
3781 CGTTGTCTCT GGTTTGTTCT CCTACGTATA TGCATGCTCG CAGATTTGGC AATTTCTCTT
3841 ATTTATGTGG TGTCCCAAGG GCGTTGTCAC AAGTGTTGGG GAAAGTGTAT AAGGACGGCT
3901 CCTGCAGAAG TGGCCCTTAA TGTGTTTCCT TTTTCGCGCG CCACCCGCTC ATCTCTTGTG
3961 TCCTTGTGTG ATCGGTTCCA AGCGCCAAAA GGAGTTGACC CCGTGCACTT GGCGACAGGC
4021 TGGCGCGGGT GCTGGTGTGG TGAGAGCCCT ATTCATCAAT CACACCAAAA ACCGATAGCT
4081 TATGCCAACT TGGATGAAAA GAAGATATCC GCCCAGACGG TGATTGCTGT CCCGTATGAT
4141 CCTAGTCAGG CCATTAAATG CCTGAAAGTT TTGCAGGCAG GAGGGGCTAT TGTGGACCAG
4201 CCTACGCCCG AGGTCGTCCG TGTGTCTGAG ATTCCCTTCT CGGCCCCATT TTTTCCGAAG
4261 GTCCCAGTCA ACCCAGACTG CAGGGTTGTG GTAGATTCGG ACACTTTTGT GGCTGCGGTC
4321 CGCTGCGGTT ATTCGACAGC ACAACTGGTC CTTGGTCGGG GCAACTTTGC CAAGCTAAAT
4381 CAGACCCCCC TCAGGAACTC TGTCCCCACC AAAACAACTG GTGGGGCCTC ATACACCCTT
4441 GCCGTGGCCC AGGTATCTGT GTGGACTCTT GTTCATTTCA TCCTCGGCCT TTGGTTAACG
4501 TCACCTCAAG TGTGTGGTCG AGGGACCTCT GACCCGTGGT GTTCGAACCC TTTTTCGTAT
4561 CCTACTTATG GCCCCGGAGT TGTGTGTTCC TCTCGACTCT GCGTGTCTGC CGACGGAGTT
4621 ACCCTGCCAT TGTTCTCAGC CGTTGCCCAT CTTTCCGGTA GAGAGGTGGG GATTTTTATT
4681 TTGGTGCTTG CCTCCTTGGG CGCTTTAGCC CACCGCTTGG CTCTTAAGGC AGACATGTCA
4741 ATGGTCTTTT TGGCGTTTTG TGCTTACGCC TGGCCCATGA GCTCCTGGTT AATTTGCTTC
4801 TTTCCTATGC TCTTGAGGTG GGTAACCCTT CATCCTCTCA CTATGCTTTG GGTGCACTCA
4861 TTTTTGGTGT TTTGCCTACC AGCTGCCGGC GTTCTCTCGC TGGGAATAAC CGGTCTTCTT
4921 TGGGCAGTTG GCCGTTTCAC CCAGGTTGCC GGAATTATCA CACCTTATGA CATCCACCAG
4981 TATACCTCCG GACCACGTGG TGCAGCTGCT GTAGCAACGG CTCCAGAAGG TACTTACATG
5041 GCGGCCGTTC GGAGAGCCGC TTTGACTGGA CGGACTTTGA TCTTCACACC ATCTGCAGTC
5101 GGATCCCTTC TTGAAGGTGC TTTCAGAACT CAAAAGCCCT GCCTTAACAC CGTGAATGTC
5161 GTAGGCTCTT CCCTTGGTTC TGGAGGAGTT TTCACCATTG ATGGCAGAAG AGTCATCGTC
5221 ACTGCCACCC ATGTGTTGAA TGGTAACACA GCCAGGGTCA CTGGTGATTC CTACAACCGC
5281 ATGCACACGT TCAATACTAA TGGTGATTAT GCCTGGTCCC ATGCTGATGA CTGGCAAGGC
5341 GTTGCCCCTA TGGTTAAGAT CGCTAAGGGG TATCGCGGTC GTGCCTACTG GCAAACGTCA
5401 ACCGGAGTCG AACCTGGCAT CATGGGGGAA GGATTCGCCT TCTGTTTCAC TAACTGTGGC
5461 GACTCAGGGT CACCTGTCAT TTCAGAAGCT GGTGACCTTA TTGGAGTCCA TACCGGTTCA
5521 AACAAACTCG GTTCTGGTCT TGTGACAACC CCTGAAGGGG AGACCTGCTC CATCAAGGAA
5581 ACTAGGCTCT CTGACCTTTC TAGACATTTT GCAGGTCCAA GCGTCCCTCT TGGGGACATT
5641 AAGTTGAGCC CAGCCATCAT CCCTGATGTG ACAACTATTC CGAGTGACTT GGCATCGCTC
```

```
5701 CTTGCTTCTG TCCCCGTGAT GGAAGGTGGC CTCTCAACTG TCCAGCTTTT GTGCGTCTTT
5761 TTCCTTCTCT GGCGCATGAT GGGCCATGCC TGGACACCCA TTGTTGCCGT AGGCTTCTTT
5821 TTGCTGAATG AAATTCTCCC AGCAGTCTTG GTCCGAGCTG TGTTCTCTTT TGCACTCTTT
5881 GTACTTGCAT GGGCCACCCC CTGGTCGGCA CAAGTGTTGA TGATTAGACT CCTCACGGCG
5941 GCTCTCAACC GCAACAGGTT GTCCCTGGCG TTCTACGCAT TCGGAGGTGT CGTTGGCCTG
6001 GCCACAGAAA TCGGGACTTT TGCTGGTGGA TGGCCTGAAC TGTCCCAAGC CCTCTCGACA
6061 TACTGCTTCC TGCCCAGGTT CCTTGCTGTG ACTAGTTATG TCCCCACCAT CATCATCGGT
6121 GGGCTCCATG CCCTCGGCGT AATTTTGTGG TTATTCAAAT ACCGATGCCT CCACAACATG
6181 CTGGTTGGTG ATGGGAGTTT CTCAAGCGCT TTCTTCCTAC GGTATTTTGC TGAGGGTAAT
6241 CTTAGGAAAG GCGTGTCGCA GTCCTGTGGC ATGAATAACG AATCCCTGAC AGCTGCTTTG
6301 GCTTGCAAGT TGTCGCAAGC TGACCTTGAT TTTTTGTCCA GTTTAACGAA CTTCAAGTGC
6361 TTTGTGTCCG CTTCAAACAT GAAAAATGCA GCTGGCCAAT ACATCGAGGC GGCGTATGCT
6421 AGAGCTCTGC GTCAGGAGCT GGCCTCCTTG GTTCAGGTTG ACAAGATGAA AGGAGTATTG
6481 GCCAAGCTCG AGGCTTTCGC TGAGACGGCC ACTCCGTCAC TTGACACAGG GGACGTGATT
6541 GTTCTGCTTG GGCAACACCC CCATGGATCC ATCCTCGACA TTAATGTGGG GGGTGAAAGG
6601 AAAACTGTGT CTGTGCAAGA AACACGATGC CTGGGTGGTT CCAAATTCAG TGTCTGCACT
6661 GTCGTGTCCA ACACGCCCGT GGATACCTTG ACCGGTATCC CACTTCAGAC GCCAACCCCA
6721 CTTTTTGAAA ATGGCCCGCG CCATCGCAGC GAGGACGACG ACCTCAAAGT TGAGAGAATG
6781 AAAAAACACT GTGTATCCCT CGGCTTCCAC AAAATCAATG GTAAAGTTTA CTGCAAAATT
6841 TGGGACAAGT CTAACGGCGA CACCTTTTAC ACGGATGATT CCCGATACAC TCAAGACCAT
6901 GCTTTTCAGG ACAGGTCAAC CGACTATAGA GACAGGGATT ATGAAGGTGT ACAGACCGCC
6961 CCCCAACAGG GATTCGATCC AAAGTCCGAA GCCCCTGTTG GCACTGTTGT AATCGGTGGC
7021 ATTACGTATA ACAGGCATCT GGTCAAAGGT AAGGAGGTCC TAGTTCCCAA ACCTGACAAC
7081 TGCCTTGAAG CTGCCAGACT GTCCCTTGAG CAAGCTCTTG CTGGGATGGG CCAAACTTGT
7141 GACCTTACAG CTACCGAAGT GGAGAAACTA AAGCGCATCA TTAGTCAACT CCAAGGTCTG
7201 ACCACTGAAC AGGCTTTAAA CTGCTAGCCG CCAGCGGCTT GACCCGCTGT GGCCGCGGCG
7261 GCCTAGTTGT AACTGAAACG GCGGTAAAAA TCGTAAAATA CCACAGCAGA ACTTTCACCT
7321 TAGGCTCTTT AGACCTAAAA GTCACCTCCG AGGTGGAGGT GAAGAAATCA ACTGAGCAGG
7381 GGCACGCTGT CGTGGCGAAC TTATGTTCCG GTGTCGTCTT GATGAGGCCT CACCCACCGT
7441 CCCTTGTTGA CGTTCTCCTC AAACCCGGAC TTGACACAAC ACCCGGCATT CAACCAGGGC
7501 ATGGGGCCGG GAATATGGGC GTGAACGGTT CTATTTGGGA TTTTGAAACT GCACCCACAA
7561 AGGTAGAACT AGAGTTGTCC AAGCAAATAA TCCAAGCATG TGAAGTCAGG CGCGGGGACG
7621 CCCCTAACCT CCAACTCCCC TACAAGCTTT ATCCTGTCAG GGGGGACCCC GAGCGGCGTA
7681 AAGGTCGCCT TGTCAACACT AGGTTTGGAG ATTTACCTTA CAAAACTCCC CAAGACACCA
7741 AGTCCGCAAT TCATGCGGCT TGTTGCCTGC ATCCCAATGG GGTCCTCGTG TCTGATGGCA
7801 AATCCACGCT GGGTACCACT CTTCAACATG GTTTCGAGCT TTATGTCCCC ACTGTACCTT
7861 ATAGTGTCAT GGAATACCTT GATTCACGCC CTGACACCCC TTTTATGTGT ACTAAACATG
7921 GCACTTCCAA GGCTGCTGCA GAGGACCTCC AAAAATATGA CCTATCCACT CAAGGGTTTG
7981 TCTTGCCTGG GGTCCTACGC CTAGTGCGCA GGTTCATCTT TAGCCATGTT GGTAAGGCGC
8041 CACCACTGTT CCTTCCATCA ACCTACCCTG CCAAGAACTC CATGGCAGGG GTCAATGGCC
8101 AGAGGTTCCC AACAAAGGAT GTCCAGAGCA TACCTGAAAT TGATGAAATG TGCGCCCGTG
8161 CCGTCAAGGA AAATTGGCAG ACTGTGACAC CTTGCACCCT CAAAAAACAG TACTGTTCCA
8221 AACCTAAAAC TAGAACCATC CTAGGTACCA ACAACTTCAT AGCCTTGGCT CACAGGTCAG
8281 CACTCAGTGG TGTCACCCAG GCGTTCATGA AGAAGGCCTG GAAGTCCCCA ATTGCCTTGG
8341 GGAAAAACAA GTTTAAGGAA TTGCATTGCA CTGTCGCCGG CAGATGCCTT GAGGCTGACC
8401 TGGCTTCCTG CGATCGCAGC ACCCCCGCCA TTGTGAGGTG GTTTGTTGCC AACCTCCTGT
8461 ATGAACTTGC AGGATGTGAA GAGTACTTGC CTAGCTACGT GCTCAACTGT TGCCATGACC
8521 TTGTGGCAAC GCAGGATGGC GCTTTCACAA AACGCGGTGG CCTGTCGTCC GGGGACCCCG
8581 TCACCAGTGT GTCCAACACC GTCTACTCAC TGATAATTTA CGCCCAGCAC ATGGTGCTTT
8641 CGGCCTTGAA GATGGGTCAT GAAATTGGTC TCAAGTTCCT TGAGGAACAG CTCAAATTTG
8701 AGGACCTTCT TGAAATCCAG CCCATGTTAG TGTATTCTGA TGACCTCGTC TTGTATGCGG
8761 AAAGACCCAC TTTTCCCAAC TACCATTGGT GGGTCGAGCA TCTTGACCTG ATGTTGGGCT
```

```
 8821 TTAAAACGGA CCCAAAGAAA ACTGTCATAA CTGATAAACC CAGTTTTCTC GGCTGCAGAA
 8881 TTGAAGCAGG ACGGCAGTTA GTCCCCAATC GCGACCGTAT TCTGGCTGCT CTTGCATATC
 8941 ATATGAAGGC GCAGAACGCC TCAGAGTATT ATGCGTCCGC TGCCGCAATT CTGATGGATT
 9001 CGTGTGCTTG CATTGACCAT GACCCCGAGT GGTATGAGGA TCTTATCTGC GGCATCGCCC
 9061 GGTGTGCTCG CCAGGACGGT TACCGTTTTC CAGGCCCGGC ATTTTTCATG TCCATGTGGG
 9121 AGAAGCTGAA AAGTCATAAT GAAGGGAAGA AATGCCGTCA CTGCGGCATC TGCGACGCCA
 9181 AAGCCGACTA TGCGTCCGCC TGTGGACTTG ATTTGTGTTT GTTCCATTCA CACTTTCATC
 9241 AACACTGCCC AGTCACTCTG AGCTGTGGCC ACCATGCCGG TTCAAAGGAA TGTTCGCAGT
 9301 GTCAGTCACC TGTCGGGGCT GGCAAATCCC CCCTTGACGC TGTGCTGAAA CAAATCCCGT
 9361 ACAAACCTCC TCGTACCATT ATCATGAAGG TGGACAACAA AACAACGACC CTTGACCCGG
 9421 GAAGATATCA GTCCCGTCGA GGTCTTGTTG CAGTCAAAAG AGGTATTGCA GGTAATGAGG
 9481 TTGATCTTTC TGATGGAGAC TACCAAGTGG TGCCTCTTTT GCCGACTTGC AAAGACATAA
 9541 ACATGGTGAA GGTGGCTTGC AACGTACTAC TCAGCAAGTT TATAGTAGGG CCGCCAGGTT
 9601 CCGGAAAAAC CACCTGGCTA CTGAACCAAG TCCAGGACGA TGATGTCATT TACACACCTA
 9661 CTCATCAGAC AATGTTTGAC ATAGTCAGTG CTCTTAAAGT TTGCAGGTAT TCCATCCCAG
 9721 GAGCCTCAGG ACTCCCTTTT CCACCACCTG CCAGGTCCGG GCCGTGGGTT AGGCTCATCG
 9781 CCAGCGGACA TGTCCCTGGC CGAGTGTCAT ATCTCGATGA GGCAGGATAT TGCAATCATC
 9841 TAGACATTCT AAGGCTGCTT TCCAAAACAC CCCTTGTGTG TTTGGGTGAC CTTCAGCAAC
 9901 TTCACCCGGT CGGCTTTGAT TCCTATTGTT ATGTGTTCGA TCAGATGCCT CAGAAGCAGC
 9961 TGACCACCAT TTATAGATTT GGCCCTAACA TCTGTGCAGC CATCCAGCCT TGTTACAGGG
10021 AGAAACTTGA ATCCAAGGCC AGGAACACCA GAGTGGTTTT CACCACCCGG CCTGTGGCCT
10081 TTGGTCAGGT CCTGACACCG TACCACAAAG ATCGTACCGG CTCTGCAATA ACTATAGATT
10141 CATCCCAGGG GGCGACCTTC GACATTGTGA CATTGCATCT ACCATCGCCA AAGTCCCTAA
10201 ACAAATCCCG AGCACTTGTA GCCATCACTC GGGCAAGACA TGGGTTGTTC ATTTATGACC
10261 CTCATGACCA ACTCCAGGAG TTTTTCAACT TAACCCCCGA GCGCACTGAT TGTAACCTTG
10321 CGTTCAGCCG TGGGGATGAG CTGGTTGTTT TGAATGTGGA TAATGCGGTC ACAACTGTAG
10381 CGAAGGCCCT AGAGACAGGT TCACCCCGAT TTCGAGTATC GGACCCGAGG TGCAAGTCTC
10441 TCTTAGCCGC TTGTTCGGCC AGTCTAGAAG GGAGCTGCAT GCCACTACCA CAAGTAGCAC
10501 ATAACCTGGG GTTTTACTTT TCCCCGGACA GCCCAGCTTT TGCACCCCTG CCAAAAGAGC
10561 TGGCGCCACA TTGGCCAGTG GTCACCCACC AGAATAATCG AGCGTGGCCT GATCGACTTG
10621 TCGCTAGTAT GCGCCCAATT GATGCCCGCT ACAGCAAGCC AATGGTCGGT GCAGGGTATG
10681 TGGTCGGGCC ATCCATTTTT CTTGGCACTC CTGGTGTGGT GTCATACTAT CTCACATTAT
10741 ACATCGGGGG CGAGCCTCAG GCCCTGCCAG AAACACTCGT TTCAACAGGA CGTATAGCCA
10801 CAGATTGTCG GGAATATCTC GACGCGGCTG AGGAAGAGGC AGCGAGAGAA CTTCCCCACG
10861 CATTTATTGG CGATGTCAAA GGCACTACGA TCGGGGGGTG TCACCACATT ACATCGAAAT
10921 ACCTACCTAG GTCCCTGCCT AAAGACTCTG TTGCTGTGGT TGGGGTGAGT TCGCCCGGTA
10981 GGGCTGCTAA AGCCGTGTGC ACTCTCACCG ATGTGTACCT CCCCGAACTC CGACCATATT
11041 TGCAACCGGA GACGGCATCA AAATGCTGGA AACTTAAACT GGATTTCAGG GATGTTCGAC
11101 TGATGGTCTG GAAAGGCGCC ACAGCCTATT TCCAGTTGGA AGGGCTGACA TGGTCAGCGC
11161 TGCCCGATTA TGCTAGGTTC ATTCAGCTAC CCAAGGATGC CGTTGTGTAC ATCGATCCGT
11221 GTATAGGGCC GGCAACAGCC AATCGCAAGG TTGTGCGAAC CACAGACTGG CGGGCCGACC
11281 TGGCAGTGAC ACCGTATGAT TACGGTGCTC AGGTCATTTT GACAACAGCC TGGTTCGAGG
11341 ACCTTGGGCC GCAGTGGAAG ATTTTGGGGT TGCAGCCTTT CAGACGAACA TTTGGCTTTG
11401 AGAACACTGA AGATTGGGCA ATTCTCGCAC GCCGTATGAA TGACGGCAAA GATTACACTG
11461 ACTATAATTG GCATTGTGTA CGAGAACGCC CACACGCAAT TTACGGGCGC GCCCGTGACC
11521 ATACGTATCA TTTTGCCCTT GGCACTGAAC TGCAAGTAGA GCTGGGCAGA CCCCGGCTGC
11581 CTCCTGAGCA AGTGCCGTGA ACGCGGAGTG ATGCAATGGG TTTACTGTGG AGTAAAATCA
11641 GTCAGTTGTT CGTGGATGCC TTCACTGAGT TCCTTGTTAG TGTGGTTGAC ATTGTCATCT
11701 TTCTCGCCAT ATTGTTTGGG TTCACTGTTG CAGGCTGGTT ATTGGTCTTC CTTCTCAGAG
11761 TGGTTTGCTC CGCGTTTCTC CGTTCGCGCT CTGCCATTCA CTCTTCCGAA CTATCGAAGG
11821 TCCTATGAGG GCTTGCTACC CAACTGCAGA CCGGATGTCC CACAATTCGC AGTTAAGCAC
11881 CCGTTGGGTA TACTTTGGCA TATGCGAGTC TCCCACCTAA TTGACGAAAT GGTCTCTCGC
```

```
11941 CGCATTTACC GGACCATGGA ACATTCGGGT CAAGCGGCCT GGAAGCAGGT TGTTAGTGAA
12001 GCCACTCTCA CAAAACTGTC AAGGCTTGAC GTAGTCACTC ATTTCCAACA CCTGGCCGCA
12061 GTGGAGGCTG ATTCTTGCCG CTTCCTTAGC TCACGACTCG CGATGCTGAA AAACCTTGCC
12121 GTTGGCAATG TGAGCCTGGA GTACAACACT ACTTTGGACC GCGTTGAGCT CATCTTTCCC
12181 ACACCAGGTA CGAGGCCCAA GTTGACCGAT TTTAGGCAAT GGCTTATCAG CGTGCACGCT
12241 TCCATCTTCT CCTCTGTGGC TTCGTCTGTT ACCTTGTTCA CAGTGCTTTG GCTTCGAATT
12301 CCAGCTCTAC GCTATGTTTT TGGTTTCCAT TGGCCCACGG CAACACATCA TTCGAACTAA
12361 CTATCAATTA CACTATATGT AAGCCATGCC CTACCAGTCA AGCTGCCCAA CAAAGACTCG
12421 AGCCTGGCCG TAACGTGTGG TGCAAAATAG GGCACGACAG GTGTGAGGAA CGTGACCATG
12481 ATGAGTTGTC AATGTCCATT CCGTCCGGGT ACGACAACCT CAAACTTGAG GGTTATTATG
12541 CTTGGCTGGC TTTTTTGTCC TTTTCCTACG CGGCCCAATT CCATCCGGAG CTGTTCGGAA
12601 TAGGAAACGT GTCGCGCGTC TTTGTGGATA AGCGACACCA GTTCATTTGC GCCGAGCATG
12661 ATGGACAAAA TTCAACCATA TCTGCCAGAC ACAACATCTC CGCGTCGTAT GCGGTGTATT
12721 ACCATCATCA AATAGACGGG GGCAATTGGT TTCATTTGGA ATGGCTGCGA CCATTCTTTT
12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT
12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCCT
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT
12961 CAGGAGGTCG TCCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAACGGC
13021 TAATGTGACC GATGAATCGT ATTTGTACAA CGCGGACTTG CTGATGCTTT CCGCGTGCCT
13081 TTTCTACGCC TCGGAAATGA GCGAGAAAGG CTTCAAAGTC ATCTTTGGGA ATATTTCTGG
13141 CGTTGTTTCC GCTTGTGTTA ATTTCACAGA TTATGTGGCC CATGTGACCC AACACACTCA
13201 GCAGCACCAT TTGGTAATTG ATCACATTCG GTTACTACAC TTCTTGACAC CGTCTACGAT
13261 GAGGTGGGCT ACAACCATTG CTTGTTTGCT TGCCATTCTT TTGGCGGTAT GAAATGTTCT
13321 TGCAAGTTGG GGCATTTCTT GACTCCTCAC TCTTGCTTCT GGTGGCTTTT TTTGCTGTGT
13381 ACCGGCTTGT CTTGGTCCTT TGTCGATGGC AACGACGACA GCTCGACATC CCAATACATA
13441 TATAATTTGA CGATATGCGA GCTGAATGGG ACCGAATGGT TGTCCGGTCA TTTTGATTGG
13501 GCAGTCGAAA CCTTTGTGCT TTACCCAGTT GCCACTCATA TCATTTCACT GGGTTTTCTC
13561 ACAACAAGCC ATTTCCTTGA TGCGCTCGGT CTCGGCGCTG TGTCCGCCAC AGGATTCATT
13621 GGCGAGCGGT ATGTACTTAG CAGCATGTAC GGCGTTTGCG CCTTCGCGGC GTTCGTATGT
13681 TTTGTCATCC GTGCTGCTAA AAATTGCATG GCTTGCCGCT ATGCCCGCAC CCGGTTTACC
13741 AACTTCATCG TGGACGACCG GGGAAGAATC CATCGATGGA AGTCTTCAAT AGTGGTGGAG
13801 AAATTGGGCA AAGCTGAAGT CGGTGGTGAC CTTGTCAACA TTAAGCATGT TGTCCTCGAA
13861 GGGGTTAAAG CTCAACCTTT GACGAGGACT TCGGCTGAGC AATGGGAAGC CTAGACGACT
13921 TTTGCAACGA TCCCACCGCC GCACAAAAAC TCGTGCTGGC CTTTAGCATC ACATATACAC
13981 CCATAATGAT ATACGCCCTT AAGGTGTCAC GCGGCCGACT CCTGGGGCTG TTGCACATCT
14041 TGATATTTCT GAATTGTTCC TTTACTTTTG GGTACATGAC ATATGTGCAT TTTCAATCCA
14101 CCAACCGTGT CGCATTCACT CTGGGGGCTG TAGTCGCCCT TTTGTGGGGT GTTTACAGCC
14161 TCACAGAGTC ATGGAAGTTC ATCACTTCCA GATGCAGATT GTGTTGCCTA GGCCGGCGAT
14221 ACATTCTGGC CCCTGCCCAT CACGTAGAAA GTGCTGCAGG CCTCCATTCA ATCCCAGCGT
14281 CTGGTAACCG AGCATACGCT GTGAGAAAGC CCGGACTAAC ATCAGTGAAC GGCACTCTAG
14341 TACCTGGGCT TCGGAGCCTC GTGCTGGGCG GCAAACGAGC TGTTAAACGA GGAGTGGTTA

14401 ACCTCGTCAA GTATGGCCGG TAAGAACCAG AGCCAGAAGA AAAGAAGAAA TGCAGCTCCG
14461 ATGGGGAAAG GCCAGCCAGT CAATCAACTG TGCCAGTTGC TGGGTACAAT GATAAAGTCC
14521 CAGCGCCAGC AATCTAGGGG AGGACAGGCC AAAAAGAAGA AGCCTGAGAA GCCACATTTT
14581 CCCCTAGCTG CTGAAGATGA CATTCGGCAC CATCTCACCC AGGCCGAACG TTCCCTCTGC
14641 TTGCAATCGA TCCAGACGGC TTTCAATCAA GGCGCAGGAA CTGCGTCGCT TTCATCCAGC
14701 GGGAAGGTCA GTTTCCAGGT TGAGTTCATG CTGCCGGTTG CTCATACAGT GCGCCTGATT
14761 CGCGTGACTT CTACATCCGC CAGTCAGGGT GCAAATTAAT TTGACAGTCA GGTGAATGGC
14821 CGCGATTGAC GTGTGGCCTC TAA
```

SEQ ID NO: 2: ORF 1a OF 94881 MSV ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:1 BETWEEN NUCLEOTIDES 178..7227

MSGMFSRCMCTPAARVFWNAGQVYCTRCLSARSLLSPELQDTDLGAVGLFHKPKD
KLHWKVPIGIPQVECSPSGCCWLSTIFPLARMTSGNHNFLQRLVKVADVLYRDGCLT
PRHLRELQVYERGCNWYPITGPVPGMAVYANSMHVSDQPFPGATHVLTNSPLPQR
ACRQPFCPFEEAHSSIYRWEKFVIFMDSSSDGRSRMMWTPESDDSTALEVLPPELE
HQVKVLVRSFPAHHLVDLADWELTESPDNGFSFSTSHPCGYLVRDPAVSEGKCWL
SCFLSQSAEVLSREAHLATAYGYQTKWGVPGKYIQRRLQVHGLRAVVDPDGPIHVE
ALSCPQSWIRHLTLNDDVTPGFVRLMSLRIVPNTEPTTHRIFRFGVHKWYGAAGKRA
RGKRAAKSEKDSASTLKVARPTSTSGIVTYSPPADGSCGWHALAAILNRMINNDFTS
PLPRYNRPEDDWASDGDLAQAIQCLQLPAAIARNRACPNAKYLIKLNGVHWEVEVR
PGMAPRSLSRECVVGVCSEGCVASPYPEDGLPKRALEALASAYRLPSDCVCDGIID
FLANPPPQEFWTLDKMLTSPSPEQSGFSSLYKLLLEILPQKCGSTEGEFIYTVERMLK
DCPSSKQAMALLAKIKVPSSKAPSVTLNECFPTDVPVNSELISWEEPKDPGAAVVLC
PSDAKESKETAPEEAQARNRKVLHPVVLTEELSEQQVQVVEGDQDMPLDLTWPTLT
ATATPVRGPVPDNLSSGIGAQPATVQELILARPAPRLVERCGTESNGSSSFLDLPDV
QTSDQPLDLSLAAWPVRATASDPGWIHGRREPVFVKPRGVFSDGESALQFGELSE
ASSVVDDRTKEAPVVDAPIDLTTSNETLSGSDPFEFAKFRRPRFSAQALIDRGGPLA
DVHAKIKSRVYEQCLQACEPGSRATPATKKWLDKMWDRVDMKTWRCTSQFQAGHI
LESLKFLPDMIQDTPPPVPRKNRAGDSAGLKQLVAQWDRKSSVTPPTKPVGPVLDQ
AVPLPMDIQQGDAISADKPPHSQNPSSQVDVGGGWKSFMLSGTRFAGSVSQRLTT
WVFEVLSHLPAFMLTLFSPRGSMAPGDWLFAGAVLLALLLCRSYPILGCLPLLGVFS
GSVRCVRLGVFGSWMAFAVFLFSTPPDPVGSSCDHDSPECHAELLALEQRQLWEP
VRSLVVGPSGLLCVILGKLLGGSRCLWFVLLRICMLADLAISLIYVVSQGRCHKCWGK
CIRTAPAEVALNVFPFSRATRSSLVSLCDRFQAPKGVDPVHLATGWRGCWCGESPI
HQSHQKPIAYANLDEKKISAQTVIAVPYDPSQAIKCLKVLQAGGAIVDQPTPEVVRVS
EIPFSAPFFPKVPVNPDCRVVVDSDTFVAAVRCGYSTAQLVLGRGNFAKLNQTPLR
NSVPTKTTGGASYTLAVAQVSVWTLVHFILGLWLTSPQVCGRGTSDPWCSNPFSYP
TYGPGVVCSSRLCVSADGVTLPLFSAVAHLSGREVGIFILVLASLGALAHRLALKADM
SMVFLAFCAYAWPMSSWLICFFPMLLRWVTLHPLTMLWVHSFLVFCLPAAGVLSLGI
TGLLWAVGRFTQVAGIITPYDIHQYTSGPRGAAAVATAPEGTYMAAVRRAALTGRTL
IFTPSAVGSLLEGAFRTQKPCLNTVNVVGSSLGSGGVFTIDGRRVIVTATHVLNGNTA
RVTGDSYNRMHTFNTNGDYAWSHADDWQGVAPMVKIAKGYRGRAYWQTSTGVE
PGIMGEGFAFCFTNCGDSGSPVISEAGDLIGVHTGSNKLGSGLVTTPEGETCSIKET
RLSDLSRHFAGPSVPLGDIKLSPAIIPDVTTIPSDLASLLASVPVMEGGLSTVQLLCVF
FLLWRMMGHAWTPIVAVGFFLLNEILPAVLVRAVFSFALFVLAWATPWSAQVLMIRL
LTAALNRNRLSLAFYAFGGVVGLATEIGTFAGGWPELSQALSTYCFLPRFLAVTSYV
PTIIIGGLHALGVILWLFKYRCLHNMLVGDGSFSSAFFLRYFAEGNLRKGVSQSCGM
NNESLTAALACKLSQADLDFLSSLTNFKCFVSASNMKNAAGQYIEAAYARALRQELA
SLVQVDKMKGVLAKLEAFAETATPSLDTGDVIVLLGQHPHGSILDINVGGERKTVSV
QETRCLGGSKFSVCTVVSNTPVDTLTGIPLQTPTPLFENGPRHRSEDDDLKVERMK
KHCVSLGFHKINGKVYCKIWDKSNGDTFYTDDSRYTQDHAFQDRSTDYRDRDYEG

VQTAPQQGFDPKSEAPVGTVVIGGITYNRHLVKGKEVLVPKPDNCLEAARLSLEQAL
AGMGQTCDLTATEVEKLKRIISQLQGLTTEQALNC

SEQ ID NO:3 ORF 1B OF 94881 MSV ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:1
BETWEEN NUCLEOTIDES 7209...11600

TGFKLLAASGLTRCGRGGLVVTETAVKIVKYHSRTFTLGSLDLKVTSEVEVKKSTEQ
GHAVVANLCSGVVLMRPHPPSLVDVLLKPGLDTTPGIQPGHGAGNMGVNGSIWDF
ETAPTKVELELSKQIIQACEVRRGDAPNLQLPYKLYPVRGDPERRKGRLVNTRFGDL
PYKTPQDTKSAIHAACCLHPNGVLVSDGKSTLGTTLQHGFELYVPTVPYSVMEYLDS
RPDTPFMCTKHGTSKAAAEDLQKYDLSTQGFVLPGVLRLVRRFIFSHVGKAPPLFLP
STYPAKNSMAGVNGQRFPTKDVQSIPEIDEMCARAVKENWQTVTPCTLKKQYCSKP
KTRTILGTNNFIALAHRSALSGVTQAFMKKAWKSPIALGKNKFKELHCTVAGRCLEA
DLASCDRSTPAIVRWFVANLLYELAGCEEYLPSYVLNCCHDLVATQDGAFTKRGGL
SSGDPVTSVSNTVYSLIIYAQHMVLSALKMGHEIGLKFLEEQLKFEDLLEIQPMLVYS
DDLVLYAERPTFPNYHWWVEHLDLMLGFKTDPKKTVITDKPSFLGCRIEAGRQLVPN
RDRILAALAYHMKAQNASEYYASAAAILMDSCACIDHDPEWYEDLICGIARCARQDG
YRFPGPAFFMSMWEKLKSHNEGKKCRHCGICDAKADYASACGLDLCLFHSHFHQH
CPVTLSCGHHAGSKECSQCQSPVGAGKSPLDAVLKQIPYKPPRTIIMKVDNKTTTLD
PGRYQSRRGLVAVKRGIAGNEVDLSDGDYQVVPLLPTCKDINMVKVACNVLLSKFIV
GPPGSGKTTWLLNQVQDDDVIYTPTHQTMFDIVSALKVCRYSIPGASGLPFPPPARS
GPWVRLIASGHVPGRVSYLDEAGYCNHLDILRLLSKTPLVCLGDLQQLHPVGFDSYC
YVFDQMPQKQLTTIYRFGPNICAAIQPCYREKLESKARNTRVVFTTRPVAFGQVLTP
YHKDRTGSAITIDSSQGATFDIVTLHLPSPKSLNKSRALVAITRARHGLFIYDPHDQLQ
EFFNLTPERTDCNLAFSRGDELVVLNVDNAVTTVAKALETGSPRFRVSDPRCKSLLA
ACSASLEGSCMPLPQVAHNLGFYFSPDSPAFAPLPKELAPHWPVVTHQNNRAWPD
RLVASMRPIDARYSKPMVGAGYVVGPSIFLGTPGVVSYYLTLYIGGEPQALPETLVS
TGRIATDCREYLDAAEEEAARELPHAFIGDVKGTTIGGCHHITSKYLPRSLPKDSVAV
VGVSSPGRAAKAVCTLTDVYLPELRPYLQPETASKCWKLKLDFRDVRLMVWKGATA
YFQLEGLTWSALPDYARFIQLPKDAVVYIDPCIGPATANRKVVRTTDWRADLAVTPY
DYGAQVILTTAWFEDLGPQWKILGLQPFRRTFGFENTEDWAILARRMNDGKDYTDY
NWHCVRERPHAIYGRARDHTYHFALGTELQVELGRPRLPPEQVP

SEQ ID NO:4 ORF 2 OF 94881 MSV ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:1
BETWEEN NUCLEOTIDES 11611..12360

MQWVYCGVKSVSCSWMPSLSSLLVWLTLSSFSPYCLGSLLQAGYWSSFSEWFAP
RFSVRALPFTLPNYRRSYEGLLPNCRPDVPQFAVKHPLGILWHMRVSHLIDEMVSR
RIYRTMEHSGQAAWKQVVSEATLTKLSRLDVVTHFQHLAAVEADSCRFLSSRLAML
KNLAVGNVSLEYNTTLDRVELIFPTPGTRPKLTDFRQWLISVHASIFSSVASSVTLFTV
LWLRIPALRYVFGFHWPTATHHSN

SEQ ID NO:5 ORF 3 OF 94881 MSV ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:1 BETWEEN NUCLEOTIDES 12219..13016

MAYQRARFHLLLCGFVCYLVHSALASNSSSTLCFWFPLAHGNTSFELTINYTICKPC
PTSQAAQQRLEPGRNVWCKIGHDRCEERDHDELSMSIPSGYDNLKLEGYYAWLAF
LSFSYAAQFHPELFGIGNVSRVFVDKRHQFICAEHDGQNSTISARHNISASYAVYYH
HQIDGGNWFHLEWLRPFFSSWLVLNISWFLRRSPASPASRRIYQILRPTRPRLPVSW
SFRTSIVSNLTGPQQRKVPLPSGGRPNVVKPSAFPSTSR

SEQ ID NO:6 ORF 4 OF 94881 MSV ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:1 BETWEEN NUCLEOTIDES 12761..13312

MAATILFLLAGAQHLMVSEAFACKPCFSTHLSDIKTNTTAAAGFMVLQNINCFQSHRA
STAQGTTPLRRSSQCREAVGIPQYITITANVTDESYLYNADLLMLSACLFYASEMSEK
GFKVIFGNISGVVSACVNFTDYVAHVTQHTQQHHLVIDHIRLLHFLTPSTMRWATTIA
CLLAILLAV

SEQ ID NO:7 ORF 5 OF 94881 MSV ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:1 BETWEEN NUCLEOTIDES 13309..13914

MKCSCKLGHFLTPHSCFWWLFLLCTGLSWSFVDGNDDSSTSQYIYNLTICELNGTE
WLSGHFDWAVETFVLYPVATHIISLGFLTTSHFLDALGLGAVSATGFIGERYVLSSMY
GVCAFAAFVCFVIRAAKNCMACRYARTRFTNFIVDDRGRIHRWKSSIVVEKLGKAEV
GGDLVNIKHVVLEGVKAQPLTRTSAEQWEA

SEQ ID NO:8 ORF 6 OF 94881 MSV ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:1 BETWEEN NUCLEOTIDES 13902..14423

MGSLDDFCNDPTAAQKLVLAFSITYTPIMIYALKVSRGRLLGLLHILIFLNCSFTFGYM
TYVHFQSTNRVAFTLGAVVALLWGVYSLTESWKFITSRCRLCCLGRRYILAPAHHVE
SAAGLHSIPASGNRAYAVRKPGLTSVNGTLVPGLRSLVLGGKRAVKRGVVNLVKYG
R

SEQ ID NO:9 ORF 7 OF 94881 MSV ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:1 BETWEEN NUCLEOTIDES 14413..14799

MAGKNQSQKKRRNAAPMGKGQPVNQLCQLLGTMIKSQRQQSRGGQAKKKKPEKP
HFPLAAEDDIRHHLTQAERSLCLQSIQTAFNQGAGTASLSSSGKVSFQVEFMLPVAH
TVRLIRVTSTSASQGAN

SEQ ID NO:10 FULL LENGTH NUCLEOTIDE SEQUENCE OF PARENT PRRS STRAIN 94881

```
   1 TTTGTGTACC TTGGAGGCGT GGGTACAGCC CTGCCCCACC CCTTGGCCCC TGTTCTAGCC
  61 CGACAGGTAC CCTTCTCTCT CGGGGCGAGC GCGCCGCCTG CTGCTCCCTT GCGGCGGGAA
 121 GGACCTCCCG AGTATTTCCG GAGAGCACCT GCTTTACGGG ATCTCCGCCC TTTAACCATG
 181 TCTGGGATGT TCTCCCGGTG CATGTGCACC CCGGCTGCCC GGGTATTTTG GAACGCCGGC
 241 CAAGTCTATT GCACACGGTG TCTCAGTGCA CGGTCTCTTC TCTCTCCAGA ACTTCAGGAC
 301 ACGGACCTCG GTGCAGTTGG CTTGTTTCAC AAGCCTAAAG ACAAGCTCCA TTGGAAAGTT
 361 CCCATTGGTA TCCCCCAGGT GGAATGTTCT CCATCTGGGT GTTGCTGGCT GTCAACCATT
 421 TTTCCTTTAG CGCGCATGAC CTCCGGCAAT CACAACTTCC TTCAACGACT CGTGAAGGTT
 481 GCTGACGTAT TGTACCGTGA CGGTTGCTTA ACCCCTAGAC ACCTCCGTGA ACTCCAAGTT
 541 TACGAGCGTG GTTGCAATTG GTATCCGATT ACGGGGCCTG TGCCTGGGAT GGCTGTGTAC
 601 GCGAACTCCA TGCACGTGTC CGACCAACCG TTCCCTGGTG CCACTCATGT GTTAACAAAT
 661 TCCCCTTTGC CTCAACGGGC TTGTCGGCAG CCGTTCTGTC CGTTCGAAGA GGCCCATTCT
 721 AGCATATACA GGTGGGAAAA ATTTGTAATT TTTATGGATT CCTCCTCCGA CGGTCGATCT
 781 CGCATGATGT GGACTCCGGA ATCCGATGAC TCCACGGCTT TGGAAGTTCT GCCGCCCGAG
 841 CTAGAACACC AGGTCAAGGT CCTTGTTCGG AGCTTTCCCG CCCATCACCT TGTCGACCTT
 901 GCCGATTGGG AGCTCACTGA GTCCCCTGAG AACGGTTTTT CCTTCAGCAC GTCACATCCT
 961 TGCGGCTACC TTGTTCGGGA CCCGGCTGTA TCCGAAGGCA AGTGTTGGCT TTCCTGCTTT
1021 TTGAGCCAGT CAGCCGAAGT GCTCAGTCGC GAGGCGCATC TGGCTACCGC CTATGGTTAC
1081 CAAACCAAGT GGGGTGTGCC TGGCAAGTAC ATCCAGCGCA GACTTCAAGT TCACGGTCTC
1141 CGTGCTGTGG TCGACCCTGA TGGTCCCATT CACGTTGAAG CATTGTCTTG CCCCCAGTCT
1201 TGGATCAGGC ACTTGACCCT GAATGATGAT GTCACCCCGG GATTCGTTCG CCTAATGTCT
1261 CTTCGCATTG TGCCGAACAC AGAGCCTACC ACACACCGGA TCTTTCGTTT TGGAGTGCAC
1321 AAGTGGTATG GTGCCGCCGG CAAACGGGCC CGTGGCAAGC GTGCCGCCAA AAGTGAGAAA
1381 GACTCGGCTT CCACCCTCAA GGTTGCCCGA CCGACTTCCA CCAGTGGAAT CGTCACCTAC
1441 TCCCCACCTG CGGACGGGTC TTGTGGTTGG CATGCCCTTG CCGCCATACT GAACCGGATG
1501 ATTAATAATG ACTTCACGTC CCCTCTGCCT CGGTACAACA GGCCGGAGGA CGATTGGGCT
1561 TCTGATGGTG ACCTTGCTCA GGCCATTCAA TGTTTGCAAC TACCTGCCGC CATAGCTCGG
1621 AACCGCGCCT GCCCTAACGC CAAATACCTC GTAAAACTCA ACGGAGTTCA TTGGGAGGTA
1681 GAGGTGAGGC CTGGAATGGC TCCTCGCTCC CTCTCTCGTG AGTGCGTTGT TGGCGTCTGC
1741 TCTGAAGGCT GTGTCGCGTC GCCTTACCCG GAGGACGGGT TGCCTAAACG TGCACTTGAG
1801 GCCCTGGCGT CTGCTTATAG ACTGCCTTCA GACTGTGTTT GTGATGGTAT TATTGACTTC
1861 CTTGCCAATC CACCTCCCCA GGAGTTCTGG ACTCTTGACA AAATGTTGAC TTCCCCGTCA
1921 CCGGAGCAGT CCGGCTTCTC TAGTCTGTAT AAATTGTTGT TAGAGGTCTT GCCGCAGAAA
1981 TGCGGATCCA CAGAAGGGGA ATTCATCTAT ACTGTTGAGA GGATGTTGAA GGATTGTCCG
2041 AGCTCCAAAC AGGCCATGGC CCTCCTTGCA AAAATTAAGG TCCCATCCTC AAAGGCCCCA
2101 TCCGTGACTC TGAACGAGTG CTTCCCCACG GATGTTCCAG TCAACTCTGA GTTAATATCT
2161 TGGGAAGAGC CCAAAGACCC TGGCGCTGCT GTTGTCCTAT GTCCATCGGA TGCAAAAGAA
2221 TCTAAGGAAA CAGCCCCTGA AGAAGCTCAA GCGAGAAACC GTAAGGTCCT CCACCCTGTG
2281 GTCCTTACCG AGGAACTTAG CGAGCAACAG GTGCAGGTGG TTGAGGGTGA TCAGGATATG
2341 CCACTGGATT TGACTTGGCC AACCTTAACC GCTACGGCGA CCCCTGTTAG AGGGCCGGTA
2401 CCGGACAATT TGAGCTCTGG CATTGGTGCC CAGCCCGCTA CCGTTCAAGA ACTCATTCTG
2461 GCGAGGCCTG CACCCCGTCT TGTTGAGCGC TGTGGCACGG AGTCGAACGG CAGCAGTTCA
2521 TTTCTGGATT TGCCTGACGT GCAGACCTCG GACCAGCCTT TAGACCTGTC CCTGGCCGCG
2581 TGGCCTGTAA GGGCTACCGC GTCTGACCCC GGTTGGATCC ACGGTAGGCG TGAGCCTGTC
2641 TTTGTGAAGC CTCGAGGTGT TTTCTCTGAT GGCGAGTCGG CCCTTCAGTT CGGAGAGCTT
2701 TCCGAAGCCA GTTCTGTCGT CGATGACCGG ACAAAAGAAG CTCCGGTGGT TGACGCCCCC
2761 ATCGATTTGA CAACTTCGAA CGAGACGCTC TCTGGGTCTG ACCCCTTTGA ATTCGCCAAA
2821 TTCAGGCGCC CGCGTTTCTC CGCGCAAGCT TTAATCGACC GAGGTGGTCC GCTTGCCGAT
2881 GTTCATGCAA AGATAAAGAG TCGGGTATAT GAACAATGCC TTCAAGCTTG TGAACCTGGT
2941 AGTCGTGCGA CCCCAGCCAC CAAGAAGTGG CTCGACAAAA TGTGGGACAG GGTGGACATG
3001 AAAACTTGGC GCTGCACCTC GCAGTTCCAA GCTGGTCACA TTCTTGAGTC CCTCAAATTC
3061 CTCCCTGACA TGATTCAAGA CACACCGCCT CCTGTTCCCA GGAAGAACCG AGCTGGTGAC
```

```
3121 AGTGCCGGCC TGAAGCAACT GGTGGCGCAG TGGGATAGGA AATTGAGTGT GACACCCCCC
3181 ACAAAACCGG TTGGACCGGT GCTTGACCAG ACCGTCCCTC TGCCTATGGA CATCCAGCAA
3241 GAAGATGCCA TCTCCGCTGA CAAGCCACCC CATTCGCAAA ACCCTTCTAG TCAAGTAGAT
3301 GTGGGTGGAG GTTGGAAAAG TTTTATGCTC TCCGGCACCC GTTTCGCGGG GTCCGTTAGT
3361 CAGCGCCTTA CGACATGGGT TTTTGAGGTT CTCTCCCATC TCCCAGCTTT TATGCTCACA
3421 CTTTTCTCGC CACGGGGCTC TATGGCTCCA GGTGATTGGC TGTTTGCAGG TGCTGTTCTA
3481 CTTGCTCTCC TGCTCTGCCG TTCTTACCCA ATACTCGGAT GCCTTCCCTT ATTGGGTGTC
3541 TTTTCTGGTT CTGTGCGGTG TGTTCGTTTG GGTGTTTTTG GTTCTTGGAT GGCTTTTGCT
3601 GTATTTTTAT TCTCGACTCC ACCCGACCCA GTCGGTTCTT CTTGTGACCA CGATTCGCCG
3661 GAGTGTCATG CTGAGCTTTT GGCTCTTGAG CAGCGCCAAC TTTGGGAACC TGTGCGCAGC
3721 CTTGTGGTCG GGCCATCGGG CCTCTTATGC GTCATTCTTG GCAAGTTACT CGGTGGGTCA
3781 CGTTGTCTCT GGTTTGTTCT CCTACGTATA TGCATGCTCG CAGATTTGGC AATTTCTCTT
3841 ATTTATGTGG TGTCCCAAGG GCGTTGTCAC AAGTGTTGGG GAAAGTGTAT AAGGACGGCT
3901 CCTGCAGAAG TGACCCTTAA TGTGTTTCCT TTTTCGCGCG CCACCCGCTC ATCTCTTGTG
3961 TCCTTGTGTG ATCGGTTCCA AGCGCCAAAA GGAGTTGACC CCGTGCACTT GGCGACAGGC
4021 TGGCGCGGGT GCTGGTGTGG TGAGAGCCCT ATTCATCAAT CACACCAAAA ACCGATAGCT
4081 TATGCCAACT TGGATGAAAA GAAGATATCC GCCCAGACGG TGATTGCTGT CCCGTATGAT
4141 CCCAGTCAGG CCATTAAATG CCTGAAAGTT TTGCAGGCAG GAGGGGCTAT TGTGGACCAG
4201 CCTACGCCCG AGGTCGTCCG TGTGTCTGAG ATTCCCTTCT CGGCCCCATT TTTTCCGAAG
4261 GTCCCAGTCA ACCCAGATTG CAGGGTTGTG GTAGATTCGG ACACTTTTGT GGCTGCGGTC
4321 CGCTGCGGTT ATTCGACAGC ACAACTGGTC CTTGGTCGGG GCAACTTTGC CAAGCTAAAT
4381 CAGACCCCCC TCAGGAACTC TGTCCCCACC AAAACAACTG GTGGGGCCTC ATACACCCTT
4441 GCCGTGGCCC AGGTATCTGT GTGGACTCTT GTTCATTTCA TCCTCGGCCT TTGGTTAACG
4501 TCACCTCAAG TGTGTGGTCG AGGGACCTCT GACCCGTGGT GTTCGAACCC TTTTTCGTAT
4561 CCTACTTATG GCCCCGGAGT TGTGTGTTCC TCTCGACTCT GCGTGTCTGC CGACGGAGTT
4621 ACCCTGCCAT TGTTCTCAGC CGTTGCCCAT CTTTCCGGTA GAGAGGTGGG GATTTTTATT
4681 TTGGTGCTTG CCTCCTTGGG CGCTTTAGCC CACCGCTTGG CTCTTAAGGC AGACATGTCA
4741 ATGGTCTTTT TGGCGTTTTG TGCTTACGCC TGGCCCATGA GCTCCTGGTT AATTTGCTTC
4801 TTTCCTATGC TCTTGAGGTG GGTAACCCTT CATCCTCTCA CTATGCTTTG GGTGCACTCA
4861 TTTTTGGTGT TTTGCCTACC AGCTGCCGGC GTTCTCTCGC TGGGAATAAC CGGTCTTCTT
4921 TGGGCAGTTG GCCGTTTCAC CCAGGTTGCC GGAATTATCA CACCTTATGA CATCCACCAG
4981 TATACCTCCG GACCACGTGG TGCAGCTGCT GTAGCAACGG CTCCAGAAGG TACTTACATG
5041 GCGGCCGTTC GGAGAGCCGC TTTGACTGGA CGGACTTTGA TCTTCACACC ATCTGCAGTC
5101 GGATCCCTTC TTGAAGGTGC TTTCAGAACT CAAAAGCCCT GCCTTAACAC CGTGAATGTC
5161 GTAGGCTCTT CCCTTGGTTC TGGAGGAGTT TTCACCATTG ATGGCAGAAG AGTCATCGTC
5221 ACTGCCACCC ATGTGTTGAA TGGTAACACA GCCAGGGTCA CTGGTGATTC CTACAACCGC
5281 ATGCACACGT TCAATACTAA TGGTGATTAT GCCTGGTCCC ATGCTGATGA CTGGCAAGGC
5341 GTTGCCCCTA TGGTTAAGAT CGCTAAGGGG TATCGCGGTC GTGCCTACTG GCAAACGTCA
5401 ACCGGAGTCG AACCTGGCAT CATGGGGGAA GGATTCGCCT TCTGTTTCAC TAACTGTGGC
5461 GACTCAGGGT CACCTGTCAT TTCAGAAGCT GGTGACCTTA TTGGAGTCCA TACCGGTTCA
5521 AACAAACTCG GTTCTGGTCT TGTGACAACC CCTGAAGGGG AGACCTGCTC CATCAAGGAA
5581 ACTAGGCTCT CTGACCTTTC TAGACATTTT GCAGGTCCAA GCGTCCCTCT TGGGGACATT
5641 AAGTTGAGCC CAGCCATCAT CCCTGATGTG ACAACTATTC CGAGTGACTT GGCATCGCTC
5701 CTTGCTTCTG TCCCCGTGAT GGAAGGTGGC CTCTCAACTG TCCAGCTTTT GTGCGTCTTT
5761 TTCCTTCTCT GGCGCATGAT GGGCCATGCC TGGACACCCA TTGTTGCCGT AGGCTTCTTT
5821 TTGCTGAATG AAATTCTCCC AGCAGTCTTG GTCCGAGCTG TGTTCTCTTT TGCACTCTTT
5881 GTACTTGCAT GGGCCACCCC CTGGTCGGCA CAAGTGTTGA TGATTAGACT CCTCACGGCG
5941 GCTCTCAACC GCAACAGGTT GTCCCTGGCG TTCTACGCAC TCGGAGGTGT CGTTGGCCTG
6001 GCCACAGAAA TCGGGACTTT TGCTGGTGGA TGGCCTGAAC TGTCCCAAGC CCTCTCGACA
6061 TACTGCTTCC TGCCCAGGTT CCTTGCTGTG ACTAGTTATG TCCCCACCAT CATCATCGGT
6121 GGGCTCCATG CCCTCGGCGT AATTTTGTGG TTATTCAAAT ACCGATGCCT CCACAACATG
6181 CTGGTTGGTG ATGGGAGTTT CTCAAGCGCT TTCTTCCTAC GGTATTTTGC TGAGGGTAAT
```

```
6241 CTTAGGAAAG GCGTGTCGCA GTCCTGTGGC ATGAATAACG AATCCCTGAC AGCTGCTTTG
6301 GCTTGCAAGT TGTCGCAAGC TGACCTTGAT TTTTTGTCCA GTTTAACGAA CTTCAAGTGC
6361 TTTGTGTCCG CTTCAAACAT GAAAAATGCA GCTGGCCAAT ACATCGAGGC GGCGTATGCT
6421 AGAGCTCTGC GTCAGGAGCT GGCCTCCTTG GTTCAGGTTG ACAAGATGAA AGGAGTATTG
6481 GCCAAGCTCG AGGCTTTCGC TGAGACGGCC ACTCCGTCAC TTGACACAGG TGACGTGATT
6541 GTTCTGCTTG GGCAACACCC CCATGGATCC ATCCTCGACA TTAATGTGGG GGGTGAAAGG
6601 AAAACTGTGT CTGTGCAAGA AACACGATGC CTGGGTGGTT CCAAATTCAG TGTCTGCACT
6661 GTCGTGTCCA ACACGCCCGT GGATACCTTG ACCGGCATCC CACTTCAGAC GCCAACCCCA
6721 CTTTTTGAAA ATGGCCCGCG CCATCGCAGC GAGGACGACG ACCTTAAAGT TGAGAGAATG
6781 AAAAAACACT GTGTATCCCT CGGCTTCCAC AAAATCAATG GTAAAGTTTA CTGCAAAATT
6841 TGGGACAAGT CTAACGGCGA CACCTTTTAC ACGGATGATT CCCGATACAC TCAAGACCAT
6901 GCTTTTCAGG ACAGGTCAAC CGACTATAGA GACAGGGATT ATGAAGGTGT ACAGACCGCC
6961 CCCCAACAGG GATTCGATCC AAAGTCCGAA GCCCCTGTTG GCACTGTTGT AATCGGTGGC
7021 ATTACGTATA ACAGGCATCT GGTCAAAGGT AAGGAGGTCC TAGTTCCCAA ACCTGACAAC
7081 TGCCTTGAAG CTGCCAGACT GTCCCTTGAG CAAGCTCTTG CTGGGATGGG CCAAACTTGT
7141 GACCTTACAG CTACCGAAGT GGAGAAACTA AAGCGCATCA TTAGTCAACT CCAAGGTCTG
7201 ACCACTGAAC AGGCTTTAAA CTGCTAGCCG CCAGCGGCTT GACCCGCTGT GGCCGCGGCG
7261 GCCTAGTTGT AACTGAAACG GCGGTAAAAA TCGTAAAATA CCACAGCAGA ACTTTCACCT
7321 TAGGCTCTTT AGACCTAAAA GTCACCTCCG AGGTGGAGGT GAAGAAATCA ACTGAGCAGG
7381 GGCACGCTGT CGTGGCGAAC TTATGTTCCG GTGTCGTCTT GATGAGGCCT CACCCACCGT
7441 CCCTTGTTGA CGTTCTCCTC AAACCCGGAC TTGACACAAC ACCCGGCATT CAACCAGGGC
7501 ATGGGGCCGG GAATATGGGC GTGAACGGTT CTATTTGGGA TTTTGAAACT GCACCCACAA
7561 AGGTAGAACT AGAGTTGTCC AAGCAAATAA TCCAAGCATG TGAAGTCAGG CGCGGGGACG
7621 CCCCTAACCT CCAACTCCCC TACAAGCTTT ATCCTGTCAG GGGGGACCCC GAGCGGCGTA
7681 AAGGTCGCCT TGTCAACACT AGGTTTGGAG ATTTACCTTA CAAAACTCCC CAAGACACCA
7741 AGTCCGCAAT TCATGCGGCT TGTTGCCTGC ATCCCAATGG GGTCCTCGTG TCTGATGGTA
7801 AATCCACGCT GGGTACCACT CTTCAACATG GTTTCGAGCT TTATGTCCCC ACTGTACCTT
7861 ATAGTGTCAT GGAATACCTT GATTCACGCC CTGACACCCC TTTTATGTGT ACTAAACATG
7921 GCACTTCCAA GGCTGCTGCA GAGGACCTCC AAAAATATGA CCTATCCACT CAAGGGTTTG
7981 TCTTGCCTGG GGTCCTACGC CTAGTGCGCA GGTTCATCTT TAGCCATGTT GGTAAGGCGC
8041 CACCACTGTT CCTTCCATCA ACCTACCCTG CCAAGAACTC CATGGCAGGG GTCAATGGCC
8101 AGAGGTTCCC AACAAAGGAT GTCCAGAGCA TACCTGAAAT TGATGAAATG TGCGCCCGTG
8161 CCGTCAAGGA AAATTGGCAG ACTGTGACAC CTTGCACCCT CAAAAAACAG TACTGTTCCA
8221 AACCTAAAAC TAGAACCATC CTAGGTACCA ACAACTTCAT AGCCTTGGCT CACAGGTCAG
8281 CACTCAGTGG TGTCACCCAG GCGTTCATGA AGAAGGCCTG GAAGTCCCCA ATTGCCTTGG
8341 GGAAAAACAA GTTTAAGGAA TTGCATTGCA CTGTCGCCGG CAGATGCCTT GAGGCTGACC
8401 TGGCTTCCTG CGATCGCAGC ACCCCCGCCA TTGTGAGGTG GTTTGTTGCC AACCTCCTGT
8461 ATGAACTTGC AGGATGTGAA GAGTACTTGC CTAGCTACGT GCTCAACTGT TGCCATGACC
8521 TTGTGGCAAC GCAGGATGGC GCTTTCACAA AACGCGGTGG CCTGTCGTCC GGGGACCCCG
8581 TCACCAGTGT GTCCAACACC GTCTACTCAC TGATAATTTA CGCCCAGCAC ATGGTGCTTT
8641 CGGCCTTGAA GATGGGTCAT GAAATTGGTC TCAAGTTCCT TGAGGAACAG CTCAAATTTG
8701 AGGACCTTCT TGAAATCCAG CCCATGTTAG TGTATTCTGA TGACCTCGTC TTGTATGCGG
8761 AAAGACCCAC TTTTCCCAAC TACCATTGGT GGGTCGAGCA TCTTGACCTG ATGTTGGGCT
8821 TTAAAACGGA CCCAAAGAAA ACTGTCATAA CTGATAAACC CAGTTTTCTC GGCTGCAGAA
8881 TTGAAGCAGG ACGGCAGTTA GTCCCCAATC GCGACCGTAT TCTGGCTGCT CTTGCATATC
8941 ATATGAAGGC GCAGAACGCC TCAGAGTATT ATGCGTCCGC TGCCGCAATT CTGATGGATT
9001 CGTGTGCTTG CATTGACCAT GACCCCGAGT GGTATGAGGA CCTTATCTGC GGCATCGCCC
9061 GGTGTGCTCG CCAGGACGGT TACCGTTTTC CAGGCCCGGC ATTTTTCATG TCCATGTGGG
9121 AGAAGCTGAA AAGTCATAAC GAAGGGAAGA AATGCCGTCA CTGCGGCATC TGCGACGCCA
9181 AAGCCGACTA TGCGTCCGCC TGTGGACTTG ATTTGTGTTT GTTCCATTCA CACTTTCATC
9241 AACACTGCCC AGTCACTCTG AGCTGTGGCC ACCATGCCGG TTCAAAGGAA TGTTCGCAGT
9301 GTCAGTCACC TGTCGGGGCT GGCAAATCCC CCCTTGACGC TGTGCTGAAA CAAATCCCGT
```

```
 9361 ACAAACCTCC TCGTACCATT ATCATGAAGG TGGACAACAA AACAACGACC CTTGACCCGG
 9421 GAAGATATCA GTCCCGTCGA GGTCTTGTTG CAGTCAAAAG AGGTATTGCA GGTAATGAGG
 9481 TTGATCTTTC TGATGGAGAC TACCAAGTGG TGCCTCTTTT GCCGACTTGC AAAGACATAA
 9541 ACATGGTGAA GGTGGCTTGC AACGTACTAC TCAGCAAGTT TATAGTAGGG CCGCCAGGTT
 9601 CCGGAAAAAC CACCTGGCTA CTGAACCAAG TCCAGGACGA TGATGTCATT TACACACCTA
 9661 CTCATCAGAC AATGTTTGAC ATAGTCAGTG CTCTTAAAGT TTGCAGGTAT TCCATCCCAG
 9721 GAGCCTCAGG ACTCCCTTTT CCACCACCTG CCAGGTCCGG GCCGTGGGTT AGGCTCATCG
 9781 CCAGCGGACA TGTCCCTGGC CGAGTGTCAT ATCTCGATGA GGCAGGATAT TGCAATCATC
 9841 TAGACATTCT AAGGCTGCTT TCCAAAACAC CCCTTGTGTG TTTGGGTGAC CTTCAGCAAC
 9901 TTCACCCGGT CGGCTTTGAT TCCTATTGTT ATGTGTTCGA TCAGATGCCT CAGAAGCAGC
 9961 TGACCACCAT TTATAGATTT GGCCCTAACA TCTGTGCAGC CATCCAGCCT TGTTACAGGG
10021 AGAAACTTGA ATCCAAGGCC AGGAACACCA GAGTGGTTTT CACCACCCGG CCTGTGGCCT
10081 TTGGTCAGGT CCTGACACCG TACCACAAAG ATCGTACCGG CTCTGCAATA ACTATAGATT
10141 CATCCCAGGG GGCGACCTTC GACATTGTGA CATTGCATCT ACCATCGCCA AAGTCCCTAA
10201 ACAAATCCCG AGCACTTGTA GCCATCACTC GGGCAAGACA TGGGTTGTTC ATTTATGACC
10261 CTCATGACCA ACTCCAGGAG TTTTTCAACT TAACCCCCGA GCGCACTGAT TGTAACCTTG
10321 CGTTCAGCCG TGGGGATGAG CTGGTTGTTT TGAATGTGGA TAATGCGGTC ACAACTGTAG
10381 CGAAGGCCCT AGAGACAGGT TCACCCCGAT TTCGAGTATC GGACCCGAGG TGCAAGTCTC
10441 TCTTAGCCGC TTGTTCGGCC AGTCTAGAAG GGAGCTGCAT GCCACTACCA CAAGTAGCAC
10501 ATAACCTGGG GTTTTACTTT TCCCCGGACA GCCCAGCTTT TGCACCCCTG CCAAAAGAGC
10561 TGGCGCCACA TTGGCCAGTG GTCACCCACC AGAATAATCG AGCGTGGCCT GATCGACTTG
10621 TCGCTAGTAT GCGCCCAATT GATGCCCGCT ACAGCAAGCC AATGGTCGGT GCAGGGTATG
10681 TGGTCGGGCC ATCCATTTTT CTTGGCACTC CTGGTGTGGT GTCATACTAT CTCACATTAT
10741 ACATCGGGGG CGAGCCTCAG GCCCTGCCAG AAACACTCGT TTCAACAGGA CGTATAGCCA
10801 CAGATTGTCG GGAATATCTC GACGCGGCTG AGGAAGAGGC AGCGAGAGAA CTTCCCCACG
10861 CATTTATTGG CGATGTCAAA GGCACTACGG TCGGGGGGTG TCACCACATT ACATCGAAAT
10921 ACCTACCTAG GTCCCTGCCT AAAGACTCTG TTGCTGTGGT TGGGGTGAGT TCGCCCGGTA
10981 GGGCTGCTAA AGCCGTGTGC ACTCTCACCG ATGTGTACCT CCCCGAACTC CGACCATATT
11041 TGCAACCGGA GACGGCATCA AAATGCTGGA AACTTAAACT GGATTTCAGG GATGTTCGAC
11101 TGATGGTCTG GAAAGGCGCC ACAGCCTATT TCCAGTTGGA AGGGCTGACA TGGTCAGCGC
11161 TGCCCGATTA TGCTAGGTTC ATTCAGCTAC CCAAGGATGC CGTTGTGTAC ATCGATCCGT
11221 GTATAGGGCC GGCAACAGCC AATCGCAAGG TTGTGCGAAC CACAGACTGG CGGGCCGACC
11281 TGGCAGTGAC ACCGTATGAT TACGGTGCTC AGGTCATTTT GACAACAGCC TGGTTCGAGG
11341 ACCTTGGGCC GCAGTGGAAG ATTTTGGGGT TGCAGCCTTT CAGACGAACA TTTGGCTTTG
11401 AGAACACTGA AGATTGGGCA ATTCTCGCAC GCCGTATGAA TGACGGCAAA GATTACACTG
11461 ACTATAATTG GCATTGTGTA CGAGAACGCC CACACGCAAT TTACGGGCGC GCCCGTGACC
11521 ATACGTATCA TTTTGCCCTT GGCACTGAAC TGCAAGTAGA GCTGGGCAGA CCCCGGCTGC
11581 CTCCTGAGCA AGTGCCGTGA ACGCGGAGTG ATGCAATGGG TTCACTGTGG AGTAAAATCA
11641 GTCAGTTGTT CGTGGATGCC TTCACTGAGT TCCTTGTTAG TGTGGTTGAC ATTGTCATCT
11701 TTCTCGCCAT ATTGTTTGGG TTCACTGTTG CAGGCTGGTT ATTGGTCTTC CTTCTCAGAG
11761 TGGTTTGCTC CGCGTTTCTC CGTTCGCGCT CTGCCATTCA CTCTCCCGAA CTATCGAAGG
11821 TCCTATGAGG GCTTGCTACC CAACTGCAGA CCGGATGTCC CACAATTCGC AGTTAAGCAC
11881 CCGTTGGGTA TACTTTGGCA TATGCGAGTC TCCCACCTAA TTGACGAAAT GGTCTCTCGC
11941 CGCATTTACC GGACCATGGA ACATTCGGGT CAAGCGGCCT GGAAGCAGGT TGTTAGTGAA
12001 GCCACTCTCA CAAAACTGTC AAGGCTTGAC GTAGTCACTC ATTTCCAACA CCTGGCCGCA
12061 GTGGAGGCTG ATTCTTGCCG CTTCCTTAGC TCACGACTCG CGATGCTGAA AAACCTTGCC
12121 GTTGGCAATG TGAGCCTGGA GTACAACACT ACTTTGGACC GCGTTGAGCT CATCTTTCCC
12181 ACACCAGGTA CGAGGCCCAA GTTGACCGAT TTTAGGCAAT GGCTTATCAG CGTGCACGCT
12241 TCCATCTTCT CCTCTGTGGC TTCGTCTGTT ACCTTGTTCA CAGTGCTTTG GCTTCGAATT
12301 CCAGCTCTAC GCTATGTTTT TGGTTTCCAT TGGCCCACGG CAACACATCA TTCGAACTAA
12361 CTATCAATTA CACTATATGT AAGCCATGCC CTACCAGTCA AGCTGCCCAA CAAAGACTCG
12421 AGCCTGGCCG TAACGTGTGG TGCAAAATAG GGCACGACAG GTGTGAGGAA CGTGACCATG
```

```
12481 ATGAGTTGTC AATGTCCATT CCGTCCGGGT ACGACAACCT CAAACTTGAG GGTTATTATG
12541 CTTGGCTGGC TTTTTTGTCC TTTTCCTACG CGGCCCAATT CCATCCGGAG CTGTTCGGAA
12601 TAGGAAACGT GTCGCGCGTC TTTGTGGATA AGCGACACCA GTTCATTTGC GCCGAGCATG
12661 ATGGACAAAA TTCAACCATA TCTGCCAGAC ACAACATCTC CGCGTCGTAT GCGGTGTATT
12721 ACCATCATCA AATAGACGGG GGCAATTGGT TTCATTTGGA ATGGCTGCGA CCATTCTTTT
12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT
12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCCT
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT
12961 CAGGAGGTCG TCCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAACGGC
13021 TAATGTGACC GATGAATCGT ATTTGTACAA CGCGGACTTG CTGATGCTTT CCGCGTGCCT
13081 TTTCTACGCC TCGGAAATGA GCGAGAAAGG CTTCAAAGTC ATCTTTGGGA ATATTTCTGG
13141 CGTTGTTTCC GCTTGTGTTA ATTTCACAGA TTATGTGGCC CATGTGACCC AACACACTCA
13201 GCAGCACCAT TTGGTAATTG ATCACATTCG GTTACTACAC TTCTTGACAC CGTCTACGAT
13261 GAGGTGGGCT ACAACCATTG CTTGTTTGTT TGCCATTCTT TTGGCGGTAT GAAATGTTCT
13321 TGCAAGTTGG GGCATTTCTT GACTCCTCAC TCTTGCTTCT GGTGGCTTTT TTTGCTGTGT
13381 ACCGGCTTGT CTTGGTCCTT TGTCGATGGC AACGACAACA GCTCGACATC CCAATACATA
13441 TATAATTTGA CGATATGCGA GCTGAATGGG ACCGAATGGT TGTCCGGTCA TTTTGATTGG
13501 GCAGTCGAAA CCTTTGTGCT TTACCCAGTT GCCACTCATA TCATTTCACT GGGTTTTCTC
13561 ACAACAAGCC ATTTCCTTGA TGCGCTCGGT CTCGGCGCTG TGTCCGCCAC AGGATTCATT
13621 GGCGAGCGGT ATGTACTTAG CAGCATGTAC GGCGTTTGCG CCTTCGCGGC GCTCGTATGT
13681 TTTGTCATCC GTGCTGCTAA AAATTGCATG GCTTGCCGCT ATGCCCGCAC CCGGTTTACC
13741 AACTTCATCG TGGACGACCG GGGAAGAATC CATCGATGGA AGTCTTCAAT AGTGGTGGAG
13801 AAATTGGGCA AAGCTGAAGT CGGTGGTGAC CTTGTCAACA TTAAGCATGT TGTCCTCGAA
13861 GGGGTTAAAG CTCAACCCTT GACGAGGACT TCGGCTGAGC AATGGGAAGC CTAGACGACT
13921 TTTGCAACGA TCCCACCGCC GCACAAAAAC TCGTGCTGGC CTTTAGCATC ACATATACAC
13981 CCATAATGAT ATACGCCCTT AAGGTGTCAC GCGGCCGACT CCTGGGGCTG TTGCACATCT
14041 TGATATTTCT GAATTGTTCC TTTACTTTTG GGTACATGAC ATATGTGCAT TTTCAATCCA
14101 CCAACCGTGT CGCACTCACT CTGGGGGCTG TAGTCGCCCT TTTGTGGGGT GTTTACAGCC
14161 TCACAGAGTC ATGGAAGTTC ATCACTTCCA GATGCAGATT GTGTTGCCTA GGCCGGCGAT
14221 ACATTCTGGC CCCTGCCCAT CACGTAGAAA GTGCTGCAGG CCTCCATTCA ATCCCAGCGT
14281 CTGGTAACCG AGCATACGCT GTGAGAAAGC CCGGACTAAC ATCAGTGAAC GGCACTCTAG
14341 TACCTGGGCT TCGGAGCCTC GTGCTGGGCG GCAAACGAGC TGTTAAACGA GGAGTGGTTA
14401 ACCTCGTCAA GTATGGCCGG TAAGAACCAG AGCCAGAAGA AAAGAAGAAA TGCAGCTCCG
14461 ATGGGGAAAG GCCAGCCAGT CAATCAACTG TGCCAGTTGC TGGGTACAAT GATAAAGTCC
14521 CAGCGCCAGC AATCTAGGGG AGGACAGGCC AAAAAGAAGA AGCCTGAGAA GCCACATTTT
14581 CCCCTAGCTG CTGAAGATGA CATTCGGCAC CATCTCACCC AGGCCGAACG TTCCCTCTGC
14641 TTGCAATCGA TCCAGACGGC TTTCAATCAA GGCGCAGGAA CTGCGTCGCT TTCATCCAGC
14701 GGGAAGGTCA GTTTCCAGGT TGAGTTCATG CTGCCGGTTG CTCATACAGT GCGCCTGATT
14761 CGCGTGACTT CTACATCCGC CAGTCAGGGT GCAAATTAAT TTGACAGTCA GGTGAATGGC
14821 CGCGATTGAC GTGTGGCCTC TAA
```

SEQ ID NO:11 ORF 1a OF PARENTAL PRRSV STRAIN 94881 ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:10 BETWEEN NUCLEOTIDES 178..7227

```
MSGMFSRCMCTPAARVFWNAGQVYCTRCLSARSLLSPELQDTDLGAVGLFHKPKDKLHWKVPIGIPQVECSPSGC
CWLSTIFPLARMTSGNHNFLQRLVKVADVLYRDGCLTPRHLRELQVYERGCNWYPITGPVPGMAVYANSMHVSDQ
PFPGATHVLTNSPLPQRACRQPFCPFEEAHSSIYRWEKFVIFMDSSSDGRSRMMWTPESDDSTALEVLPPELEHQ
VKVLVRSFPAHHLVDLADWELTESPENGFSFSTSHPCGYLVRDPAVSEGKCWLSCFLSQSAEVLSREAHLATAYG
YQTKWGVPGKYIQRRLQVHGLRAVVDPDGPIHVEALSCPQSWIRHLTLNDDVTPGFVRLMSLRIVPNTEPTTHRI
FRFGVHKWYGAAGKRARGKRAAKSEKDSASTLKVARPTSTSGIVTYSPPADGSCGWHALAAILNRMINNDFTSPL
PRYNRPEDDWASDGDLAQAIQCLQLPAAIARNRACPNAKYLVKLNGVHWEVEVRPGMAPRSLSRECVVGVCSEGC
```

VASPYPEDGLPKRALEALASAYRLPSDCVCDGIIDFLANPPPQEFWTLDKMLTSPSPEQSGFSSLYKLLLEVLPQ
KCGSTEGEFIYTVERMLKDCPSSKQAMALLAKIKVPSSKAPSVTLNECFPTDVPVNSELISWEEPKDPGAAVVLC
PSDAKESKETAPEEAQARNRKVLHPVVLTEELSEQQVQVVEGDQDMPLDLTWPTLTATATPVRGPVPDNLSSGIG
AQPATVQELILARPAPRLVERCGTESNGSSSFLDLPDVQTSDQPLDLSLAAWPVRATASDPGWIHGRREPVFVKP
RGVFSDGESALQFGELSEASSVVDDRTKEAPVVDAPIDLTTSNETLSGSDPFEFAKFRRPRFSAQALIDRGGPLA
DVHAKIKSRVYEQCLQACEPGSRATPATKKWLDKMWDRVDMKTWRCTSQFQAGHILESLKFLPDMIQDTPPPVPR
KNRAGDSAGLKQLVAQWDRKLSVTPPTKPVGPVLDQTVPLPMDIQQEDAISADKPPHSQNPSSQVDVGGGWKSFM
LSGTRFAGSVSQRLTTWVFEVLSHLPAFMLTLFSPRGSMAPGDWLFAGAVLLALLLCRSYPILGCLPLLGVFSGS
VRCVRLGVFGSWMAFAVFLFSTPPDPVGSSCDHDSPECHAELLALEQRQLWEPVRSLVVGPSGLLCVILGKLLGG
SRCLWFVLLRICMLADLAISLIYVVSQGRCHKCWGKCIRTAPAEVTLNVFPFSRATRSSLVSLCDRFQAPKGVDP
VHLATGWRGCWCGESPIHQSHQKPIAYANLDEKKISAQTVIAVPYDPSQAIKCLKVLQAGGAIVDQPTPEVVRVS
EIPFSAPFFPKVPVNPDCRVVVDSDTFVAAVRCGYSTAQLVLGRGNFAKLNQTPLRNSVPTKTTGGASYTLAVAQ
VSVWTLVHFILGLWLTSPQVCGRGTSDPWCSNPFSYPTYGPGVVCSSRLCVSADGVTLPLFSAVAHLSGREVGIF
ILVLASLGALAHRLALKADMSMVFLAFCAYAWPMSSWLICFFPMLLRWVTLHPLTMLWVHSFLVFCLPAAGVLSL
GITGLLWAVGRFTQVAGIITPYDIHQYTSGPRGAAAVATAPEGTYMAAVRRAALTGRTLIFTPSAVGSLLEGAFR
TQKPCLNTVNVVGSSLGSGGVFTIDGRRVIVTATHVLNGNTARVTGDSYNRMHTFNTNGDYAWSHADDWQGVAPM
VKIAKGYRGRAYWQTSTGVEPGIMGEGFAFCFTNCGDSGSPVISEAGDLIGVHTGSNKLGSGLVTTPEGETCSIK
ETRLSDLSRHFAGPSVPLGDIKLSPAIIPDVTTIPSDLASLLASVPVMEGGLSTVQLLCVFFLLWRMMGHAWTPI
VAVGFFLLNEILPAVLVRAVFSFALFVLAWATPWSAQVLMIRLLTAALNRNRLSLAFYALGGVVGLATEIGTFAG
GWPELSQALSTYCFLPRFLAVTSYVPTIIIGGLHALGVILWLFKYRCLHNMLVGDGSFSSAFFLRYFAEGNLRKG
VSQSCGMNNESLTAALACKLSQADLDFLSSLTNFKCFVSASNMKNAAGQYIEAAYARALRQELASLVQVDKMKGV
LAKLEAFAETATPSLDTGDVIVLLGQHPHGSILDINVGGERKTVSVQETRCLGGSKFSVCTVVSNTPVDTLTGIP
LQTPTPLFENGPRHRSEDDDLKVERMKKHCVSLGFHKINGKVYCKIWDKSNGDTFYTDDSRYTQDHAFQDRSTDY
RDRDYEGVQTAPQQGFDPKSEAPVGTVVIGGITYNRHLVKGKEVLVPKPDNCLEAARLSLEQALAGMGQTCDLTA
TEVEKLKRIISQLQGLTTEQALNC

SEQ ID NO:12 ORF 1B OF PARENTAL PRRSV STRAIN 94881 ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:10 BETWEEN NUCLEOTIDES 7209..11600

TGFKLLAASGLTRCGRGGLVVTETAVKIVKYHSRTFTLGSLDLKVTSEVEVKKSTEQGHAVVANLCSGVVLMRPH
PPSLVDVLLKPGLDTTPGIQPGHGAGNMGVNGSIWDFETAPTKVELELSKQIIQACEVRRGDAPNLQLPYKLYPV
RGDPERRKGRLVNTRFGDLPYKTPQDTKSAIHAACCLHPNGVLVSDGKSTLGTTLQHGFELYVPTVPYSVMEYLD
SRPDTPFMCTKHGTSKAAAEDLQKYDLSTQGFVLPGVLRLVRRFIFSHVGKAPPLFLPSTYPAKNSMAGVNGQRF
PTKDVQSIPEIDEMCARAVKENWQTVTPCTLKKQYCSKPKTRTILGTNNFIALAHRSALSGVTQAFMKKAWKSPI
ALGKNKFKELHCTVAGRCLEADLASCDRSTPAIVRWFVANLLYELAGCEEYLPSYVLNCCHDLVATQDGAFTKRG
GLSSGDPVTSVSNTVYSLIIYAQHMVLSALKMGHEIGLKFLEEQLKFEDLLEIQPMLVYSDDLVLYAERPTFPNY
HWWVEHLDLMLGFKTDPKKTVITDKPSFLGCRIEAGRQLVPNRDRILAALAYHMKAQNASEYYASAAAILMDSCA
CIDHDPEWYEDLICGIARCARQDGYRFPGPAFFMSMWEKLKSHNEGKKCRHCGICDAKADYASACGLDLCLFHSH
FHQHCPVTLSCGHHAGSKECSQCQSPVGAGKSPLDAVLKQIPYKPPRTIIMKVDNKTTTLDPGRYQSRRGLVAVK
RGIAGNEVDLSDGDYQVVPLLPTCKDINMVKVACNVLLSKFIVGPPGSGKTTWLLNQVQDDDVIYTPTHQTMFDI
VSALKVCRYSIPGASGLPFPPPARSGPWVRLIASGHVPGRVSYLDEAGYCNHLDILRLLSKTPLVCLGDLQQLHP
VGFDSYCYVFDQMPQKQLTTIYRFGPNICAAIQPCYREKLESKARNTRVVFTTRPVAFGQVLTPYHKDRTGSAIT
IDSSQGATFDIVTLHLPSPKSLNKSRALVAITRARHGLFIYDPHDQLQEFFNLTPERTDCNLAFSRGDELVVLNV
DNAVTTVAKALETGSPRFRVSDPRCKSLLAACSASLEGSCMPLPQVAHNLGFYFSPDSPAFAPLPKELAPHWPVV
THQNNRAWPDRLVASMRPIDARYSKPMVGAGYVVGPSIFLGTPGVVSYYLTLYIGGEPQALPETLVSTGRIATDC
REYLDAAEEEAARELPHAFIGDVKGTTVGGCHHITSKYLPRSLPKDSVAVVGVSSPGRAAKAVCTLTDVYLPELR
PYLQPETASKCWKLKLDFRDVRLMVWKGATAYFQLEGLTWSALPDYARFIQLPKDAVVYIDPCIGPATANRKVVR
TTDWRADLAVTPYDYGAQVILTTAWFEDLGPQWKILGLQPFRRTFGFENTEDWAILARRMNDGKDYTDYNWHCVR
ERPHAIYGRARDHTYHFALGTELQVELGRPRLPPEQVP

SEQ ID NO:13 ORF 2 OF PARENTAL PRRSV STRAIN 94881 ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:10 BETWEEN NUCLEOTIDES 11611..12360

MQWVHCGVKSVSCSWMPSLSSLLVWLTLSSFSPYCLGSLLQAGYWSSFSEWFAPRFSVRALPFTLPNYRRSYEGL
LPNCRPDVPQFAVKHPLGILWHMRVSHLIDEMVSRRIYRTMEHSGQAAWKQVVSEATLTKLSRLDVVTHFQHLAA
VEADSCRFLSSRLAMLKNLAVGNVSLEYNTTLDRVELIFPTPGTRPKLTDFRQWLISVHASIFSSVASSVTLFTV
LWLRIPALRYVFGFHWPTATHHSN

SEQ ID NO:14 ORF 3 OF PARENTAL PRRSV STRAIN 94881 ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:10 BETWEEN NUCLEOTIDES 12219..13016

MAYQRARFHLLLCGFVCYLVHSALASNSSSTLCFWFPLAHGNTSFELTINYTICKPCPTSQAAQQRLEPGRNVWC
KIGHDRCEERDHDELSMSIPSGYDNLKLEGYYAWLAFLSFSYAAQFHPELFGIGNVSRVFVDKRHQFICAEHDGQ
NSTISARHNISASYAVYYHHQIDGGNWFHLEWLRPFFSSWLVLNISWFLRRSPASPASRRIYQILRPTRPRLPVS
WSFRTSIVSNLTGPQQRKVPLPSGGRPNVVKPSAFPSTSR

SEQ ID NO:15 ORF 4 OF PARENTAL PRRSV STRAIN 94881 ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:10 BETWEEN NUCLEOTIDES 12761..13312

MAATILFLLAGAQHLMVSEAFACKPCFSTHLSDIKTNTTAAAGFMVLQNINCFQSHRASTAQGTTPLRRSSQCRE
AVGIPQYITITANVTDESYLYNADLLMLSACLFYASEMSEKGFKVIFGNISGVVSACVNFTDYVAHVTQHTQQHH
LVIDHIRLLHFLTPSTMRWATTIACLFAILLAV

SEQ ID NO:16 ORF 5 OF PARENTAL PRRSV STRAIN 94881 ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:10 BETWEEN NUCLEOTIDES 13309..13914

MKCSCKLGHFLTPHSCFWWLFLLCTGLSWSFVDGNDNSSTSQYIYNLTICELNGTEWLSGHFDWAVETFVLYPVA
THIISLGFLTTSHFLDALGLGAVSATGFIGERYVLSSMYGVCAFAALVCFVIRAAKNCMACRYARTRFTNFIVDD
RGRIHRWKSSIVVEKLGKAEVGGDLVNIKHVVLEGVKAQPLTRTSAEQWEA

SEQ ID NO:17 ORF 6 OF PARENTAL PRRSV STRAIN 94881 ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:10 BETWEEN NUCLEOTIDES 13902..14423

MGSLDDFCNDPTAAQKLVLAFSITYTPIMIYALKVSRGRLLGLLHILIFLNCSFTFGYMTYVHFQSTNRVALTLG
AVVALLWGVYSLTESWKFITSRCRLCCLGRRYILAPAHHVESAAGLHSIPASGNRAYAVRKPGLTSVNGTLVPGL
RSLVLGGKRAVKRGVVNLVKYGR

SEQ ID NO:18 ORF 7 OF PARENTAL PRRSV STRAIN 94881 ENCODED BY SEQUENCE OF SEQ ID NO:10 BETWEEN NUCLEOTIDES 14413..14799

MAGKNQSQKKRRNAAPMGKGQPVNQLCQLLGTMIKSQRQQSRGGQAKKKKPEKPHFPLAAEDDIRHHLTQAERSL
CLQSIQTAFNQGAGTASLSSSGKVSFQVEFMLPVAHTVRLIRVTSTSASQGAN

SEQ ID NO:19 Nucleotide encoding attenuated PRRSV 94881 ORF1A

178 ATG
181 TCTGGGATGT TCTCCCGGTG CATGTGCACC CCGGCTGCCC GGGTATTTTG GAACGCCGGC

```
 241 CAAGTCTATT GCACACGGTG TCTCAGTGCA CGGTCTCTTC TCTCTCCAGA ACTTCAGGAC
 301 ACGGACCTCG GTGCAGTTGG CTTGTTTCAC AAGCCTAAAG ACAAGCTCCA TTGGAAAGTT
 361 CCCATTGGTA TCCCCCAGGT GGAATGTTCT CCATCTGGGT GTTGCTGGCT GTCAACCATT
 421 TTTCCTTTAG CGCGCATGAC CTCCGGCAAT CACAACTTCC TTCAACGACT CGTGAAGGTT
 481 GCTGATGTAT TGTACCGTGA CGGTTGCTTA ACCCCTAGAC ACCTCCGTGA ACTCCAAGTT
 541 TACGAGCGTG GTTGCAATTG GTATCCGATT ACGGGGCCTG TGCCTGGGAT GGCTGTGTAC
 601 GCGAACTCCA TGCACGTGTC CGACCAACCG TTCCCTGGTG CCACTCATGT GTTAACAAAT
 661 TCCCCTTTGC CTCAACGGGC TTGTCGGCAG CCGTTCTGTC CGTTCGAAGA GGCCCATTCT
 721 AGCATATACA GGTGGGAAAA ATTTGTAATT TTTATGGATT CCTCCTCCGA CGGTCGATCT
 781 CGCATGATGT GGACTCCGGA ATCCGATGAC TCCACGGCTT TGGAAGTTCT GCCGCCCGAG
 841 CTAGAACACC AGGTCAAGGT CCTTGTTCGG AGCTTTCCCG CCCATCACCT TGTCGACCTT
 901 GCCGATTGGG AGCTCACTGA GTCCCCTGAT AACGGTTTTT CCTTCAGCAC GTCACATCCT
 961 TGCGGCTACC TTGTTCGGGA CCCGGCTGTA TCCGAAGGCA AGTGTTGGCT TTCCTGCTTT
1021 TTGAGCCAGT CAGCCGAAGT GCTCAGTCGC GAGGCGCATC TGGCTACCGC CTATGGTTAC
1081 CAAACCAAGT GGGGTGTGCC TGGCAAGTAC ATCCAGCGCA GACTTCAAGT TCACGGTCTC
1141 CGTGCTGTGG TCGACCCTGA TGGTCCCATT CACGTTGAAG CATTGTCTTG CCCCCAGTCT
1201 TGGATCAGGC ACTTGACCCT GAATGATGAT GTCACCCCGG GATTCGTTCG CCTAATGTCT
1261 CTTCGCATTG TGCCGAACAC AGAGCCTACC ACACACCGGA TCTTTCGTTT TGGAGTGCAC
1321 AAGTGGTATG GTGCCGCCGG CAAACGGGCC CGTGGCAAGC GTGCCGCCAA AAGTGAGAAA
1381 GACTCGGCTT CCACCCTCAA GGTTGCCCGA CCGACTTCCA CCAGTGGAAT CGTCACCTAC
1441 TCCCCACCTG CGGACGGGTC TTGTGGTTGG CATGCCCTTG CCGCCATACT GAACCGGATG
1501 ATTAATAATG ACTTCACGTC CCCTCTGCCT CGGTACAACA GGCCGGAGGA CGATTGGGCT
1561 TCTGATGGTG ACCTTGCTCA GGCCATTCAA TGTTTGCAAC TACCTGCCGC CATAGCTCGG
1621 AACCGCGCCT GCCCTAACGC CAAATACCTC ATAAAACTCA ACGGAGTTCA TTGGGAGGTA
1681 GAGGTGAGGC CTGGAATGGC TCCTCGCTCC CTCTCTCGTG AGTGCGTTGT TGGCGTCTGC
1741 TCTGAAGGCT GTGTCGCGTC GCCTTACCCG GAGGACGGGT TGCCTAAACG TGCACTTGAG
1801 GCCCTGGCGT CTGCTTATAG ACTGCCTTCA GACTGTGTTT GTGATGGTAT TATTGACTTC
1861 CTTGCCAATC CACCTCCCCA GGAGTTCTGG ACTCTTGACA AAATGTTGAC TTCCCCGTCA
1921 CCGGAGCAGT CCGGCTTCTC TAGTCTGTAT AAATTGTTGT TAGAGATCTT GCCGCAGAAA
1981 TGCGGATCCA CAGAAGGGGA ATTCATCTAT ACTGTTGAGA GGATGTTGAA GGATTGTCCG
2041 AGCTCCAAAC AGGCCATGGC CCTCCTTGCA AAAATTAAGG TCCCATCCTC AAAGGCCCCA
2101 TCCGTGACTC TGAACGAGTG CTTCCCCACG GATGTTCCAG TCAACTCTGA GTTAATATCT
2161 TGGGAAGAGC CCAAAGACCC TGGCGCTGCT GTTGTCCTAT GTCCATCGGA TGCAAAAGAA
2221 TCTAAGGAAA CAGCCCCTGA AGAAGCTCAA GCGAGAAACC GTAAGGTCCT TCACCCTGTG
2281 GTCCTTACCG AGGAACTTAG CGAGCAACAG GTGCAGGTGG TTGAGGGTGA TCAGGATATG
2341 CCACTGGATT TGACTTGGCC AACCTTAACC GCTACGGCGA CCCCTGTTAG AGGGCCGGTA
2401 CCGGACAATT TGAGCTCTGG CATTGGTGCC CAGCCCGCTA CCGTTCAAGA ACTCATTCTG
2461 GCGAGGCCTG CACCCCGTCT TGTTGAGCGC TGTGGCACGG AGTCGAACGG CAGCAGTTCA
2521 TTTCTGGATT TGCCTGACGT GCAGACCTCG GACCAGCCTT TAGACCTGTC CCTGGCCGCG
2581 TGGCCTGTAA GGGCTACCGC GTCTGACCCC GGTTGGATCC ACGGTAGGCG TGAGCCTGTC
2641 TTTGTGAAGC CTCGAGGTGT TTTCTCTGAT GGCGAGTCGG CCCTTCAGTT CGGAGAGCTT
2701 TCCGAAGCCA GTTCTGTCGT CGATGACCGG ACAAAAGAAG CTCCGGTGGT TGACGCCCCC
2761 ATCGATTTGA CAACTTCGAA CGAGACGCTC TCTGGGTCTG ACCCCTTTGA ATTCGCCAAA
2821 TTCAGGCGCC CGCGTTTCTC CGCGCAAGCT TTAATCGACC GAGGTGGTCC GCTTGCCGAT
2881 GTTCATGCAA AGATAAAGAG TCGGGTATAT GAACAATGCC TTCAAGCTTG TGAACCTGGT
2941 AGTCGTGCGA CCCCAGCCAC CAAGAAGTGG CTCGACAAAA TGTGGGACAG GGTGGACATG
3001 AAAACTTGGC GCTGCACCTC GCAGTTCCAA GCTGGTCACA TTCTTGAGTC CCTCAAATTC
3061 CTCCCTGACA TGATTCAAGA CACACCGCCT CCTGTTCCCA GGAAGAACCG AGCTGGTGAC
3121 AGTGCCGGCC TGAAGCAACT GGTGGCGCAG TGGGATAGGA AATCGAGTGT GACACCCCCC
3181 ACAAAACCGG TTGGACCGGT GCTTGACCAG GCCGTCCCTC TGCCTATGGA CATCCAGCAA
3241 GGAGATGCCA TCTCCGCTGA CAAGCCACCC CATTCGCAAA ACCCTTCTAG TCAAGTAGAT
3301 GTGGGTGGAG GTTGGAAAAG TTTTATGCTC TCCGGCACCC GTTTCGCGGG GTCCGTTAGT
```

```
3361 CAGCGCCTTA CGACATGGGT TTTTGAGGTT CTCTCCCATC TCCCAGCTTT TATGCTCACA
3421 CTTTTCTCGC CACGGGGCTC TATGGCTCCA GGTGATTGGC TGTTTGCAGG TGCTGTTCTA
3481 CTTGCTCTCC TGCTCTGCCG TTCTTACCCA ATACTCGGAT GCCTTCCCTT ATTGGGTGTC
3541 TTTTCTGGTT CTGTGCGGTG TGTTCGTTTG GGTGTTTTTG GTTCTTGGAT GGCTTTTGCT
3601 GTATTTTTAT TCTCGACTCC ACCCGACCCA GTCGGTTCTT CTTGTGACCA CGATTCGCCG
3661 GAGTGTCATG CTGAGCTTTT GGCTCTTGAG CAGCGCCAAC TTTGGGAACC TGTGCGCAGC
3721 CTTGTGGTCG GGCCATCGGG CCTCTTATGC GTCATTCTTG GCAAGTTACT CGGTGGGTCA
3781 CGTTGTCTCT GGTTTGTTCT CCTACGTATA TGCATGCTCG CAGATTTGGC AATTTCTCTT
3841 ATTTATGTGG TGTCCCAAGG GCGTTGTCAC AAGTGTTGGG GAAAGTGTAT AAGGACGGCT
3901 CCTGCAGAAG TGGCCCTTAA TGTGTTTCCT TTTTCGCGCG CCACCCGCTC ATCTCTTGTG
3961 TCCTTGTGTG ATCGGTTCCA AGCGCCAAAA GGAGTTGACC CCGTGCACTT GGCGACAGGC
4021 TGGCGCGGGT GCTGGTGTGG TGAGAGCCCT ATTCATCAAT CACACCAAAA ACCGATAGCT
4081 TATGCCAACT TGGATGAAAA GAAGATATCC GCCCAGACGG TGATTGCTGT CCCGTATGAT
4141 CCTAGTCAGG CCATTAAATG CCTGAAAGTT TTGCAGGCAG GAGGGGCTAT TGTGGACCAG
4201 CCTACGCCCG AGGTCGTCCG TGTGTCTGAG ATTCCCTTCT CGGCCCCATT TTTTCCGAAG
4261 GTCCCAGTCA ACCCAGACTG CAGGGTTGTG GTAGATTCGG ACACTTTTGT GGCTGCGGTC
4321 CGCTGCGGTT ATTCGACAGC ACAACTGGTC CTTGGTCGGG GCAACTTTGC CAAGCTAAAT
4381 CAGACCCCCC TCAGGAACTC TGTCCCCACC AAAACAACTG GTGGGGCCTC ATACACCCTT
4441 GCCGTGGCCC AGGTATCTGT GTGGACTCTT GTTCATTTCA TCCTCGGCCT TTGGTTAACG
4501 TCACCTCAAG TGTGTGGTCG AGGGACCTCT GACCCGTGGT GTTCGAACCC TTTTTCGTAT
4561 CCTACTTATG GCCCCGGAGT TGTGTGTTCC TCTCGACTCT GCGTGTCTGC CGACGGAGTT
4621 ACCCTGCCAT TGTTCTCAGC CGTTGCCCAT CTTTCCGGTA GAGAGGTGGG GATTTTTATT
4681 TTGGTGCTTG CCTCCTTGGG CGCTTTAGCC CACCGCTTGG CTCTTAAGGC AGACATGTCA
4741 ATGGTCTTTT TGGCGTTTTG TGCTTACGCC TGGCCCATGA GCTCCTGGTT AATTTGCTTC
4801 TTTCCTATGC TCTTGAGGTG GGTAACCCTT CATCCTCTCA CTATGCTTTG GGTGCACTCA
4861 TTTTTGGTGT TTTGCCTACC AGCTGCCGGC GTTCTCTCGC TGGGAATAAC CGGTCTTCTT
4921 TGGGCAGTTG GCCGTTTCAC CCAGGTTGCC GGAATTATCA CACCTTATGA CATCCACCAG
4981 TATACCTCCG GACCACGTGG TGCAGCTGCT GTAGCAACGG CTCCAGAAGG TACTTACATG
5041 GCGGCCGTTC GGAGAGCCGC TTTGACTGGA CGGACTTTGA TCTTCACACC ATCTGCAGTC
5101 GGATCCCTTC TTGAAGGTGC TTTCAGAACT CAAAAGCCCT GCCTTAACAC CGTGAATGTC
5161 GTAGGCTCTT CCCTTGGTTC TGGAGGAGTT TTCACCATTG ATGGCAGAAG AGTCATCGTC
5221 ACTGCCACCC ATGTGTTGAA TGGTAACACA GCCAGGGTCA CTGGTGATTC CTACAACCGC
5281 ATGCACACGT TCAATACTAA TGGTGATTAT GCCTGGTCCC ATGCTGATGA CTGGCAAGGC
5341 GTTGCCCCTA TGGTTAAGAT CGCTAAGGGG TATCGCGGTC GTGCCTACTG GCAAACGTCA
5401 ACCGGAGTCG AACCTGGCAT CATGGGGGAA GGATTCGCCT TCTGTTTCAC TAACTGTGGC
5461 GACTCAGGGT CACCTGTCAT TTCAGAAGCT GGTGACCTTA TTGGAGTCCA TACCGGTTCA
5521 AACAAACTCG GTTCTGGTCT TGTGACAACC CCTGAAGGGG AGACCTGCTC CATCAAGGAA
5581 ACTAGGCTCT CTGACCTTTC TAGACATTTT GCAGGTCCAA GCGTCCCTCT TGGGGACATT
5641 AAGTTGAGCC CAGCCATCAT CCCTGATGTG ACAACTATTC CGAGTGACTT GGCATCGCTC
5701 CTTGCTTCTG TCCCCGTGAT GGAAGGTGGC CTCTCAACTG TCCAGCTTTT GTGCGTCTTT
5761 TTCCTTCTCT GGCGCATGAT GGGCCATGCC TGGACACCCA TTGTTGCCGT AGGCTTCTTT
5821 TTGCTGAATG AAATTCTCCC AGCAGTCTTG GTCCGAGCTG TGTTCTCTTT TGCACTCTTT
5881 GTACTTGCAT GGGCCACCCC CTGGTCGGCA CAAGTGTTGA TGATTAGACT CCTCACGGCG
5941 GCTCTCAACC GCAACAGGTT GTCCCTGGCG TTCTACGCAT TCGGAGGTGT CGTTGGCCTG
6001 GCCACAGAAA TCGGGACTTT TGCTGGTGGA TGGCCTGAAC TGTCCCAAGC CCTCTCGACA
6061 TACTGCTTCC TGCCCAGGTT CCTTGCTGTG ACTAGTTATG TCCCCACCAT CATCATCGGT
6121 GGGCTCCATG CCCTCGGCGT AATTTTGTGG TTATTCAAAT ACCGATGCCT CCACAACATG
6181 CTGGTTGGTG ATGGGAGTTT CTCAAGCGCT TTCTTCCTAC GGTATTTTGC TGAGGGTAAT
6241 CTTAGGAAAG GCGTGTCGCA GTCCTGTGGC ATGAATAACG AATCCCTGAC AGCTGCTTTG
6301 GCTTGCAAGT TGTCGCAAGC TGACCTTGAT TTTTTGTCCA GTTTAACGAA CTTCAAGTGC
6361 TTTGTGTCCG CTTCAAACAT GAAAAATGCA GCTGGCCAAT ACATCGAGGC GGCGTATGCT
6421 AGAGCTCTGC GTCAGGAGCT GGCCTCCTTG GTTCAGGTTG ACAAGATGAA AGGAGTATTG
```

```
6481 GCCAAGCTCG AGGCTTTCGC TGAGACGGCC ACTCCGTCAC TTGACACAGG GGACGTGATT
6541 GTTCTGCTTG GGCAACACCC CCATGGATCC ATCCTCGACA TTAATGTGGG GGGTGAAAGG
6601 AAAACTGTGT CTGTGCAAGA AACACGATGC CTGGGTGGTT CCAAATTCAG TGTCTGCACT
6661 GTCGTGTCCA ACACGCCCGT GGATACCTTG ACCGGTATCC CACTTCAGAC GCCAACCCCA
6721 CTTTTTGAAA ATGGCCCGCG CCATCGCAGC GAGGACGACG ACCTCAAAGT TGAGAGAATG
6781 AAAAAACACT GTGTATCCCT CGGCTTCCAC AAAATCAATG GTAAAGTTTA CTGCAAAATT
6841 TGGGACAAGT CTAACGGCGA CACCTTTTAC ACGGATGATT CCCGATACAC TCAAGACCAT
6901 GCTTTTCAGG ACAGGTCAAC CGACTATAGA GACAGGGATT ATGAAGGTGT ACAGACCGCC
6961 CCCCAACAGG GATTCGATCC AAAGTCCGAA GCCCCTGTTG GCACTGTTGT AATCGGTGGC
7021 ATTACGTATA ACAGGCATCT GGTCAAAGGT AAGGAGGTCC TAGTTCCCAA ACCTGACAAC
7081 TGCCTTGAAG CTGCCAGACT GTCCCTTGAG CAAGCTCTTG CTGGGATGGG CCAAACTTGT
7141 GACCTTACAG CTACCGAAGT GGAGAAACTA AAGCGCATCA TTAGTCAACT CCAAGGTCTG
7201 ACCACTGAAC AGGCTTTAAA CTGCTAG
```

SEQ ID NO:20 Nucleotide encoding attenuated PRRSV 94881 ORF1B

```
7209 AC AGGCTTTAAA CTGCTAGCCG CCAGCGGCTT GACCCGCTGT GGCCGCGGCG
7261 GCCTAGTTGT AACTGAAACG GCGGTAAAAA TCGTAAAATA CCACAGCAGA ACTTTCACCT
7321 TAGGCTCTTT AGACCTAAAA GTCACCTCCG AGGTGGAGGT GAAGAAATCA ACTGAGCAGG
7381 GGCACGCTGT CGTGGCGAAC TTATGTTCCG GTGTCGTCTT GATGAGGCCT CACCCACCGT
7441 CCCTTGTTGA CGTTCTCCTC AAACCCGGAC TTGACACAAC ACCCGGCATT CAACCAGGGC
7501 ATGGGGCCGG GAATATGGGC GTGAACGGTT CTATTTGGGA TTTTGAAACT GCACCCACAA
7561 AGGTAGAACT AGAGTTGTCC AAGCAAATAA TCCAAGCATG TGAAGTCAGG CGCGGGGACG
7621 CCCCTAACCT CCAACTCCCC TACAAGCTTT ATCCTGTCAG GGGGGACCCC GAGCGGCGTA
7681 AAGGTCGCCT TGTCAACACT AGGTTTGGAG ATTTACCTTA CAAAACTCCC CAAGACACCA
7741 AGTCCGCAAT TCATGCGGCT TGTTGCCTGC ATCCCAATGG GGTCCTCGTG TCTGATGGCA
7801 AATCCACGCT GGGTACCACT CTTCAACATG GTTTCGAGCT TTATGTCCCC ACTGTACCTT
7861 ATAGTGTCAT GGAATACCTT GATTCACGCC CTGACACCCC TTTTATGTGT ACTAAACATG
7921 GCACTTCCAA GGCTGCTGCA GAGGACCTCC AAAAATATGA CCTATCCACT CAAGGGTTTG
7981 TCTTGCCTGG GGTCCTACGC CTAGTGCGCA GGTTCATCTT TAGCCATGTT GGTAAGGCGC
8041 CACCACTGTT CCTTCCATCA ACCTACCCTG CCAAGAACTC CATGGCAGGG GTCAATGGCC
8101 AGAGGTTCCC AACAAAGGAT GTCCAGAGCA TACCTGAAAT TGATGAAATG TGCGCCCGTG
8161 CCGTCAAGGA AAATTGGCAG ACTGTGACAC CTTGCACCCT CAAAAAACAG TACTGTTCCA
8221 AACCTAAAAC TAGAACCATC CTAGGTACCA ACAACTTCAT AGCCTTGGCT CACAGGTCAG
8281 CACTCAGTGG TGTCACCCAG GCGTTCATGA AGAAGGCCTG GAAGTCCCCA ATTGCCTTGG
8341 GGAAAAACAA GTTTAAGGAA TTGCATTGCA CTGTCGCCGG CAGATGCCTT GAGGCTGACC
8401 TGGCTTCCTG CGATCGCAGC ACCCCCGCCA TTGTGAGGTG GTTTGTTGCC AACCTCCTGT
8461 ATGAACTTGC AGGATGTGAA GAGTACTTGC CTAGCTACGT GCTCAACTGT TGCCATGACC
8521 TTGTGGCAAC GCAGGATGGC GCTTTCACAA AACGCGGTGG CCTGTCGTCC GGGGACCCCG
8581 TCACCAGTGT GTCCAACACC GTCTACTCAC TGATAATTTA CGCCCAGCAC ATGGTGCTTT
8641 CGGCCTTGAA GATGGGTCAT GAAATTGGTC TCAAGTTCCT TGAGGAACAG CTCAAATTTG
8701 AGGACCTTCT TGAAATCCAG CCCATGTTAG TGTATTCTGA TGACCTCGTC TTGTATGCGG
8761 AAAGACCCAC TTTTCCCAAC TACCATTGGT GGGTCGAGCA TCTTGACCTG ATGTTGGGCT
8821 TTAAAACGGA CCCAAAGAAA ACTGTCATAA CTGATAAACC CAGTTTTCTC GGCTGCAGAA
8881 TTGAAGCAGG ACGGCAGTTA GTCCCCAATC GCGACCGTAT TCTGGCTGCT CTTGCATATC
8941 ATATGAAGGC GCAGAACGCC TCAGAGTATT ATGCGTCCGC TGCCGCAATT CTGATGGATT
9001 CGTGTGCTTG CATTGACCAT GACCCCGAGT GGTATGAGGA TCTTATCTGC GGCATCGCCC
9061 GGTGTGCTCG CCAGGACGGT TACCGTTTTC CAGGCCCGGC ATTTTTCATG TCCATGTGGG
9121 AGAAGCTGAA AAGTCATAAT GAAGGGAAGA AATGCCGTCA CTGCGGCATC TGCGACGCCA
9181 AAGCCGACTA TGCGTCCGCC TGTGGACTTG ATTTGTGTTT GTTCCATTCA CACTTTCATC
```

```
 9241 AACACTGCCC AGTCACTCTG AGCTGTGGCC ACCATGCCGG TTCAAAGGAA TGTTCGCAGT
 9301 GTCAGTCACC TGTCGGGGCT GGCAAATCCC CCCTTGACGC TGTGCTGAAA CAAATCCCGT
 9361 ACAAACCTCC TCGTACCATT ATCATGAAGG TGGACAACAA AACAACGACC CTTGACCCGG
 9421 GAAGATATCA GTCCCGTCGA GGTCTTGTTG CAGTCAAAAG AGGTATTGCA GGTAATGAGG
 9481 TTGATCTTTC TGATGGAGAC TACCAAGTGG TGCCTCTTTT GCCGACTTGC AAAGACATAA
 9541 ACATGGTGAA GGTGGCTTGC AACGTACTAC TCAGCAAGTT TATAGTAGGG CCGCCAGGTT
 9601 CCGGAAAAAC CACCTGGCTA CTGAACCAAG TCCAGGACGA TGATGTCATT TACACACCTA
 9661 CTCATCAGAC AATGTTTGAC ATAGTCAGTG CTCTTAAAGT TTGCAGGTAT TCCATCCCAG
 9721 GAGCCTCAGG ACTCCCTTTT CCACCACCTG CCAGGTCCGG GCCGTGGGTT AGGCTCATCG
 9781 CCAGCGGACA TGTCCCTGGC CGAGTGTCAT ATCTCGATGA GGCAGGATAT TGCAATCATC
 9841 TAGACATTCT AAGGCTGCTT TCCAAAACAC CCCTTGTGTG TTTGGGTGAC CTTCAGCAAC
 9901 TTCACCCGGT CGGCTTTGAT TCCTATTGTT ATGTGTTCGA TCAGATGCCT CAGAAGCAGC
 9961 TGACCACCAT TTATAGATTT GGCCCTAACA TCTGTGCAGC CATCCAGCCT TGTTACAGGG
10021 AGAAACTTGA ATCCAAGGCC AGGAACACCA GAGTGGTTTT CACCACCCGG CCTGTGGCCT
10081 TTGGTCAGGT CCTGACACCG TACCACAAAG ATCGTACCGG CTCTGCAATA ACTATAGATT
10141 CATCCCAGGG GGCGACCTTC GACATTGTGA CATTGCATCT ACCATCGCCA AAGTCCCTAA
10201 ACAAATCCCG AGCACTTGTA GCCATCACTC GGGCAAGACA TGGGTTGTTC ATTTATGACC
10261 CTCATGACCA ACTCCAGGAG TTTTTCAACT TAACCCCCGA GCGCACTGAT TGTAACCTTG
10321 CGTTCAGCCG TGGGGATGAG CTGGTTGTTT TGAATGTGGA TAATGCGGTC ACAACTGTAG
10381 CGAAGGCCCT AGAGACAGGT TCACCCCGAT TTCGAGTATC GGACCCGAGG TGCAAGTCTC
10441 TCTTAGCCGC TTGTTCGGCC AGTCTAGAAG GGAGCTGCAT GCCACTACCA CAAGTAGCAC
10501 ATAACCTGGG GTTTTACTTT TCCCCGGACA GCCCAGCTTT TGCACCCCTG CCAAAAGAGC
10561 TGGCGCCACA TTGGCCAGTG GTCACCCACC AGAATAATCG AGCGTGGCCT GATCGACTTG
10621 TCGCTAGTAT GCGCCCAATT GATGCCCGCT ACAGCAAGCC AATGGTCGGT GCAGGGTATG
10681 TGGTCGGGCC ATCCATTTTT CTTGGCACTC CTGGTGTGGT GTCATACTAT CTCACATTAT
10741 ACATCGGGGG CGAGCCTCAG GCCCTGCCAG AAACACTCGT TTCAACAGGA CGTATAGCCA
10801 CAGATTGTCG GGAATATCTC GACGCGGCTG AGGAAGAGGC AGCGAGAGAA CTTCCCCACG
10861 CATTTATTGG CGATGTCAAA GGCACTACGA TCGGGGGGTG TCACCACATT ACATCGAAAT
10921 ACCTACCTAG GTCCCTGCCT AAAGACTCTG TTGCTGTGGT TGGGGTGAGT TCGCCCGGTA
10981 GGGCTGCTAA AGCCGTGTGC ACTCTCACCG ATGTGTACCT CCCCGAACTC CGACCATATT
11041 TGCAACCGGA GACGGCATCA AAATGCTGGA AACTTAAACT GGATTTCAGG GATGTTCGAC
11101 TGATGGTCTG GAAAGGCGCC ACAGCCTATT TCCAGTTGGA AGGGCTGACA TGGTCAGCGC
11161 TGCCCGATTA TGCTAGGTTC ATTCAGCTAC CCAAGGATGC CGTTGTGTAC ATCGATCCGT
11221 GTATAGGGCC GGCAACAGCC AATCGCAAGG TTGTGCGAAC CACAGACTGG CGGGCCGACC
11281 TGGCAGTGAC ACCGTATGAT TACGGTGCTC AGGTCATTTT GACAACAGCC TGGTTCGAGG
11341 ACCTTGGGCC GCAGTGGAAG ATTTTGGGGT TGCAGCCTTT CAGACGAACA TTTGGCTTTG
11401 AGAACACTGA AGATTGGGCA ATTCTCGCAC GCCGTATGAA TGACGGCAAA GATTACACTG
11461 ACTATAATTG GCATTGTGTA CGAGAACGCC CACACGCAAT TTACGGGCGC GCCCGTGACC
11521 ATACGTATCA TTTTGCCCTT GGCACTGAAC TGCAAGTAGA GCTGGGCAGA CCCCGGCTGC
11581 CTCCTGAGCA AGTGCCGTGA
```

SEQ ID NO:21 Nucleotide encoding attenuated PRRSV 94881 ORF2

```
11611 ATGCAATGGG TTTACTGTGG AGTAAAATCA
11641 GTCAGTTGTT CGTGGATGCC TTCACTGAGT TCCTTGTTAG TGTGGTTGAC ATTGTCATCT
11701 TTCTCGCCAT ATTGTTTGGG TTCACTGTTG CAGGCTGGTT ATTGGTCTTC CTTCTCAGAG
11761 TGGTTTGCTC CGCGTTTCTC CGTTCGCGCT CTGCCATTCA CTCTTCCGAA CTATCGAAGG
11821 TCCTATGAGG GCTTGCTACC CAACTGCAGA CCGGATGTCC CACAATTCGC AGTTAAGCAC
11881 CCGTTGGGTA TACTTTGGCA TATGCGAGTC TCCCACCTAA TTGACGAAAT GGTCTCTCGC
11941 CGCATTTACC GGACCATGGA ACATTCGGGT CAAGCGGCCT GGAAGCAGGT TGTTAGTGAA
```

12001 GCCACTCTCA CAAAACTGTC AAGGCTTGAC GTAGTCACTC ATTTCCAACA CCTGGCCGCA
12061 GTGGAGGCTG ATTCTTGCCG CTTCCTTAGC TCACGACTCG CGATGCTGAA AAACCTTGCC
12121 GTTGGCAATG TGAGCCTGGA GTACAACACT ACTTTGGACC GCGTTGAGCT CATCTTTCCC
12181 ACACCAGGTA CGAGGCCCAA GTTGACCGAT TTTAGGCAAT GGCTTATCAG CGTGCACGCT
12241 TCCATCTTCT CCTCTGTGGC TTCGTCTGTT ACCTTGTTCA CAGTGCTTTG GCTTCGAATT
12301 CCAGCTCTAC GCTATGTTTT TGGTTTCCAT TGGCCCACGG CAACACATCA TTCGAACTAA

SEQ ID NO:22 Nucleotide encoding attenuated PRRSV 94881 ORF3

12219 AT GGCTTATCAG CGTGCACGCT
12241 TCCATCTTCT CCTCTGTGGC TTCGTCTGTT ACCTTGTTCA CAGTGCTTTG GCTTCGAATT
12301 CCAGCTCTAC GCTATGTTTT TGGTTTCCAT TGGCCCACGG CAACACATCA TTCGAACTAA
12361 CTATCAATTA CACTATATGT AAGCCATGCC CTACCAGTCA AGCTGCCCAA CAAAGACTCG
12421 AGCCTGGCCG TAACGTGTGG TGCAAAATAG GGCACGACAG GTGTGAGGAA CGTGACCATG
12481 ATGAGTTGTC AATGTCCATT CCGTCCGGGT ACGACAACCT CAAACTTGAG GGTTATTATG
12541 CTTGGCTGGC TTTTTTGTCC TTTTCCTACG CGGCCCAATT CCATCCGGAG CTGTTCGGAA
12601 TAGGAAACGT GTCGCGCGTC TTTGTGGATA AGCGACACCA GTTCATTTGC GCCGAGCATG
12661 ATGGACAAAA TTCAACCATA TCTGCCAGAC ACAACATCTC CGCGTCGTAT GCGGTGTATT
12721 ACCATCATCA AATAGACGGG GGCAATTGGT TTCATTTGGA ATGGCTGCGA CCATTCTTTT
12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT
12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCCT
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT
12961 CAGGAGGTCG TCCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAA

SEQ ID NO:23 Nucleotide encoding attenuated PRRSV 94881 ORF4

12761 ATGGCTGCGA CCATTCTTTT
12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT
12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCCT
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT
12961 CAGGAGGTCG TCCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAACGGC
13021 TAATGTGACC GATGAATCGT ATTTGTACAA CGCGGACTTG CTGATGCTTT CCGCGTGCCT
13081 TTTCTACGCC TCGGAAATGA GCGAGAAAGG CTTCAAAGTC ATCTTTGGGA ATATTTCTGG
13141 CGTTGTTTCC GCTTGTGTTA ATTTCACAGA TTATGTGGCC CATGTGACCC AACACACTCA
13201 GCAGCACCAT TTGGTAATTG ATCACATTCG GTTACTACAC TTCTTGACAC CGTCTACGAT
13261 GAGGTGGGCT ACAACCATTG CTTGTTTGCT TGCCATTCTT TTGGCGGTAT GA

SEQ ID NO:24 Nucleotide encoding attenuated PRRSV 94881 ORF5

13309 AT GAAATGTTCT
13321 TGCAAGTTGG GGCATTTCTT GACTCCTCAC TCTTGCTTCT GGTGGCTTTT TTTGCTGTGT
13381 ACCGGCTTGT CTTGGTCCTT TGTCGATGGC AACGACGACA GCTCGACATC CCAATACATA
13441 TATAATTTGA CGATATGCGA GCTGAATGGG ACCGAATGGT TGTCCGGTCA TTTTGATTGG
13501 GCAGTCGAAA CCTTTGTGCT TTACCCAGTT GCCACTCATA TCATTTCACT GGGTTTTCTC
13561 ACAACAAGCC ATTTCCTTGA TGCGCTCGGT CTCGGCGCTG TGTCCGCCAC AGGATTCATT
13621 GGCGAGCGGT ATGTACTTAG CAGCATGTAC GGCGTTTGCG CCTTCGCGGC GTTCGTATGT
13681 TTTGTCATCC GTGCTGCTAA AAATTGCATG GCTTGCCGCT ATGCCCGCAC CCGGTTTACC
13741 AACTTCATCG TGGACGACCG GGGAAGAATC CATCGATGGA AGTCTTCAAT AGTGGTGGAG

```
13801 AAATTGGGCA AAGCTGAAGT CGGTGGTGAC CTTGTCAACA TTAAGCATGT TGTCCTCGAA
13861 GGGGTTAAAG CTCAACCTTT GACGAGGACT TCGGCTGAGC AATGGGAAGC CTAG
```

SEQ ID NO:25 Nucleotide encoding attenuated PRRSV 94881 ORF6

```
13902  ATGGGAAGC CTAGACGACT
13921 TTTGCAACGA TCCCACCGCC GCACAAAAAC TCGTGCTGGC CTTTAGCATC ACATATACAC
13981 CCATAATGAT ATACGCCCTT AAGGTGTCAC GCGGCCGACT CCTGGGGCTG TTGCACATCT
14041 TGATATTTCT GAATTGTTCC TTTACTTTTG GGTACATGAC ATATGTGCAT TTTCAATCCA
14101 CCAACCGTGT CGCATTCACT CTGGGGGCTG TAGTCGCCCT TTTGTGGGGT GTTTACAGCC
14161 TCACAGAGTC ATGGAAGTTC ATCACTTCCA GATGCAGATT GTGTTGCCTA GGCCGGCGAT
14221 ACATTCTGGC CCCTGCCCAT CACGTAGAAA GTGCTGCAGG CCTCCATTCA ATCCCAGCGT
14281 CTGGTAACCG AGCATACGCT GTGAGAAAGC CCGGACTAAC ATCAGTGAAC GGCACTCTAG
14341 TACCTGGGCT TCGGAGCCTC GTGCTGGGCG GCAAACGAGC TGTTAAACGA GGAGTGGTTA
14401 ACCTCGTCAA GTATGGCCGG TAA
```

SEQ ID NO:26 Nucleotide encoding attenuated PRRSV 94881 ORF7

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

SEQ ID NO:27 Nucleotide encoding parental PRRSV 94881 ORF1a

```
  178        ATG
  181 TCTGGGATGT TCTCCCGGTG CATGTGCACC CCGGCTGCCC GGGTATTTTG GAACGCCGGC
  241 CAAGTCTATT GCACACGGTG TCTCAGTGCA CGGTCTCTTC TCTCTCCAGA ACTTCAGGAC
  301 ACGGACCTCG GTGCAGTTGG CTTGTTTCAC AAGCCTAAAG ACAAGCTCCA TTGGAAAGTT
  361 CCCATTGGTA TCCCCCAGGT GGAATGTTCT CCATCTGGGT GTTGCTGGCT GTCAACCATT
  421 TTTCCTTTAG CGCGCATGAC CTCCGGCAAT CACAACTTCC TTCAACGACT CGTGAAGGTT
  481 GCTGACGTAT TGTACCGTGA CGGTTGCTTA ACCCCTAGAC ACCTCCGTGA ACTCCAAGTT
  541 TACGAGCGTG GTTGCAATTG GTATCCGATT ACGGGGCCTG TGCCTGGGAT GGCTGTGTAC
  601 GCGAACTCCA TGCACGTGTC CGACCAACCG TTCCCTGGTG CCACTCATGT GTTAACAAAT
  661 TCCCCTTTGC CTCAACGGGC TTGTCGGCAG CCGTTCTGTC CGTTCGAAGA GGCCCATTCT
  721 AGCATATACA GGTGGGAAAA ATTTGTAATT TTTATGGATT CCTCCTCCGA CGGTCGATCT
  781 CGCATGATGT GGACTCCGGA ATCCGATGAC TCCACGGCTT TGGAAGTTCT GCCGCCCGAG
  841 CTAGAACACC AGGTCAAGGT CCTTGTTCGG AGCTTTCCCG CCCATCACCT TGTCGACCTT
  901 GCCGATTGGG AGCTCACTGA GTCCCCTGAG AACGGTTTTT CCTTCAGCAC GTCACATCCT
  961 TGCGGCTACC TTGTTCGGGA CCCGGCTGTA TCCGAAGGCA AGTGTTGGCT TTCCTGCTTT
 1021 TTGAGCCAGT CAGCCGAAGT GCTCAGTCGC GAGGCGCATC TGGCTACCGC CTATGGTTAC
 1081 CAAACCAAGT GGGGTGTGCC TGGCAAGTAC ATCCAGCGCA GACTTCAAGT TCACGGTCTC
 1141 CGTGCTGTGG TCGACCCTGA TGGTCCCATT CACGTTGAAG CATTGTCTTG CCCCCAGTCT
 1201 TGGATCAGGC ACTTGACCCT GAATGATGAT GTCACCCCGG GATTCGTTCG CCTAATGTCT
 1261 CTTCGCATTG TGCCGAACAC AGAGCCTACC ACACACCGGA TCTTTCGTTT TGGAGTGCAC
```

```
1321 AAGTGGTATG GTGCCGCCGG CAAACGGGCC CGTGGCAAGC GTGCCGCCAA AAGTGAGAAA
1381 GACTCGGCTT CCACCCTCAA GGTTGCCCGA CCGACTTCCA CCAGTGGAAT CGTCACCTAC
1441 TCCCCACCTG CGGACGGGTC TTGTGGTTGG CATGCCCTTG CCGCCATACT GAACCGGATG
1501 ATTAATAATG ACTTCACGTC CCCTCTGCCT CGGTACAACA GGCCGGAGGA CGATTGGGCT
1561 TCTGATGGTG ACCTTGCTCA GGCCATTCAA TGTTTGCAAC TACCTGCCGC CATAGCTCGG
1621 AACCGCGCCT GCCCTAACGC CAAATACCTC GTAAAACTCA ACGGAGTTCA TTGGGAGGTA
1681 GAGGTGAGGC CTGGAATGGC TCCTCGCTCC CTCTCTCGTG AGTGCGTTGT TGGCGTCTGC
1741 TCTGAAGGCT GTGTCGCGTC GCCTTACCCG GAGGACGGGT TGCCTAAACG TGCACTTGAG
1801 GCCCTGGCGT CTGCTTATAG ACTGCCTTCA GACTGTGTTT GTGATGGTAT TATTGACTTC
1861 CTTGCCAATC CACCTCCCCA GGAGTTCTGG ACTCTTGACA AAATGTTGAC TTCCCCGTCA
1921 CCGGAGCAGT CCGGCTTCTC TAGTCTGTAT AAATTGTTGT TAGAGGTCTT GCCGCAGAAA
1981 TGCGGATCCA CAGAAGGGGA ATTCATCTAT ACTGTTGAGA GGATGTTGAA GGATTGTCCG
2041 AGCTCCAAAC AGGCCATGGC CCTCCTTGCA AAAATTAAGG TCCCATCCTC AAAGGCCCCA
2101 TCCGTGACTC TGAACGAGTG CTTCCCCACG GATGTTCCAG TCAACTCTGA GTTAATATCT
2161 TGGGAAGAGC CCAAAGACCC TGGCGCTGCT GTTGTCCTAT GTCCATCGGA TGCAAAAGAA
2221 TCTAAGGAAA CAGCCCCTGA AGAAGCTCAA GCGAGAAACC GTAAGGTCCT CCACCCTGTG
2281 GTCCTTACCG AGGAACTTAG CGAGCAACAG GTGCAGGTGG TTGAGGGTGA TCAGGATATG
2341 CCACTGGATT TGACTTGGCC AACCTTAACC GCTACGGCGA CCCCTGTTAG AGGGCCGGTA
2401 CCGGACAATT TGAGCTCTGG CATTGGTGCC CAGCCCGCTA CCGTTCAAGA ACTCATTCTG
2461 GCGAGGCCTG CACCCCGTCT TGTTGAGCGC TGTGGCACGG AGTCGAACGG CAGCAGTTCA
2521 TTTCTGGATT TGCCTGACGT GCAGACCTCG GACCAGCCTT TAGACCTGTC CCTGGCCGCG
2581 TGGCCTGTAA GGGCTACCGC GTCTGACCCC GGTTGGATCC ACGGTAGGCG TGAGCCTGTC
2641 TTTGTGAAGC CTCGAGGTGT TTTCTCTGAT GGCGAGTCGG CCCTTCAGTT CGGAGAGCTT
2701 TCCGAAGCCA GTTCTGTCGT CGATGACCGG ACAAAAGAAG CTCCGGTGGT TGACGCCCCC
2761 ATCGATTTGA CAACTTCGAA CGAGACGCTC TCTGGGTCTG ACCCCTTTGA ATTCGCCAAA
2821 TTCAGGCGCC CGCGTTTCTC CGCGCAAGCT TTAATCGACC GAGGTGGTCC GCTTGCCGAT
2881 GTTCATGCAA AGATAAAGAG TCGGGTATAT GAACAATGCC TTCAAGCTTG TGAACCTGGT
2941 AGTCGTGCGA CCCCAGCCAC CAAGAAGTGG CTCGACAAAA TGTGGGACAG GGTGGACATG
3001 AAAACTTGGC GCTGCACCTC GCAGTTCCAA GCTGGTCACA TTCTTGAGTC CCTCAAATTC
3061 CTCCCTGACA TGATTCAAGA CACACCGCCT CCTGTTCCCA GGAAGAACCG AGCTGGTGAC
3121 AGTGCCGGCC TGAAGCAACT GGTGGCGCAG TGGGATAGGA AATTGAGTGT GACACCCCCC
3181 ACAAAACCGG TTGGACCGGT GCTTGACCAG ACCGTCCCTC TGCCTATGGA CATCCAGCAA
3241 GAAGATGCCA TCTCCGCTGA CAAGCCACCC CATTCGCAAA ACCCTTCTAG TCAAGTAGAT
3301 GTGGGTGGAG GTTGGAAAAG TTTTATGCTC TCCGGCACCC GTTTCGCGGG GTCCGTTAGT
3361 CAGCGCCTTA CGACATGGGT TTTTGAGGTT CTCTCCCATC TCCCAGCTTT TATGCTCACA
3421 CTTTTCTCGC CACGGGGCTC TATGGCTCCA GGTGATTGGC TGTTTGCAGG TGCTGTTCTA
3481 CTTGCTCTCC TGCTCTGCCG TTCTTACCCA ATACTCGGAT GCCTTCCCTT ATTGGGTGTC
3541 TTTTCTGGTT CTGTGCGGTG TGTTCGTTTG GGTGTTTTTG GTTCTTGGAT GGCTTTTGCT
3601 GTATTTTTAT TCTCGACTCC ACCCGACCCA GTCGGTTCTT CTTGTGACCA CGATTCGCCG
3661 GAGTGTCATG CTGAGCTTTT GGCTCTTGAG CAGCGCCAAC TTTGGGAACC TGTGCGCAGC
3721 CTTGTGGTCG GGCCATCGGG CCTCTTATGC GTCATTCTTG GCAAGTTACT CGGTGGGTCA
3781 CGTTGTCTCT GGTTTGTTCT CCTACGTATA TGCATGCTCG CAGATTTGGC AATTTCTCTT
3841 ATTTATGTGG TGTCCCAAGG GCGTTGTCAC AAGTGTTGGG GAAAGTGTAT AAGGACGGCT
3901 CCTGCAGAAG TGACCCTTAA TGTGTTTCCT TTTTCGCGCG CCACCCGCTC ATCTCTTGTG
3961 TCCTTGTGTG ATCGGTTCCA AGCGCCAAAA GGAGTTGACC CCGTGCACTT GGCGACAGGC
4021 TGGCGCGGGT GCTGGTGTGG TGAGAGCCCT ATTCATCAAT CACACCAAAA ACCGATAGCT
4081 TATGCCAACT TGGATGAAAA GAAGATATCC GCCCAGACGG TGATTGCTGT CCCGTATGAT
4141 CCCAGTCAGG CCATTAAATG CCTGAAAGTT TTGCAGGCAG GAGGGGCTAT TGTGGACCAG
4201 CCTACGCCCG AGGTCGTCCG TGTGTCTGAG ATTCCCTTCT CGGCCCCATT TTTTCCGAAG
4261 GTCCCAGTCA ACCCAGATTG CAGGGTTGTG GTAGATTCGG ACACTTTTGT GGCTGCGGTC
4321 CGCTGCGGTT ATTCGACAGC ACAACTGGTC CTTGGTCGGG GCAACTTTGC CAAGCTAAAT
4381 CAGACCCCCC TCAGGAACTC TGTCCCCACC AAAACAACTG GTGGGGCCTC ATACACCCTT
```

```
4441 GCCGTGGCCC AGGTATCTGT GTGGACTCTT GTTCATTTCA TCCTCGGCCT TTGGTTAACG
4501 TCACCTCAAG TGTGTGGTCG AGGGACCTCT GACCCGTGGT GTTCGAACCC TTTTTCGTAT
4561 CCTACTTATG GCCCCGGAGT TGTGTGTTCC TCTCGACTCT GCGTGTCTGC CGACGGAGTT
4621 ACCCTGCCAT TGTTCTCAGC CGTTGCCCAT CTTTCCGGTA GAGAGGTGGG GATTTTTATT
4681 TTGGTGCTTG CCTCCTTGGG CGCTTTAGCC CACCGCTTGG CTCTTAAGGC AGACATGTCA
4741 ATGGTCTTTT TGGCGTTTTG TGCTTACGCC TGGCCCATGA GCTCCTGGTT AATTTGCTTC
4801 TTTCCTATGC TCTTGAGGTG GGTAACCCTT CATCCTCTCA CTATGCTTTG GGTGCACTCA
4861 TTTTTGGTGT TTTGCCTACC AGCTGCCGGC GTTCTCTCGC TGGGAATAAC CGGTCTTCTT
4921 TGGGCAGTTG GCCGTTTCAC CCAGGTTGCC GGAATTATCA CACCTTATGA CATCCACCAG
4981 TATACCTCCG GACCACGTGG TGCAGCTGCT GTAGCAACGG CTCCAGAAGG TACTTACATG
5041 GCGGCCGTTC GGAGAGCCGC TTTGACTGGA CGGACTTTGA TCTTCACACC ATCTGCAGTC
5101 GGATCCCTTC TTGAAGGTGC TTTCAGAACT CAAAAGCCCT GCCTTAACAC CGTGAATGTC
5161 GTAGGCTCTT CCCTTGGTTC TGGAGGAGTT TTCACCATTG ATGGCAGAAG AGTCATCGTC
5221 ACTGCCACCC ATGTGTTGAA TGGTAACACA GCCAGGGTCA CTGGTGATTC CTACAACCGC
5281 ATGCACACGT TCAATACTAA TGGTGATTAT GCCTGGTCCC ATGCTGATGA CTGGCAAGGC
5341 GTTGCCCCTA TGGTTAAGAT CGCTAAGGGG TATCGCGGTC GTGCCTACTG GCAAACGTCA
5401 ACCGGAGTCG AACCTGGCAT CATGGGGGAA GGATTCGCCT TCTGTTTCAC TAACTGTGGC
5461 GACTCAGGGT CACCTGTCAT TTCAGAAGCT GGTGACCTTA TTGGAGTCCA TACCGGTTCA
5521 AACAAACTCG GTTCTGGTCT TGTGACAACC CCTGAAGGGG AGACCTGCTC CATCAAGGAA
5581 ACTAGGCTCT CTGACCTTTC TAGACATTTT GCAGGTCCAA GCGTCCCTCT TGGGGACATT
5641 AAGTTGAGCC CAGCCATCAT CCCTGATGTG ACAACTATTC CGAGTGACTT GGCATCGCTC
5701 CTTGCTTCTG TCCCCGTGAT GGAAGGTGGC CTCTCAACTG TCCAGCTTTT GTGCGTCTTT
5761 TTCCTTCTCT GGCGCATGAT GGGCCATGCC TGGACACCCA TTGTTGCCGT AGGCTTCTTT
5821 TTGCTGAATG AAATTCTCCC AGCAGTCTTG GTCCGAGCTG TGTTCTCTTT TGCACTCTTT
5881 GTACTTGCAT GGGCCACCCC CTGGTCGGCA CAAGTGTTGA TGATTAGACT CCTCACGGCG
5941 GCTCTCAACC GCAACAGGTT GTCCCTGGCG TTCTACGCAC TCGGAGGTGT CGTTGGCCTG
6001 GCCACAGAAA TCGGGACTTT TGCTGGTGGA TGGCCTGAAC TGTCCCAAGC CCTCTCGACA
6061 TACTGCTTCC TGCCCAGGTT CCTTGCTGTG ACTAGTTATG TCCCCACCAT CATCATCGGT
6121 GGGCTCCATG CCCTCGGCGT AATTTTGTGG TTATTCAAAT ACCGATGCCT CCACAACATG
6181 CTGGTTGGTG ATGGGAGTTT CTCAAGCGCT TTCTTCCTAC GGTATTTTGC TGAGGGTAAT
6241 CTTAGGAAAG GCGTGTCGCA GTCCTGTGGC ATGAATAACG AATCCCTGAC AGCTGCTTTG
6301 GCTTGCAAGT TGTCGCAAGC TGACCTTGAT TTTTTGTCCA GTTTAACGAA CTTCAAGTGC
6361 TTTGTGTCCG CTTCAAACAT GAAAAATGCA GCTGGCCAAT ACATCGAGGC GGCGTATGCT
6421 AGAGCTCTGC GTCAGGAGCT GGCCTCCTTG GTTCAGGTTG ACAAGATGAA AGGAGTATTG
6481 GCCAAGCTCG AGGCTTTCGC TGAGACGGCC ACTCCGTCAC TTGACACAGG TGACGTGATT
6541 GTTCTGCTTG GGCAACACCC CCATGGATCC ATCCTCGACA TTAATGTGGG GGGTGAAAGG
6601 AAAACTGTGT CTGTGCAAGA AACACGATGC CTGGGTGGTT CCAAATTCAG TGTCTGCACT
6661 GTCGTGTCCA ACACGCCCGT GGATACCTTG ACCGGCATCC CACTTCAGAC GCCAACCCCA
6721 CTTTTTGAAA ATGGCCCGCG CCATCGCAGC GAGGACGACG ACCTTAAAGT TGAGAGAATG
6781 AAAAAACACT GTGTATCCCT CGGCTTCCAC AAAATCAATG GTAAAGTTTA CTGCAAAATT
6841 TGGGACAAGT CTAACGGCGA CACCTTTTAC ACGGATGATT CCCGATACAC TCAAGACCAT
6901 GCTTTTCAGG ACAGGTCAAC CGACTATAGA GACAGGGATT ATGAAGGTGT ACAGACCGCC
6961 CCCCAACAGG GATTCGATCC AAAGTCCGAA GCCCCTGTTG GCACTGTTGT AATCGGTGGC
7021 ATTACGTATA ACAGGCATCT GGTCAAAGGT AAGGAGGTCC TAGTTCCCAA ACCTGACAAC
7081 TGCCTTGAAG CTGCCAGACT GTCCCTTGAG CAAGCTCTTG CTGGGATGGG CCAAACTTGT
7141 GACCTTACAG CTACCGAAGT GGAGAAACTA AAGCGCATCA TTAGTCAACT CCAAGGTCTG
7201 ACCACTGAAC AGGCTTTAAA CTGCTAGCCG CCAGCGGCTT GACCCGCTGT GGCCGCGGCG
```

SEQ ID NO:28 Nucleotide encoding parental PRRSV 94881 ORF1b

```
 7209          AC AGGCTTTAAA CTGCTAGCCG CCAGCGGCTT GACCCGCTGT GGCCGCGGCG
 7261 GCCTAGTTGT AACTGAAACG GCGGTAAAAA TCGTAAAATA CCACAGCAGA ACTTTCACCT
 7321 TAGGCTCTTT AGACCTAAAA GTCACCTCCG AGGTGGAGGT GAAGAAATCA ACTGAGCAGG
 7381 GGCACGCTGT CGTGGCGAAC TTATGTTCCG GTGTCGTCTT GATGAGGCCT CACCCACCGT
 7441 CCCTTGTTGA CGTTCTCCTC AAACCCGGAC TTGACACAAC ACCCGGCATT CAACCAGGGC
 7501 ATGGGGCCGG GAATATGGGC GTGAACGGTT CTATTTGGGA TTTTGAAACT GCACCCACAA
 7561 AGGTAGAACT AGAGTTGTCC AAGCAAATAA TCCAAGCATG TGAAGTCAGG CGCGGGGACG
 7621 CCCCTAACCT CCAACTCCCC TACAAGCTTT ATCCTGTCAG GGGGGACCCC GAGCGGCGTA
 7681 AAGGTCGCCT TGTCAACACT AGGTTTGGAG ATTTACCTTA CAAAACTCCC CAAGACACCA
 7741 AGTCCGCAAT TCATGCGGCT TGTTGCCTGC ATCCCAATGG GGTCCTCGTG TCTGATGGTA
 7801 AATCCACGCT GGGTACCACT CTTCAACATG GTTTCGAGCT TTATGTCCCC ACTGTACCTT
 7861 ATAGTGTCAT GGAATACCTT GATTCACGCC CTGACACCCC TTTTATGTGT ACTAAACATG
 7921 GCACTTCCAA GGCTGCTGCA GAGGACCTCC AAAAATATGA CCTATCCACT CAAGGGTTTG
 7981 TCTTGCCTGG GGTCCTACGC CTAGTGCGCA GGTTCATCTT TAGCCATGTT GGTAAGGCGC
 8041 CACCACTGTT CCTTCCATCA ACCTACCCTG CCAAGAACTC CATGGCAGGG GTCAATGGCC
 8101 AGAGGTTCCC AACAAAGGAT GTCCAGAGCA TACCTGAAAT TGATGAAATG TGCGCCCGTG
 8161 CCGTCAAGGA AAATTGGCAG ACTGTGACAC CTTGCACCCT CAAAAAACAG TACTGTTCCA
 8221 AACCTAAAAC TAGAACCATC CTAGGTACCA ACAACTTCAT AGCCTTGGCT CACAGGTCAG
 8281 CACTCAGTGG TGTCACCCAG GCGTTCATGA AGAAGGCCTG GAAGTCCCCA ATTGCCTTGG
 8341 GGAAAAACAA GTTTAAGGAA TTGCATTGCA CTGTCGCCGG CAGATGCCTT GAGGCTGACC
 8401 TGGCTTCCTG CGATCGCAGC ACCCCCGCCA TTGTGAGGTG GTTTGTTGCC AACCTCCTGT
 8461 ATGAACTTGC AGGATGTGAA GAGTACTTGC CTAGCTACGT GCTCAACTGT TGCCATGACC
 8521 TTGTGGCAAC GCAGGATGGC GCTTTCACAA AACGCGGTGG CCTGTCGTCC GGGGACCCCG
 8581 TCACCAGTGT GTCCAACACC GTCTACTCAC TGATAATTTA CGCCCAGCAC ATGGTGCTTT
 8641 CGGCCTTGAA GATGGGTCAT GAAATTGGTC TCAAGTTCCT TGAGGAACAG CTCAAATTTG
 8701 AGGACCTTCT TGAAATCCAG CCCATGTTAG TGTATTCTGA TGACCTCGTC TTGTATGCGG
 8761 AAAGACCCAC TTTTCCCAAC TACCATTGGT GGGTCGAGCA TCTTGACCTG ATGTTGGGCT
 8821 TTAAAACGGA CCCAAAGAAA ACTGTCATAA CTGATAAACC CAGTTTTCTC GGCTGCAGAA
 8881 TTGAAGCAGG ACGGCAGTTA GTCCCCAATC GCGACCGTAT TCTGGCTGCT CTTGCATATC
 8941 ATATGAAGGC GCAGAACGCC TCAGAGTATT ATGCGTCCGC TGCCGCAATT CTGATGGATT
 9001 CGTGTGCTTG CATTGACCAT GACCCCGAGT GGTATGAGGA CCTTATCTGC GGCATCGCCC
 9061 GGTGTGCTCG CCAGGACGGT TACCGTTTTC CAGGCCCGGC ATTTTTCATG TCCATGTGGG
 9121 AGAAGCTGAA AAGTCATAAC GAAGGGAAGA AATGCCGTCA CTGCGGCATC TGCGACGCCA
 9181 AAGCCGACTA TGCGTCCGCC TGTGGACTTG ATTTGTGTTT GTTCCATTCA CACTTTCATC
 9241 AACACTGCCC AGTCACTCTG AGCTGTGGCC ACCATGCCGG TTCAAAGGAA TGTTCGCAGT
 9301 GTCAGTCACC TGTCGGGGCT GGCAAATCCC CCCTTGACGC TGTGCTGAAA CAAATCCCGT
 9361 ACAAACCTCC TCGTACCATT ATCATGAAGG TGGACAACAA AACAACGACC CTTGACCCGG
 9421 GAAGATATCA GTCCCGTCGA GGTCTTGTTG CAGTCAAAAG AGGTATTGCA GGTAATGAGG
 9481 TTGATCTTTC TGATGGAGAC TACCAAGTGG TGCCTCTTTT GCCGACTTGC AAAGACATAA
 9541 ACATGGTGAA GGTGGCTTGC AACGTACTAC TCAGCAAGTT TATAGTAGGG CCGCCAGGTT
 9601 CCGGAAAAAC CACCTGGCTA CTGAACCAAG TCCAGGACGA TGATGTCATT TACACACCTA
 9661 CTCATCAGAC AATGTTTGAC ATAGTCAGTG CTCTTAAAGT TTGCAGGTAT TCCATCCCAG
 9721 GAGCCTCAGG ACTCCCTTTT CCACCACCTG CCAGGTCCGG GCCGTGGGTT AGGCTCATCG
 9781 CCAGCGGACA TGTCCCTGGC CGAGTGTCAT ATCTCGATGA GGCAGGATAT TGCAATCATC
 9841 TAGACATTCT AAGGCTGCTT TCCAAAACAC CCCTTGTGTG TTTGGGTGAC CTTCAGCAAC
 9901 TTCACCCGGT CGGCTTTGAT TCCTATTGTT ATGTGTTCGA TCAGATGCCT CAGAAGCAGC
 9961 TGACCACCAT TTATAGATTT GGCCCTAACA TCTGTGCAGC CATCCAGCCT TGTTACAGGG
10021 AGAAACTTGA ATCCAAGGCC AGGAACACCA GAGTGGTTTT CACCACCCGG CCTGTGGCCT
10081 TTGGTCAGGT CCTGACACCG TACCACAAAG ATCGTACCGG CTCTGCAATA ACTATAGATT
10141 CATCCCAGGG GGCGACCTTC GACATTGTGA CATTGCATCT ACCATCGCCA AAGTCCCTAA
10201 ACAAATCCCG AGCACTTGTA GCCATCACTC GGGCAAGACA TGGGTTGTTC ATTTATGACC
10261 CTCATGACCA ACTCCAGGAG TTTTTCAACT TAACCCCCGA GCGCACTGAT TGTAACCTTG
```

```
10321 CGTTCAGCCG TGGGGATGAG CTGGTTGTTT TGAATGTGGA TAATGCGGTC ACAACTGTAG
10381 CGAAGGCCCT AGAGACAGGT TCACCCCGAT TTCGAGTATC GGACCCGAGG TGCAAGTCTC
10441 TCTTAGCCGC TTGTTCGGCC AGTCTAGAAG GGAGCTGCAT GCCACTACCA CAAGTAGCAC
10501 ATAACCTGGG GTTTTACTTT TCCCCGGACA GCCCAGCTTT TGCACCCCTG CCAAAAGAGC
10561 TGGCGCCACA TTGGCCAGTG GTCACCCACC AGAATAATCG AGCGTGGCCT GATCGACTTG
10621 TCGCTAGTAT GCGCCCAATT GATGCCCGCT ACAGCAAGCC AATGGTCGGT GCAGGGTATG
10681 TGGTCGGGCC ATCCATTTTT CTTGGCACTC CTGGTGTGGT GTCATACTAT CTCACATTAT
10741 ACATCGGGGG CGAGCCTCAG GCCCTGCCAG AAACACTCGT TTCAACAGGA CGTATAGCCA
10801 CAGATTGTCG GGAATATCTC GACGCGGCTG AGGAAGAGGC AGCGAGAGAA CTTCCCCACG
10861 CATTTATTGG CGATGTCAAA GGCACTACGG TCGGGGGGTG TCACCACATT ACATCGAAAT
10921 ACCTACCTAG GTCCCTGCCT AAAGACTCTG TTGCTGTGGT TGGGGTGAGT TCGCCCGGTA
10981 GGGCTGCTAA AGCCGTGTGC ACTCTCACCG ATGTGTACCT CCCCGAACTC CGACCATATT
11041 TGCAACCGGA GACGGCATCA AAATGCTGGA AACTTAAACT GGATTTCAGG GATGTTCGAC
11101 TGATGGTCTG GAAAGGCGCC ACAGCCTATT TCCAGTTGGA AGGGCTGACA TGGTCAGCGC
11161 TGCCCGATTA TGCTAGGTTC ATTCAGCTAC CCAAGGATGC CGTTGTGTAC ATCGATCCGT
11221 GTATAGGGCC GGCAACAGCC AATCGCAAGG TTGTGCGAAC CACAGACTGG CGGGCCGACC
11281 TGGCAGTGAC ACCGTATGAT TACGGTGCTC AGGTCATTTT GACAACAGCC TGGTTCGAGG
11341 ACCTTGGGCC GCAGTGGAAG ATTTTGGGGT TGCAGCCTTT CAGACGAACA TTTGGCTTTG
11401 AGAACACTGA AGATTGGGCA ATTCTCGCAC GCCGTATGAA TGACGGCAAA GATTACACTG
11461 ACTATAATTG GCATTGTGTA CGAGAACGCC CACACGCAAT TTACGGGCGC GCCCGTGACC
11521 ATACGTATCA TTTTGCCCTT GGCACTGAAC TGCAAGTAGA GCTGGGCAGA CCCCGGCTGC
11581 CTCCTGAGCA AGTGCCGTGA
```

SEQ ID NO:29 Nucleotide encoding parental PRRSV 94881 ORF2

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

SEQ ID NO:30 Nucleotide encoding parental PRRSV 94881 ORF3

```
12219         AT GGCTTATCAG CGTGCACGCT
12241 TCCATCTTCT CCTCTGTGGC TTCGTCTGTT ACCTTGTTCA CAGTGCTTTG GCTTCGAATT
12301 CCAGCTCTAC GCTATGTTTT TGGTTTCCAT TGGCCCACGG CAACACATCA TTCGAACTAA
12361 CTATCAATTA CACTATATGT AAGCCATGCC CTACCAGTCA AGCTGCCCAA CAAAGACTCG
12421 AGCCTGGCCG TAACGTGTGG TGCAAAATAG GGCACGACAG GTGTGAGGAA CGTGACCATG
12481 ATGAGTTGTC AATGTCCATT CCGTCCGGGT ACGACAACCT CAAACTTGAG GGTTATTATG
12541 CTTGGCTGGC TTTTTTGTCC TTTTCCTACG CGGCCCAATT CCATCCGGAG CTGTTCGGAA
```

```
12601 TAGGAAACGT GTCGCGCGTC TTTGTGGATA AGCGACACCA GTTCATTTGC GCCGAGCATG
12661 ATGGACAAAA TTCAACCATA TCTGCCAGAC ACAACATCTC CGCGTCGTAT GCGGTGTATT
12721 ACCATCATCA AATAGACGGG GGCAATTGGT TTCATTTGGA ATGGCTGCGA CCATTCTTTT
12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT
12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCCT
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT
12961 CAGGAGGTCG TCCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAA
```

SEQ ID NO:31 Nucleotide encoding parental PRRSV 94881 ORF4

```
12761 ATGGCTGCGA CCATTCTTTT
12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT
12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCCT
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT
12961 CAGGAGGTCG TCCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAACGGC
13021 TAATGTGACC GATGAATCGT ATTTGTACAA CGCGGACTTG CTGATGCTTT CCGCGTGCCT
13081 TTTCTACGCC TCGGAAATGA GCGAGAAAGG CTTCAAAGTC ATCTTTGGGA ATATTTCTGG
13141 CGTTGTTTCC GCTTGTGTTA ATTTCACAGA TTATGTGGCC CATGTGACCC AACACACTCA
13201 GCAGCACCAT TTGGTAATTG ATCACATTCG GTTACTACAC TTCTTGACAC CGTCTACGAT
13261 GAGGTGGGCT ACAACCATTG CTTGTTTGTT TGCCATTCTT TTGGCGGTAT GA
```

SEQ ID NO:32 Nucleotide encoding parental PRRSV 94881 ORF5

```
13309 AT GAAATGTTCT
13321 TGCAAGTTGG GGCATTTCTT GACTCCTCAC TCTTGCTTCT GGTGGCTTTT TTTGCTGTGT
13381 ACCGGCTTGT CTTGGTCCTT TGTCGATGGC AACGACAACA GCTCGACATC CCAATACATA
13441 TATAATTTGA CGATATGCGA GCTGAATGGG ACCGAATGGT TGTCCGGTCA TTTTGATTGG
13501 GCAGTCGAAA CCTTTGTGCT TTACCCAGTT GCCACTCATA TCATTTCACT GGGTTTTCTC
13561 ACAACAAGCC ATTTCCTTGA TGCGCTCGGT CTCGGCGCTG TGTCCGCCAC AGGATTCATT
13621 GGCGAGCGGT ATGTACTTAG CAGCATGTAC GGCGTTTGCG CCTTCGCGGC GCTCGTATGT
13681 TTTGTCATCC GTGCTGCTAA AAATTGCATG GCTTGCCGCT ATGCCCGCAC CCGGTTTACC
13741 AACTTCATCG TGGACGACCG GGGAAGAATC CATCGATGGA AGTCTTCAAT AGTGGTGGAG
13801 AAATTGGGCA AAGCTGAAGT CGGTGGTGAC CTTGTCAACA TTAAGCATGT TGTCCTCGAA
13861 GGGGTTAAAG CTCAACCCTT GACGAGGACT TCGGCTGAGC AATGGGAAGC CTAG
```

SEQ ID NO:33 Nucleotide encoding parental PRRSV 94881 ORF6

```
13902  ATGGGAAGC CTAGACGACT
13921 TTTGCAACGA TCCCACCGCC GCACAAAAAC TCGTGCTGGC CTTTAGCATC ACATATACAC
13981 CCATAATGAT ATACGCCCTT AAGGTGTCAC GCGGCCGACT CCTGGGGCTG TTGCACATCT
14041 TGATATTTCT GAATTGTTCC TTTACTTTTG GGTACATGAC ATATGTGCAT TTTCAATCCA
14101 CCAACCGTGT CGCACTCACT CTGGGGGCTG TAGTCGCCCT TTTGTGGGGT GTTTACAGCC
14161 TCACAGAGTC ATGGAAGTTC ATCACTTCCA GATGCAGATT GTGTTGCCTA GGCCGGCGAT
14221 ACATTCTGGC CCCTGCCCAT CACGTAGAAA GTGCTGCAGG CCTCCATTCA ATCCCAGCGT
14281 CTGGTAACCG AGCATACGCT GTGAGAAAGC CCGGACTAAC ATCAGTGAAC GGCACTCTAG
14341 TACCTGGGCT TCGGAGCCTC GTGCTGGGCG GCAAACGAGC TGTTAAACGA GGAGTGGTTA
14401 ACCTCGTCAA GTATGGCCGG TAA
```

SEQ ID NO:34 Nucleotide encoding parental PRRSV 94881 ORF7

```
14413   ATGGCCGG TAAGAACCAG AGCCAGAAGA AAAGAAGAAA TGCAGCTCCG
14461 ATGGGGAAAG GCCAGCCAGT CAATCAACTG TGCCAGTTGC TGGGTACAAT GATAAAGTCC
14521 CAGCGCCAGC AATCTAGGGG AGGACAGGCC AAAAAGAAGA AGCCTGAGAA GCCACATTTT
14581 CCCCTAGCTG CTGAAGATGA CATTCGGCAC CATCTCACCC AGGCCGAACG TTCCCTCTGC
14641 TTGCAATCGA TCCAGACGGC TTTCAATCAA GGCGCAGGAA CTGCGTCGCT TTCATCCAGC
14701 GGGAAGGTCA GTTTCCAGGT TGAGTTCATG CTGCCGGTTG CTCATACAGT GCGCCTGATT
14761 CGCGTGACTT CTACATCCGC CAGTCAGGGT GCAAATTAA
```

CLAIMS

1. A Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) of a European type, which is of the strain deposited with European Collection of Cell Cultures (ECACC) under the Accession Numbers ECACC 11012501 or Accession Numbers ECACC 11012502.

2. The PRRSV of claim 1, wherein said virus is attenuated by passaging at least 36 times in cell culture such that when the modified virus is administered to a swine or other mammal prone to PRRSV, it fails to cause clinical signs of PRRSV disease but is capable of inducing an immune response that immunizes the mammal against pathogenic forms of PRRSV.

3. A method for the preparation of the live attenuated PRRSV according to claim 1, comprising adapting an MA 104-grown PRRSV of a European type to non-MA 104 mammalian cells.

4. A vaccine for the protection of pigs against PRRSV infection, comprising the live attenuated PRRSV according to claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

5. The vaccine according to claim 4, which further comprises one or more non-PRRSV attenuated or inactivated pathogens or antigenic material thereof.

6. The vaccine according to claim 5, wherein said non-PRRSV pathogens are selected from Pseudorabies virus, Porcine influenza virus, Porcine parvovirus, Transmissible gastroenteritis virus, Escherichia coli, Erysipelo rhusiopathiae, Bordetella bronchiseptica, Salmonella cholerasuis, Haemophilus parasuis, Pasteurella multocida, Streptococcus suis, Mycoplasma hyopneumoniae and Actinobacillus pleuropneumoniae.

7. The vaccine according to claim 4 which further comprises one or more additional European PRRSV strains selected from the group consisting of a PRRSV strain deposited under the Accession Numbers Lelystad virus strain (Lelystad Agent (CDI-NL-2.91), or other strains such as those deposited under the Accession Numbers ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, CNCM Accession No. I-1140, CNCM Accession No I-1387, CNCM Accession No I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474, and VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, or ECACC V93070108 or a U.S. strain such as North American PRRS virus, pT7P129A; ATCC deposit VR-2332, ATCC deposit VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474, and ATCC VR 2402.

8. The vaccine according to claim 4, which comprises a carrier that is suitable for intradermal or intramuscular application.

9. The vaccine according to claim 4, which is in freeze-dried form.

10. The vaccine of claim 4 wherein said vaccine comprises at least about 107 virus particles.

11. A method for the preparation of a live attenuated vaccine for combating PRRS, comprising admixing a live attenuated PRRSV according to claim 1 with a pharmaceutically acceptable carrier.

12. The method according to claim 11, wherein the live attenuated PRRSV further comprises one or more additional European PRRSV strains selected from the group consisting of a PRRSV strain deposited under the Accession Numbers ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, CNCM Accession No. I-1140, CNCM Accession No I-1387, and CNCM Accession No I-1388.

13. The method according to claim 11, wherein the live attenuated PRRSV further comprises an adjuvant.

14. A method of immunizing swine against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), said method comprising the step of administering to swine a vaccine composition including a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus mixed with a pharmacologically compatible carrier agent, said virus comprising PRRS 94881 virus passaged at least 36 times in cell culture to modify the virus such that when the modified virus is administered to a swine or other mammal prone to PRRS, it fails to cause clinical signs of PRRS disease but is capable of inducing an immune response that immunizes the mammal against pathogenic forms of PRRS.

15. The method of claim 14, wherein said swine presents no lung lesions after vaccination.

16. The method of claim 14, wherein said swine presents fewer lung lesions after vaccination as compared to vaccination with Porcilis vaccine.

17. A PRRS virus having a nucleotide sequence that is at least 95% homologous with the sequence set forth in either SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:10.

18. A PRRS virus that comprises at least one ORF that encodes a protein that is at least 98% identical to any of the sequences set forth in SEQ ID NO: 2 to 9 or SEQ ID NO:11 to SEQ ID NO:18.

19. A PRRS virus that has a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:10 or a fragment of either SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 wherein said fragment encodes an ORF selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8,

SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, and SEQ ID NO:18.

20. A subunit vaccine for vaccination of a porcine animal wherein said vaccine comprises one or more nucleotides selected from the group consisting of a nucleotide that encodes an ORF selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, and SEQ ID NO:18.

21. A subunit vaccine for vaccination of a porcine animal wherein said vaccine comprises one or more nucleotides selected from the group consisting of SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:30; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:33; and SEQ ID NO:34.

22. A composition comprising one or more proteins selected from the group consisting of a protein having the sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, and SEQ ID NO:18.

23. An isolated nucleic acid comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:30; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:33; and SEQ ID NO:34.

24. A recombinant expression vector comprising a nucleic acid sequence that encodes one or more PRRSV ORFs selected from the group consisting of SEQ

ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, and SEQ ID NO:18 operably linked to a promoter.

25. The recombinant expression vector of claim 24 wherein said nucleic acid encoding said ORFs is selected from the group consisting of SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:30; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:33; and SEQ ID NO:34.

26. A vaccine comprising a recombinant expression vector of any of claims 24 or 25.

FIG 1A

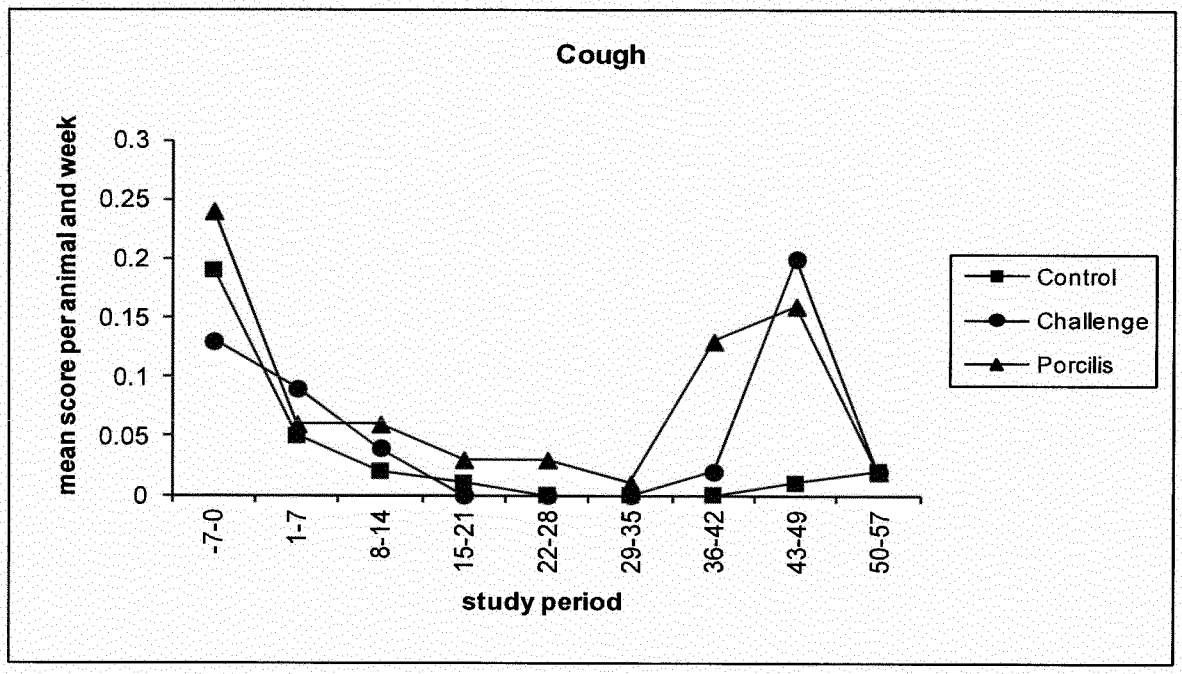

Cough
mean score per animal and week
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
-7-0
1-7
8-14
15-21
22-28
29-35
36-42
43-49
50-57
study period
Control
Challenge
Porcilis

FIG 1B

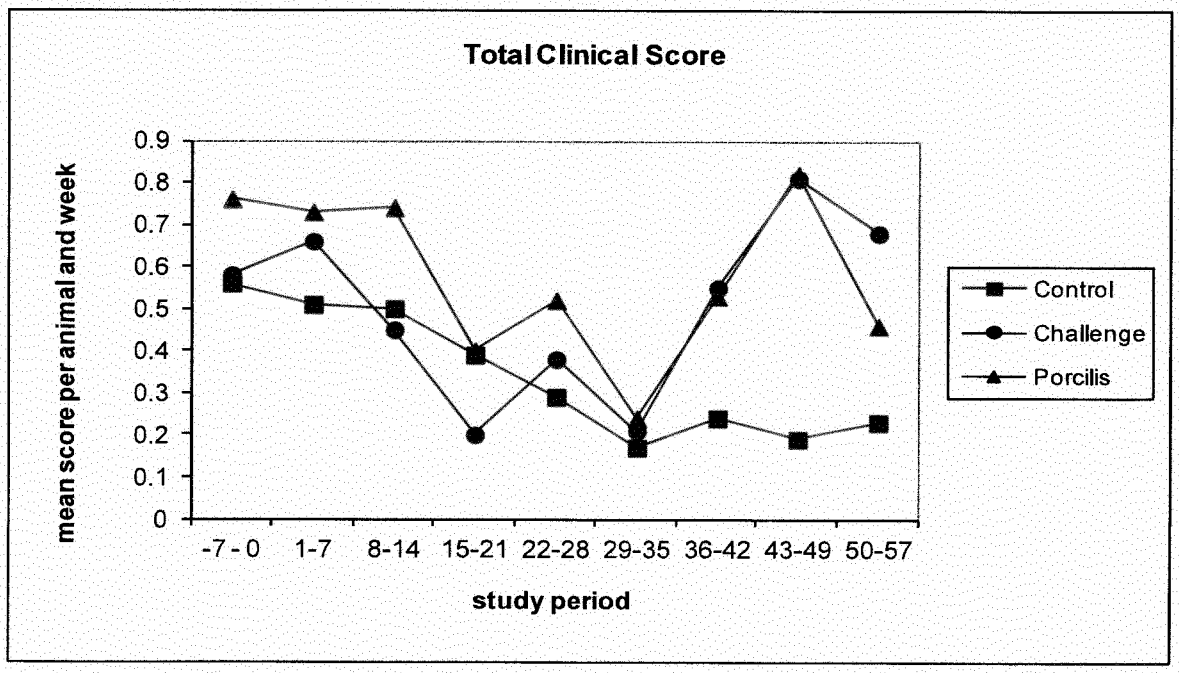

Total Clinical Score
mean score per animal and week
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-7 - 0
1-7
8-14
15-21
22-28
29-35
36-42
43-49
50-57
study period
Control
Challenge
Porcilis

FIG 2

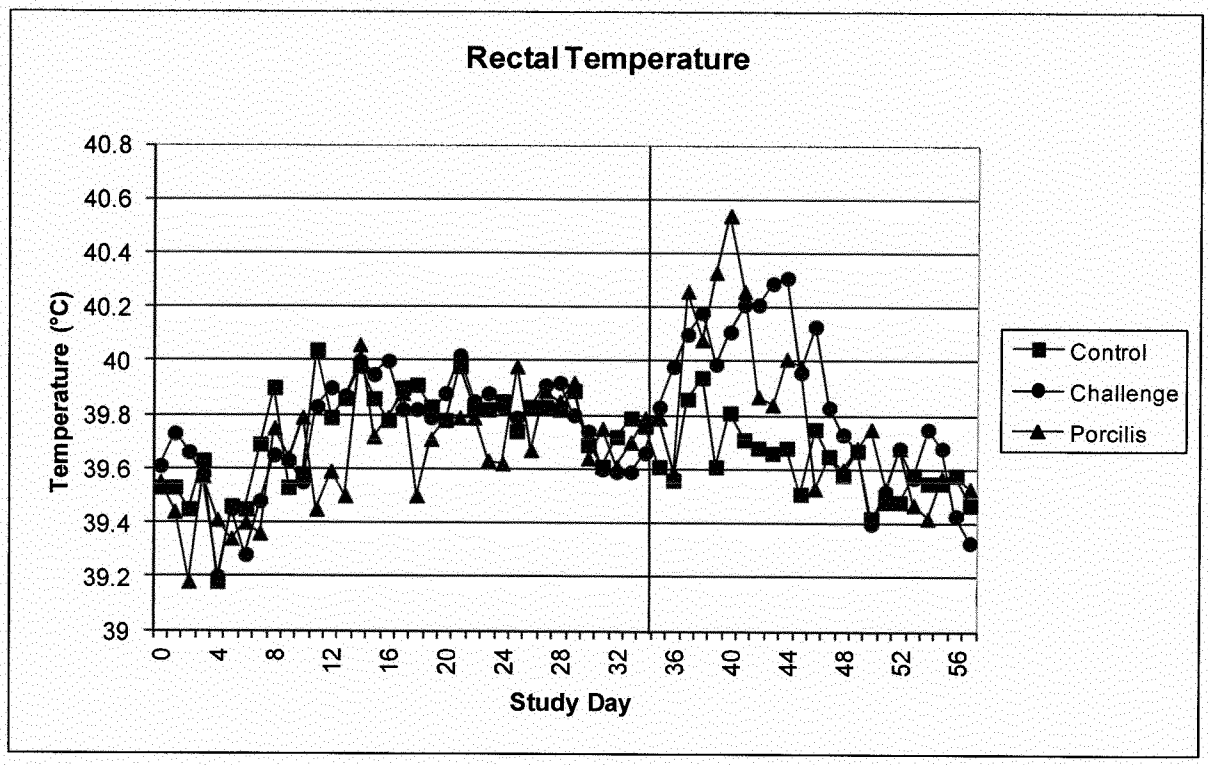

Rectal Temperature
Temperature (°C)
40.8
40.6
40.4
40.2
40
39.8
39.6
39.4
39.2
39
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
Study Day
Control
Challenge
Porcilis

FIG 3

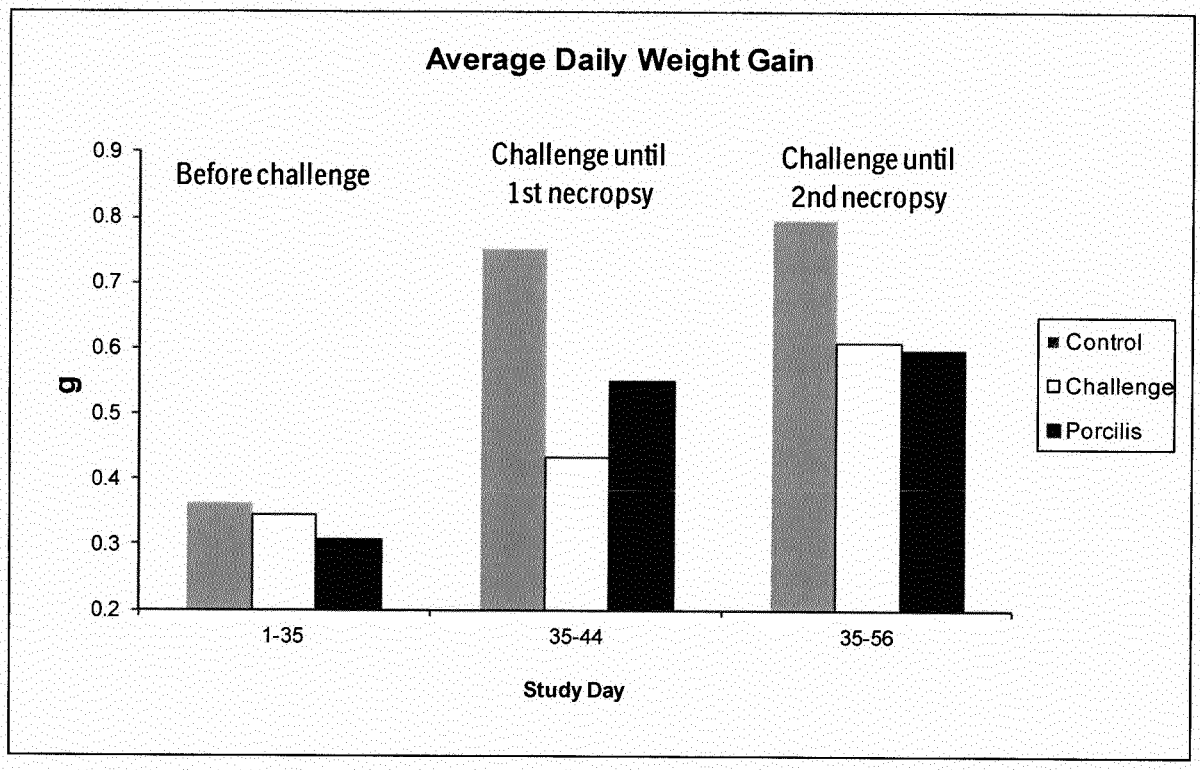

Average Daily Weight Gain
Before challenge
Challenge until 1st necropsy
Challenge until 2nd necropsy
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
g
1-35
35-44
35-56
Study Day
Control
Challenge
Porcilis

FIG 4

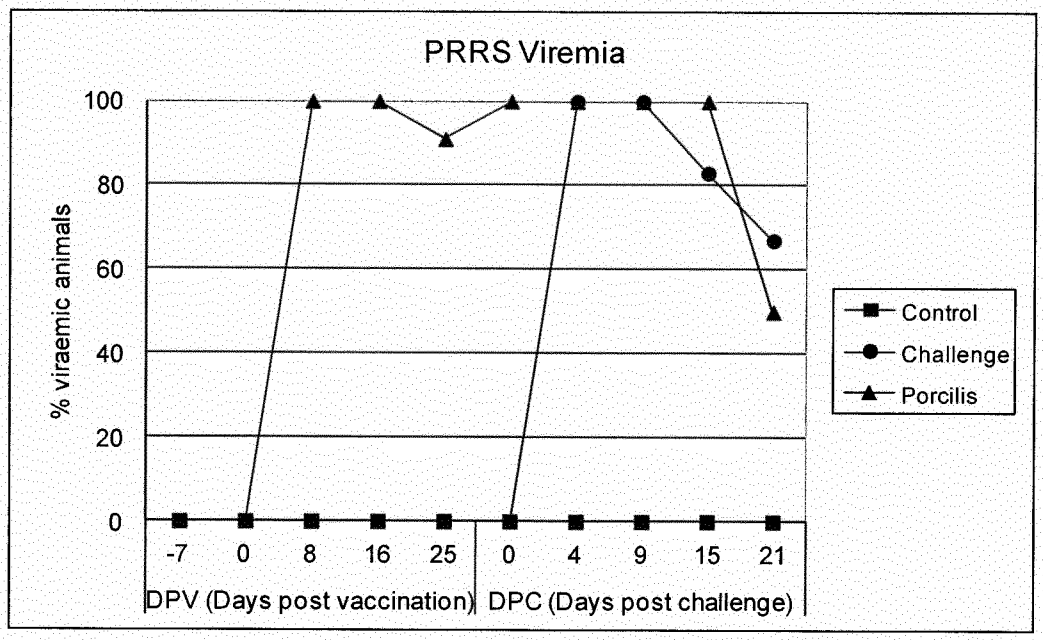

PRRS Viremia
% viraemic animals
100
80
60
40
20
0
-7
0
8
16
25
0
4
9
15
21
DPV (Days post vaccination)
DPC (Days post challenge)
Control
Challenge
Porcilis

FIG 5

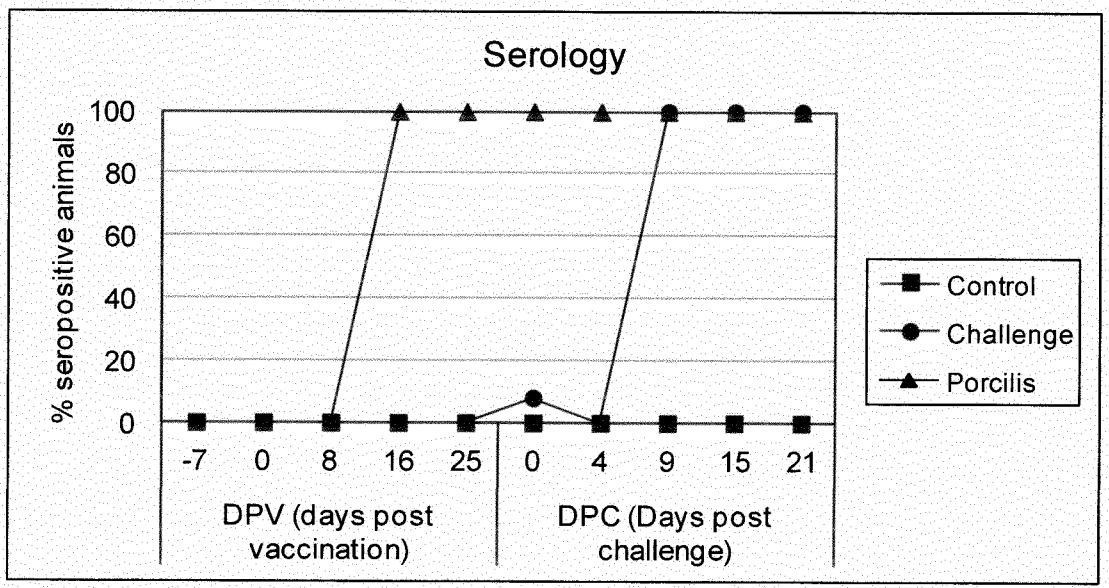

Serology
% seropositive animals
100
80
60
40
20
0
-7
0
8
16
25
0
4
9
15
21
DPV (days post vaccination)
DPC (Days post challenge)
Control
Challenge
Porcilis

FIG 6

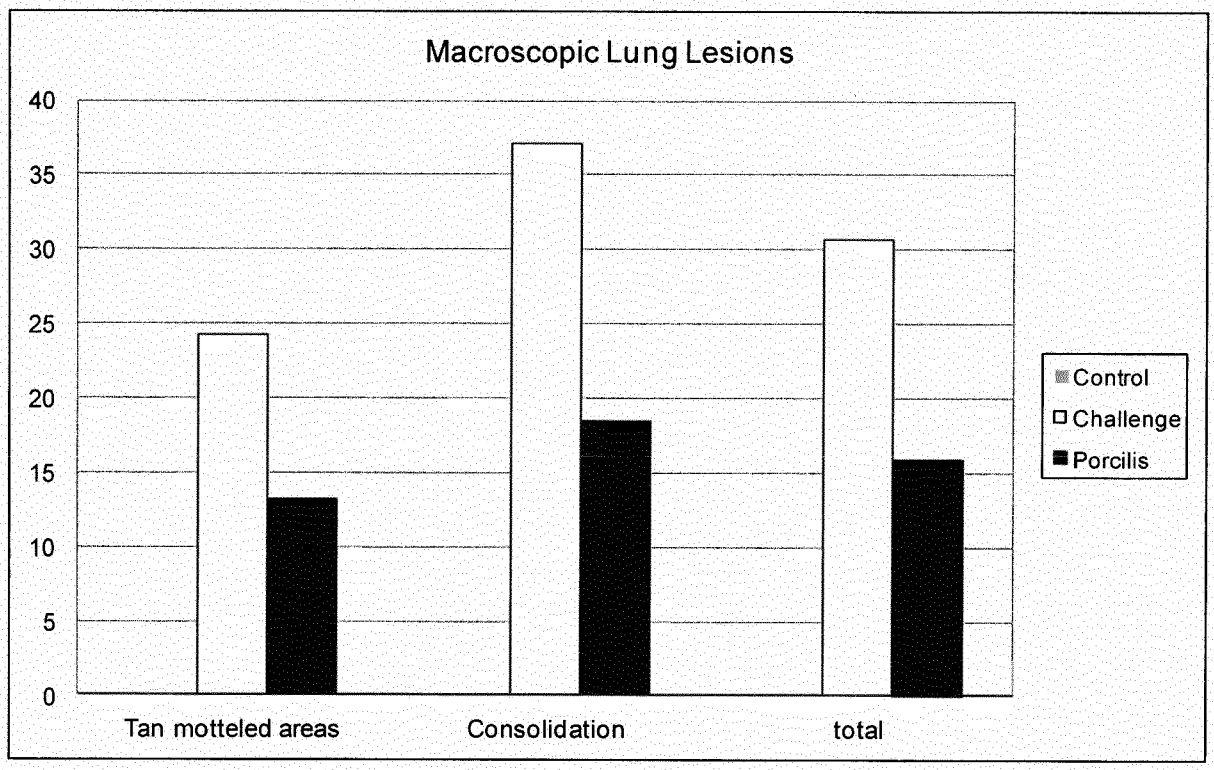

Macroscopic Lung Lesions
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Tan motteled areas
Consolidation
total
Control
Challenge
Porcilis

FIG 7A

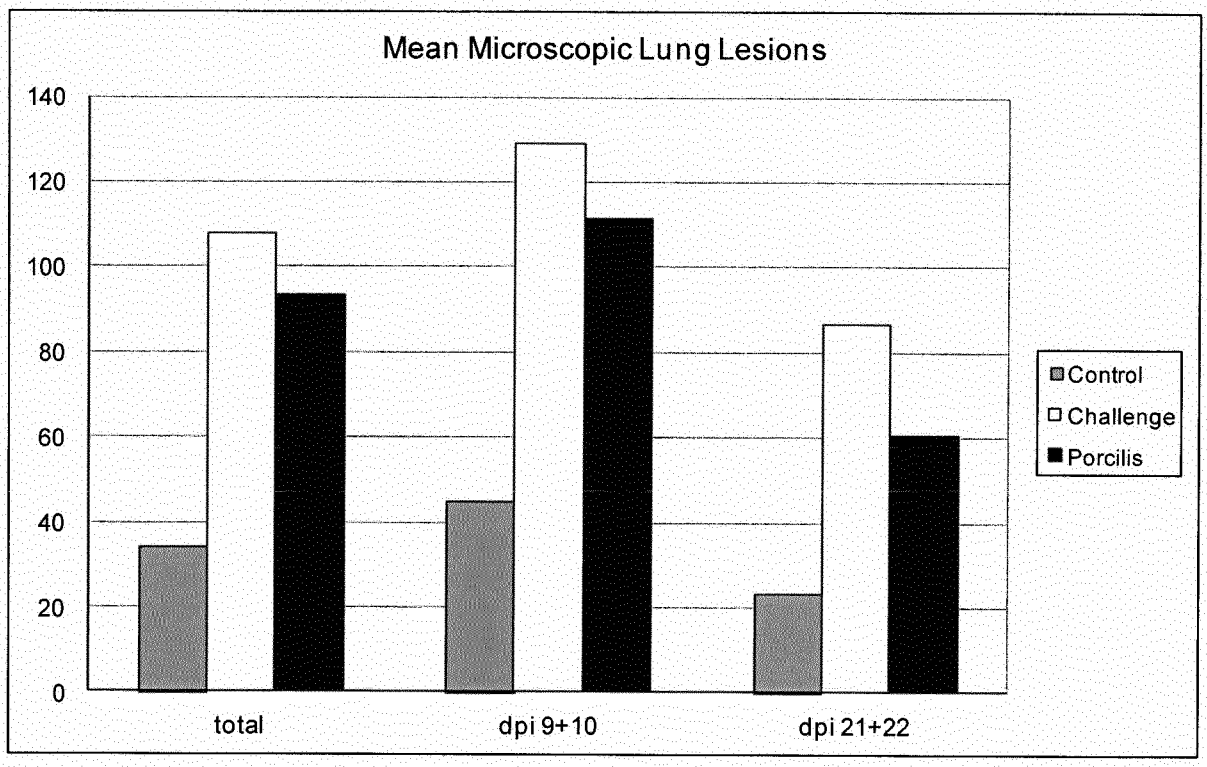

Mean Microscopic Lung Lesions
140
120
100
80
60
40
20
0
total
dpi 9+10
dpi 21+22
Control
Challenge
Porcilis

FIG 7B

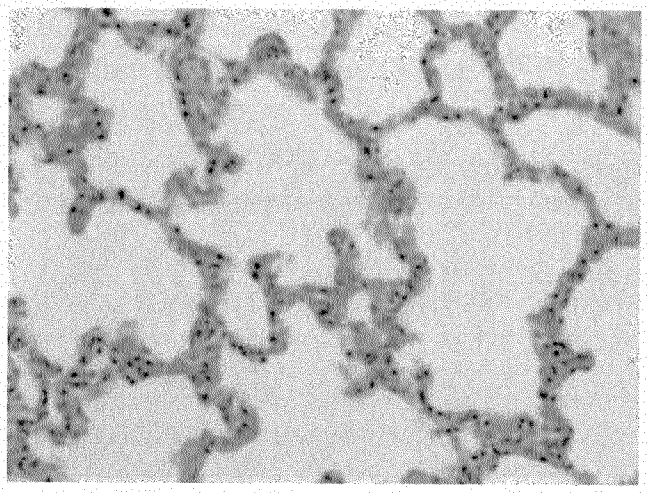


FIG 7C

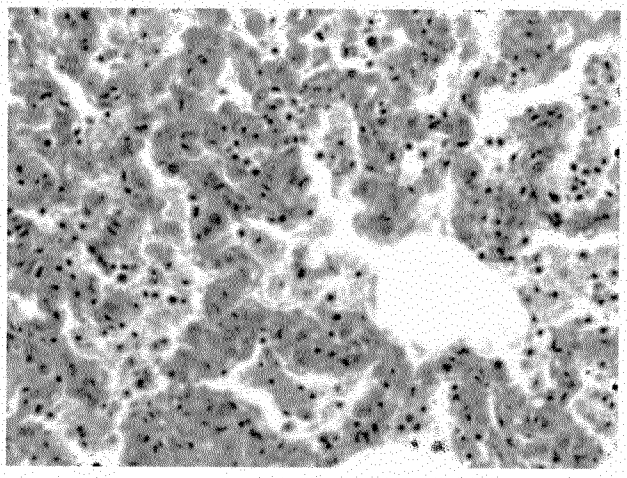
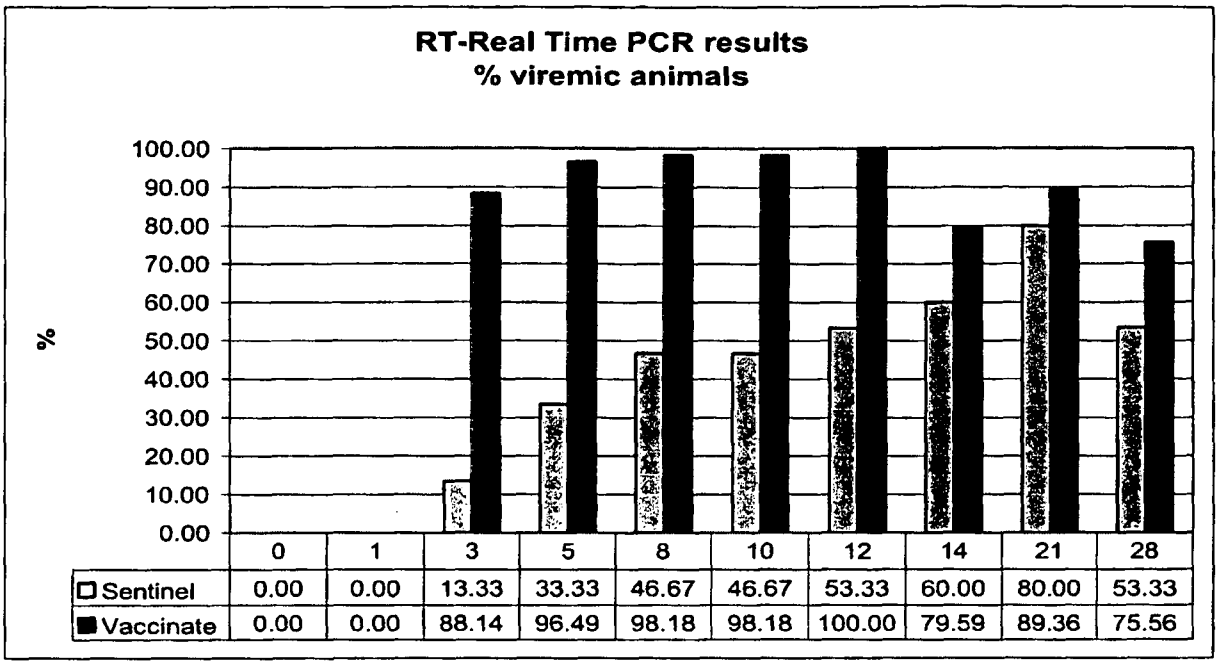
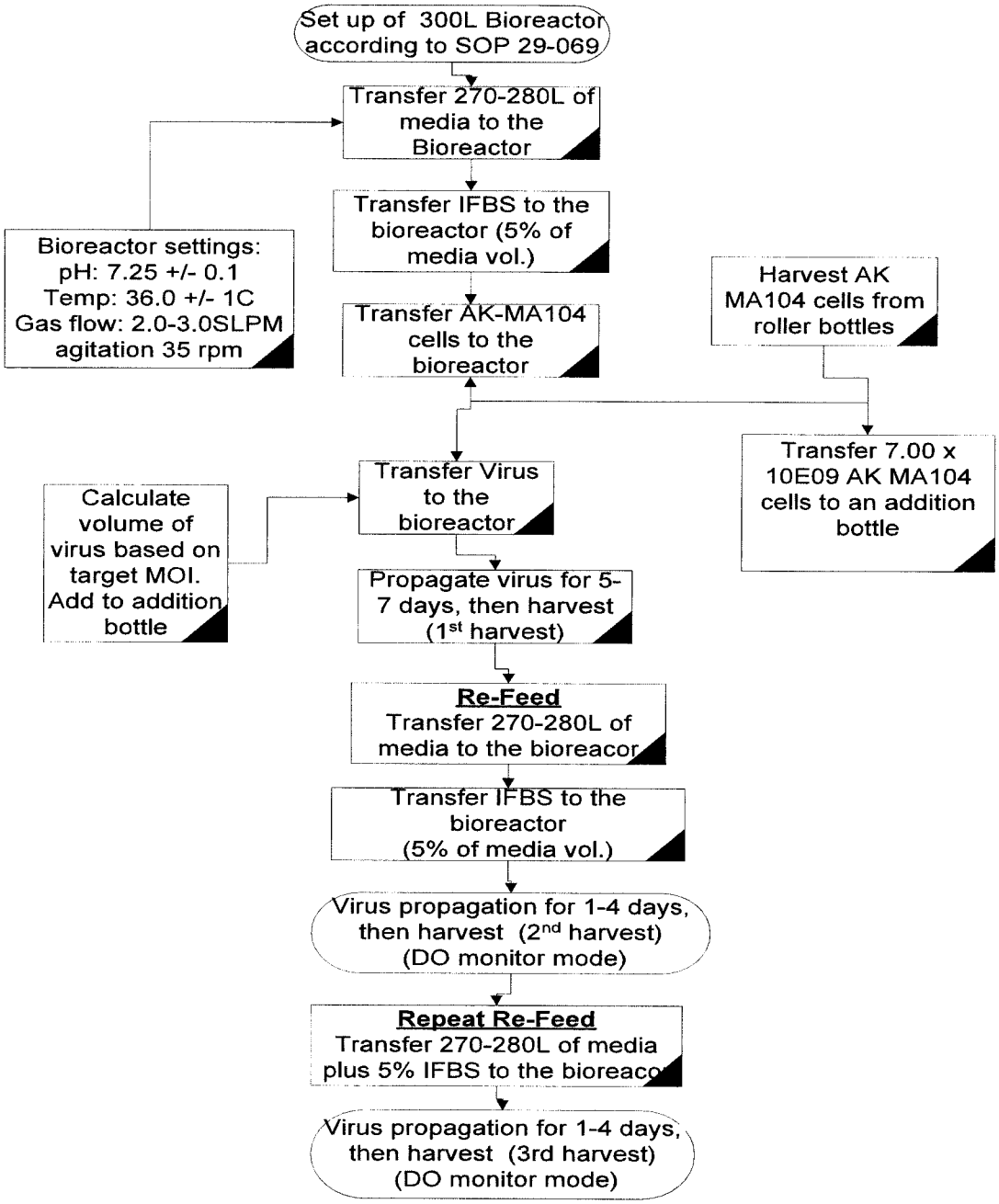


FIG 8



	0	1	3	5	8	10	12	14	21	28
Sentinel	0.00	0.00	13.33	33.33	46.67	46.67	53.33	60.00	80.00	53.33
Vaccinate	0.00	0.00	88.14	96.49	98.18	98.18	100.00	79.59	89.36	75.56

FIG 9


Set up of 300L Bioreactor according to SOP 29-069
Transfer 270-280L of media to the Bioreactor
Transfer IFBS to the bioreactor (5% of media vol.)
Transfer AK-MA104 cells to the bioreactor
Bioreactor settings: pH: 7.25 +/- 0.1 Temp: 36.0 +/- 1C Gas flow: 2.0-3.0SLPM agitation 35 rpm
Harvest AK MA104 cells from roller bottles
Transfer 7.00 x 10E09 AK MA104 cells to an addition bottle
Transfer Virus to the bioreactor
Calculate volume of virus based on target MOI. Add to addition bottle
Propagate virus for 5-7 days, then harvest (1st harvest)
Re-Feed
Transfer 270-280L of media to the bioreacor
Transfer IFBS to the bioreactor (5% of media vol.)
Virus propagation for 1-4 days, then harvest (2nd harvest) (DO monitor mode)
Repeat Re-Feed
Transfer 270-280L of media plus 5% IFBS to the bioreac
Virus propagation for 1-4 days, then harvest (3rd harvest) (DO monitor mode)

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de publicación internacional
23 Agosto 2012 (23.08.2012)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2012/110489 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/12 (2006.01) ***C12N 7/00*** (2006.01)

(21) Número de solicitud internacional:
PCT/EP2012/052475

(22) Fecha de presentación internacional:
14 Febrero 2012 (14.02.2012)

(25) Idioma de la presentación:
Inglés

(26) Idioma de la publicación:
Inglés

(30) Datos de prioridad:
61/444.074 17 Febrero 2011 (17.02.2011) US

(71) Solicitante*(para todos los Estados designados excepto EE.UU.)*: **BOHERINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH** [DE/DE]; Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(solamente para EE.UU.):* **BURGARD, Kim** [DE/DE]; Boheringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **KROLL, Jeremy** [US/US]; Boheringer Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **LAYTON, Sarah M.** [US/US]; Boheringer Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **OHLINGER, Volker** [DE/DE]; Boheringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **ORVEILLON, Francois-Xavier** [FR/DE]; Boheringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **PESCH, Stefan** [DE/DE]; Boheringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **PIONTKOWSKI, Michael Dennis** [US/US]; Boheringer Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **ROOF, Michael B.** [US/US]; Boheringer Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **UTLEY, Philip Dennis** [US/US]; 502 8th Avenue, Slater, Iowa 50244 (US). **VAUGHN, Eric Martin** [US/US]; Boheringer Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US).

(74) Agente: **HAMMANN ET AL., Heinz et al.;** Boheringer Ingelheim GmbH, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para todo tipo de protección nacional disponible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para todo tipo de protección regional disponible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Declaración en virtud de la regla 4.17:

--- con relación al derecho del solicitante a solicitar y que se le conceda una patente (Regla 4.17(ii))

Publicada:

--- *sin informe de búsqueda internacional, se volverá a publicar después de la recepción de este informe (Regla 48.2g)*

--- con indicación(ones) en relación *al material biológico depositado proporcionado en virtud de la Regla 13bis por separado a partir de la descripción (Reglas 13bis.4 (d) (i) y 48.2 (a) (viii)*

--- *con la parte de la descripción de la lista de secuencias (regla 5.2a))*

WO 2012/110489 A2

(54) Título: NUEVA CEPA DEL PRRSV EUROPEA.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a vacunas contra el PRRS vivas modificadas mejoradas que contienen nuevas cepas europeas del PRRSV y a procedimientos de uso y fabricación de tales vacunas..
.

NUEVA CEPA DEL PRRSV EUROPEA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

Antecedentes de la invención

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

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

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

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

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

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

La vacunación es el procedimiento clave para aliviar la carga de PRRS ya que los cerdos que

se recuperan de una infección del PRRS desarrollarán una respuesta inmunitaria que bajo circunstancias normales los protegerá de ser infectados de nuevo por la misma cepa del virus. Sin embargo, el virus del PRRS tiene la capacidad de cambiar (por mutación o recombinación); y, por tanto, pueden producirse nuevas cepas víricas. En tales casos, la protección cruzada entre cepas puede no existir, y pueden observarse nuevos brotes en granjas que habían sido infectadas previamente. Por tanto, existe una necesidad continua de vacunas adicionales.

Breve resumen de la invención

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

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

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

También se contempla un procedimiento para la preparación del PRRSV atenuado vivo depositado en la Colección europea de cultivos celulares (ECACC) con el número de acceso ECACC 11012502 o una forma atenuada de una cepa parental depositada con el número de acceso ECACC 11012501 que comprende adaptar un PRRSV cultivado con MA 104 de un tipo europeo a células de mamífero no MA 104.

Otro aspecto de la invención contempla una vacuna para la protección de cerdos contra la infección por PRRSV que comprende el PRRSV atenuado vivo depositado en la Colección

europea de cultivos celulares (ECACC) con el número de acceso ECACC 11012502 o uno atenuado de una cepa parental depositada con el número de acceso ECACC 11012501 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una vacuna tal puede comprender ventajosamente además uno o más patógenos atenuados o inactivados no PRRSV o material antigénico del mismo. Por ejemplo, los patógenos no PRRSV pueden seleccionarse de virus de la seudorrabia, virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible, *Escherichia coli*, *Erysipelas rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

En otras realizaciones, la vacuna puede comprender adicionalmente una o más cepas del PRRSV europeo adicionales seleccionadas del grupo que consiste en una cepa del PRRSV depositada con los números de acceso de la cepa del virus de Lelystad (agente de Lelystad (CDI-NL-2.91), u otras cepas tales como aquellas depositadas con los números de acceso ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, nº de acceso de CNCM I-1140, nº de acceso de CNCM I-1387, nº de acceso de CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 y VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, o ECACC V93070108 o de hecho puede ser una cepa US tal como el virus del PRRS norteamericano, pT7P129A; depósito de ATCC VR-2332, depósito de ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 y ATCC VR 2402.

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

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una vacuna atenuada viva para combatir el PRRS que comprende mezclar un virus PRRSV atenuado vivo depositado en la Colección europea de cultivos celulares (ECACC) con el número de acceso ECACC 11012502 o uno atenuado de una cepa parental depositada con el número de acceso ECACC 11012501 con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En tales procedimientos, el PRRSV atenuado vivo puede comprender preferentemente además una o más cepas del PRRSV europeo adicionales seleccionadas del grupo que consiste en una cepa del PRRSV depositada con los números de acceso ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, nº de acceso de CNCM I-1140, nº de acceso de CNCM I-1387 y nº de acceso de CNCM I-1388.

En algunas realizaciones, el PRRSV atenuado vivo puede comprender adicionalmente un adyuvante.

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

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

Otro aspecto de la invención se refiere a un virus del PRRS que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95% de homología con la secuencia expuesta tanto en SEC ID Nº:1 como en SEC ID Nº:10.

También se contempla un virus del PRRS que comprende al menos un ORF que codifica una proteína que es idéntica al menos 98% a cualquiera de las secuencias expuestas en SEC ID Nº: 2 a 9 o SEC ID Nº:11 a SEC ID Nº:18.

También se contempla un virus del PRRS que tiene una secuencia de nucleótidos de SEC ID Nº:1 o SEC ID Nº:10 o un fragmento de tanto SEC ID Nº:1 como SEC ID Nº:2 en la que el fragmento codifica un ORF seleccionado del grupo que consiste en SEC ID Nº:2, SEC ID Nº:3, SEC ID Nº:4, SEC ID Nº:5, SEC ID Nº:6, SEC ID Nº:7, SEC ID Nº:8, SEC ID Nº:9, SEC ID Nº:11, SEC ID Nº:12, SEC ID Nº:13, SEC ID Nº:14, SEC ID Nº:15, SEC ID Nº:16, SEC ID Nº:17 y SEC ID Nº:18.

La invención se refiere además a una vacuna de subunidad para la vacunación de un animal porcino en la que la vacuna comprende uno o más nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en un nucleótido que codifica un ORF seleccionado del grupo que consiste en SEC ID

Nº:2, SEC ID Nº:3, SEC ID Nº:4, SEC ID Nº:5, SEC ID Nº:6, SEC ID Nº:7, SEC ID Nº:8, SEC ID Nº:9, SEC ID Nº:11, SEC ID Nº:12, SEC ID Nº:13, SEC ID Nº:14, SEC ID Nº:15, SEC ID Nº:16, SEC ID Nº:17 y SEC ID Nº:18.

Otro aspecto de la invención se refiere a una vacuna de subunidad para la vacunación de un animal porcino en la que la vacuna comprende uno o más nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en SEC ID Nº:19; SEC ID Nº:20; SEC ID Nº:21; SEC ID Nº:22; SEC ID Nº:23; SEC ID Nº:24; SEC ID Nº:25; SEC ID Nº:26; SEC ID Nº:27; SEC ID Nº:28; SEC ID Nº:29; SEC ID Nº:30; SEC ID Nº:31; SEC ID Nº:32; SEC ID Nº:33 y SEC ID Nº:34.

También se contempla una composición que comprende una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en una proteína que tiene la secuencia de SEC ID Nº:2, SEC ID Nº:3, SEC ID Nº:4, SEC ID Nº:5, SEC ID Nº:6, SEC ID Nº:7, SEC ID Nº:8, SEC ID Nº:9, SEC ID Nº:11, SEC ID Nº:12, SEC ID Nº:13, SEC ID Nº:14, SEC ID Nº:15, SEC ID Nº:16, SEC ID Nº:17 y SEC ID Nº:18.

También se contempla un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº:19; SEC ID Nº:20; SEC ID Nº:21; SEC ID Nº:22; SEC ID Nº:23; SEC ID Nº:24; SEC ID Nº:25; SEC ID Nº:26; SEC ID Nº:27; SEC ID Nº:28; SEC ID Nº:29; SEC ID Nº:30; SEC ID Nº:31; SEC ID Nº:32; SEC ID Nº:33; SEC ID Nº:34.

La invención se refiere además a un vector de expresión recombinante y/o vacuna que comprende tales vectores de expresión, en el que dichos vectores comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno o más ORF de PRRSV seleccionados del grupo que consiste en SEC ID Nº:2, SEC ID Nº:3, SEC ID Nº:4, SEC ID Nº:5, SEC ID Nº:6, SEC ID Nº:7, SEC ID Nº:8, SEC ID Nº:9, SEC ID Nº:11, SEC ID Nº:12, SEC ID Nº:13, SEC ID Nº:14, SEC ID Nº:15, SEC ID Nº:16, SEC ID Nº:17 y SEC ID Nº:18 operativamente ligados a un promotor. En tales realizaciones, el ácido nucleico que codifica los ORF puede seleccionarse preferentemente del grupo que consiste en SEC ID Nº:19; SEC ID Nº:20; SEC ID Nº:21; SEC ID Nº:22; SEC ID Nº:23; SEC ID Nº:24; SEC ID Nº:25; SEC ID Nº:26; SEC ID Nº:27; SEC ID Nº:28; SEC ID Nº:29; SEC ID Nº:30; SEC ID Nº:31; SEC ID Nº:32; SEC ID Nº:33 y SEC ID Nº:34.

Breve descripción de varias vistas de los dibujos

Figura 1A: Observación clínica de la puntuación de tos en el modelo de exposición respiratoria usando la cepa de exposición europea.

Figura 1B: Observación clínica de la puntuación clínica total en el modelo de exposición respiratoria usando una cepa de exposición europea.

Figura 2: Mediciones de temperatura rectal en el modelo de exposición respiratoria usando una cepa de exposición europea.

Figura 3: Mediciones del aumento de peso diario promedio en el modelo de exposición respiratoria usando una cepa de exposición europea.

Figura 4: Viremia del PRRS como se indica por PCR cuantitativa en el modelo de exposición respiratoria usando una cepa de exposición europea.

Figura 5: Serología del PRRS como se indica por ELISA en el modelo de exposición respiratoria usando una cepa de exposición europea.

Figura 6: Examen macroscópico de lesiones pulmonares en el modelo de exposición respiratoria usando una cepa de exposición europea.

Figura 7A-C: Mediciones de histopatología. La Figura 7A muestra lesiones pulmonares macroscópicas medias; la Figura 7B muestra la histopatología de animal de control; la Figura 7B muestra la histopatología de animales infectados por PRRS.

Figura 8: Muestra los resultados de PCR-RT en tiempo real que representan el % de viremia en animales vacunados con 94881 del PRRS EU.

Figura 9: Procedimiento simultáneo para la producción a gran escala de 94881 del PRRS EU.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona procedimientos para tratar o reducir la gravedad de la infección por el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV), además de procedimientos para prevenir la infección por PRRSV. Generalmente, el procedimiento es para tratar o reducir la gravedad de o la incidencia de la infección por el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV). “Tratar o reducir la gravedad de o la incidencia de” se refiere a una reducción en la gravedad de los signos clínicos, síntomas y/o signos patológicos normalmente asociados a la infección, hasta e incluyendo la prevención de cualquier signo o síntoma tal. “Signos patológicos” se refiere a la prueba de infección que se encuentra microscópicamente o durante autopsia (por ejemplo, lesiones pulmonares).

El procedimiento generalmente incluye la etapa de administrar una cantidad terapéutica de un antígeno del PRRSV a un cerdo de una edad definida o intervalo de edad. Por ejemplo, en un aspecto de la invención, una cantidad terapéutica de un antígeno del PRRSV puede administrarse a un lechón de aproximadamente tres semanas de edad o más joven, y diferentes cantidades terapéuticas del antígeno pueden administrarse a un cerdo entre aproximadamente 3 semanas de edad y 4 semanas de edad. Similarmente, una cantidad terapéutica incluso diferente podría administrarse a un cerdo entre aproximadamente cuatro semanas y dieciséis semanas de edad (o cualquier edad dentro de este intervalo, por ejemplo, cinco semanas a seis semanas de edad, nueve semanas a quince semanas de edad, siete semanas a diez semanas de edad, etc.), o a cerdos de más de dieciséis semanas, tales como una cerda adulta.

En realizaciones específicas, la presente invención se refiere a una cepa del PRRSV atípica atenuada y a vacunas vivas modificadas mejoradas correspondientes que confieren inmunidad eficaz a esta cepa del PRRSV típica recientemente descubierta. “Inmunidad eficaz” se refiere a la capacidad de una vacuna para prevenir infecciones por PRRSV en cerdos, que incluye infecciones por PRRSV atípicas, que producen signos clínicos sustanciales de la enfermedad. Debe entenderse que los cerdos inmunizados pueden o pueden no ser serológicamente positivos para PRRSV, pero los cerdos no presentan ningún síntoma clínico sustancial.

En formas preferidas, la vacuna de la invención incluye un virus vivo del PRRS de tipo europeo vivo que se ha atenuado en virulencia. Se ha mostrado que el virus atenuado resultante es avirulento en estudios en animales huésped controlados expuestos y confiere inmunidad eficaz. Esta cepa particular del PRRS EU no es tan virulenta como otras y de ahí que sea una opción

atractiva como candidato a vacuna. La cepa parental 94881 del PRRSV no produce enfermedad de PRRS atípica grave en la cerda preñada ni lesiones pulmonares graves en cerdos jóvenes. Esta cepa se aisló inicialmente en Renania del Norte-Westfalia, Alemania, de un lechón de 3 semanas de edad con trastorno respiratorio grave. La cepa se atenuó posteriormente mediante pase continuo por células MA 104. La cepa atenuada fue depositada por Bioscreen GmbH, Mendelstrasse 11, 48149, Muenster, Alemania en la Colección europea de cultivos celulares (ECACC), Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Gran Bretaña, el 25 de enero de 2011 y se le concedió el nº de acceso 11012502. Este virus atenuado es un virus de siembra maestro (MSV) preferido que posteriormente se ha sometido a pases y se ha desarrollado como una vacuna eficaz contra el PRRSV. La cepa parental virulenta denominada 94881 también fue depositada según el Tratado de Budapest por Bioscreen GmbH, Mendelstrasse 11, 48149, Muenster, Alemania en la Colección europea de cultivos celulares (ECACC), Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Gran Bretaña, el 25 de enero de 2011 y se le concedió el nº de acceso 11012501.

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

El pase del virus hasta la atenuación se llevó a cabo usando procedimientos de virología clásica. Específicamente, la cepa aislada parental 94881 del PRRS se atenuó *in vitro* mediante pases continuos por células MA 104 para lograr un pase máximo de 108 pases después del aislamiento inicial. Brevemente, el material se pasó aproximadamente 1 a 2 pases por semana durante un total de 108 pases en matraces T de 25 cm^2 o T de 75 cm^2. Los cultivos de células MA 104 confluentes con aproximadamente 12 - 30 ml de medio esencial mínimo (MEM) complementado con 6% de suero bovino fetal (SBF) se inocularon con 100 a 300 µl del virus. Los cultivos se incubaron durante 3 - 7 días en una estufa de incubación de cámara humidificada a 37ºC con 4 - 6% de CO_2. Una vez los cultivos alcanzaron > 25% del efecto citopático (CPE), el matraz se recogió extrayendo el sobrenadante. Una parte del sobrenadante se pasó a un nuevo matraz y 2 ml de la cosecha se tomaron en alícuotas para el almacenamiento a -60ºC a -80ºC.

El experto usando técnicas convencionales en la materia podrá determinar la secuencia de ácidos nucleicos subyacentes del virus atenuado que se depositó en ECACC con el nº de acceso 11012502. Por tanto, la presente invención engloba adicionalmente una secuencia de ácidos nucleicos específica para el PRRSV atenuado 94481 depositado en ECACC con el nº

de acceso 11012502. Preferentemente, la invención engloba adicionalmente secuencias de ácidos nucleicos del virus del PRRS que comparten al menos 95% homología de secuencias con la secuencia de SEC ID Nº:1 o SEC ID Nº:10 ya que tales virus pueden ser probablemente eficaces en conferir inmunidad en animales vacunados con virus atenuados que contienen tales secuencias homólogas. La secuencia mostrada en SEC ID Nº:1 es la secuencia de longitud completa del MSV 94881 del PRRS atenuado y tiene una secuencia de longitud completa de 14843 pb. Los ORF 1 a 7 se han anotado para esta secuencia del siguiente modo:

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

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

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

Con el aislamiento de esta nueva cepa del virus del PRRS europeo atenuado es posible producir vacunas contra el PRRS mejoradas que contienen una cepa del PRRS más reciente que refleja cepas del PRRS virulentas actualmente encontradas en el campo. En particular, el nuevo virus del PRRS europeo atenuado puede usarse para preparar vacunas vivas

modificadas (MLV). Una vacuna viva modificada se caracteriza porque contiene virus vivos que pueden replicarse en cerdos, pero no ejercen la enfermedad del PRRS clínica. Además, tras la administración induce una respuesta inmunológica en cerdos que generalmente conduce a un grado significativo de protección contra la posterior infección por el virus del PRRS patógeno. El virus que muestra tales características se llama normalmente virus atenuado. Además, la presente invención proporciona detalles de las secuencias de los ORF de tanto las cepas parentales como las atenuadas del PRRSV 94881. Por tanto, se contempla que el experto pueda emplear las secuencias de uno cualquiera o más de los ORF mostrados en la presente memoria en una vacuna de subunidad.

Como se ha observado anteriormente, en general, la atenuación del virus puede generarse a partir de cepas aisladas de virus patógenos por pases repetidos por células huésped adecuadas que son permisibles al virus hasta que el virus muestra las propiedades deseadas (documentos WO 92/21375, WO 93/06211, WO93/03760, WO 93/07898, WO 96/36356, EP 0 676 467, EP 0 732 340, EP 0 835 930). Alternativamente, puede generarse por remanipulación genética mediante el uso de un clon infeccioso, normalmente un transcrito de ADN complementario de longitud completa del genoma vírico (documentos WO 98/18933, EP 1 018 557, WO 03/062407, Nielsen y col., J Virol 2003, 77:3702-371 1). En una realización preferida, la presente invención se refiere a una MLV que contiene virus del PRRS atenuado del genotipo europeo 94481 que se atenúa a partir de un virus parental que se depositó en ECACC con el nº de acceso 11012501. Una MLV preferida contiene el virus atenuado de la presente invención que se depositó en ECACC con el nº de acceso 11012502.

En otro aspecto, la presente invención contempla la preparación y el aislamiento de una progenie o descendiente de un virus del PPRS que se depositó el 25 de enero de 2011 en la Colección europea de cultivos celulares (ECACC), Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Gran Bretaña, con los números de acceso ECACC 11012502 (cepa atenuada para MLV) y 11012501 (cepa parental). Por tanto, la invención se extiende a cepas del virus del PRRS que se derivan de las cepas depositadas mediante la propagación o multiplicación en una forma idéntica o divergente, en particular descendientes que poseen las características esenciales de las cepas depositadas. Tras la propagación continuada, las cepas pueden adquirir mutaciones, la mayoría de las cuales no alterarán significativamente las propiedades de estas cepas.

Las cepas de la invención también pueden modificarse adicionalmente para conferir adicionalmente propiedades deseables a las mismas. Esto puede lograrse por propagación clásica y técnicas de selección como la propagación continuada en células huésped adecuadas

para extender el fenotipo atenuado. Alternativamente, las cepas pueden modificarse genéticamente por mutación dirigida de la secuencia de ácidos nucleicos del genoma de estas cepas por técnicas de ingeniería genética adecuadas. El genoma del PRRSV se secuenció completamente o parcialmente (Conzelmann y col., 1993; Meulenberg y col., 1993a, Murtaugh y col., 1995) y codifica, además de la ARN polimerasa dependiente de ARN (ORF 1a y 1b), seis proteínas estructurales de las que cuatro glucoproteínas de la envuelta se llamaron GP2 (ORF2), GP3 (ORF3), GP4 (ORF4) y GP5 (ORF5), una proteína M de la membrana no glicosilada (ORF6) y la proteína N de la nucleocápside (ORF7) (Meulenberg y col. 1995, 1996; van Nieuwstadt y col., 1996). La caracterización inmunológica y la secuenciación de nucleótidos de las cepas del PRRSV europeo y US han identificado diferencias antigénicas menores dentro de las cepas del PRRSV localizadas en las proteínas víricas estructurales (Nelson y col., 1993; Wensvoort y col., 1992; Murtaugh y col., 1995). El MSV 94881 del PRRS de la presente invención se ha comparado con la cepa del virus de referencia europeo el virus de Lelystad (LV), que reveló homologías de nucleótidos que oscilan de 85,40 a 95,09 por ciento en los 8 genes víricos diferentes e identidades de aminoácidos de 86,39 a 97,27 por ciento entre ambas cepas de virus. Pudieron identificarse dos deleciones en el ORF 1a del MSV 94881 en comparación con LV. Por ejemplo, ORF1a del MSV 94881 tiene 85,40% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce una identidad de aminoácidos de 86,39%; ORF1b del MSV 94881 tiene 92,12% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce un identidad de aminoácidos de 97,27%; ORF2 del MSV 94881 tiene 91,07% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce un identidad de aminoácidos de 90,76%; ORF3 del MSV 94881 tiene 90,98% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce un identidad de aminoácidos de 89,43%; ORF4 del MSV 94881 tiene 90,58% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce un identidad de aminoácidos de 87,43%; ORF5 del MSV 94881 tiene 90,43% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce un identidad de aminoácidos de 88,56%; ORF6 del MSV 94881 tiene 95,02% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce un identidad de aminoácidos de 97,11%; ORF7 del MSV 94881 tiene 95,09% de homología de nucleótidos con el virus de Lelystad que produce un identidad de aminoácidos de 92,97%.

De hecho, el virus 94881 del PRRS de la presente invención puede prepararse en un virus quimérico en el que el esqueleto del virus del PRRS con el nº de acceso de ECACC 11012502 o de hecho la cepa parental depositada con el nº de acceso de ECACC 11012501 se modifica para sustituir la secuencia endógena de uno o más de ORF 1a, ORF 1b, ORF 2, ORF 3, ORF 4, ORF 5, ORF 6 o ORF 7 con el ORF correspondiente de una cepa diferente del virus del

PRRS. Por ejemplo, la cepa diferente del virus del PRRS pueden ser una cepa europea diferente tal como la cepa del virus de Lelystad (agente de Lelystad (CDI-NL-2.91), u otras cepas tales como aquellas depositadas con los números de acceso ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, nº de acceso de CNCM I-1140, nº de acceso de CNCM I-1387, nº de acceso de CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 y VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, o ECACC V93070108 o de hecho puede ser una cepa US tal como el virus del PRRS norteamericano, pT7P129A; depósito de ATCC VR-2332, depósito de ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 y ATCC VR 2402.

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

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

Por tanto, las vacunas que comprenden uno cualquiera de los virus del PRRS de la cepa del PRRSV con el nº de acceso de ECACC 11012501, 11012501, números de acceso ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, nº de acceso de CNCM I-1140, nº de acceso de CNCM I-1387 y nº de acceso de CNCM I-1388, además de cualquier combinación de estas cepas o sus descendientes, son realizaciones preferidas de la presente invención. En realizaciones específicas, el virus del PRRS 94881 se cultiva en un procedimiento en el que hay una siembra simultánea del virus y las células huésped juntas en el mismo día en un biorreactor como se muestra en la Figura 9. Características adicionales de un procedimiento de producción del virus del PRRS 94881 pueden ser como se describen en la solicitud provisional de EE.UU. presentada simultáneamente con la presente titulada “Un procedimiento a escala

comercial para la producción de PRRSV" presentada simultáneamente con la presente solicitud con el número de solicitud 61/444.071. Aunque esto es un procedimiento de cultivo del PRRSV 94881, debe entenderse que el virus puede propagarse según cualquier procedimiento convencional conocido para aquellos expertos en la materia.

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

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

Una vacuna según la presente invención puede presentarse en forma de una preparación liofilizada del virus vivo, para reconstituirse con un disolvente, para producir una disolución para inyección. El disolvente puede ser, por ejemplo, agua, solución salina fisiológica o tampón, o un disolvente con adyuvante. El disolvente puede contener adyuvantes. La vacuna reconstituida puede entonces inyectarse a un cerdo, por ejemplo, como una inyección intramuscular o intradérmica en el cuello. Para inyección intramuscular puede aplicarse un volumen de 2 ml, para una inyección intradérmica es normalmente 0,2 ml. Por tanto, en otro aspecto, la presente invención es un producto de vacuna que comprende en recipientes separados una composición liofilizada del virus y un disolvente para reconstitución y que opcionalmente contiene adicionalmente un prospecto o etiqueta que comprende instrucciones de uso.

Una vacuna según la presente invención puede no sólo comprender una o más de las cepas anteriormente mencionadas, sino que puede incluir adicionalmente componentes activos contra el PRRS u otras enfermedades víricas o bacterianas porcinas como el circovirus porcino o el virus de la fiebre porcina clásica. Por tanto, la invención se refiere además a una vacuna como se ha descrito, caracterizada porque contiene al menos otro antígeno activo contra una enfermedad porcina que no es PRRS. Por ejemplo, tales otros antígenos pueden incluir *Mycoplasma hyopneumoniae*, PCV2, SIV, *H. parasuis*, *E. rhusiopathiae*, *S. suis*, *A. suis*, *Leptospira sp. Parvovirus* y similares. Además, la vacuna puede comprender ciertos adyuvantes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables. La invención proporciona nuevas composiciones de vacuna, en particular vacunas contra el virus del PRRS que comprenden el PRRSV 94881 que comprenden además adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna de forma que se observe una mejor respuesta clínica/resultado con la administración de la combinación del adyuvante y la vacuna con respecto a la administración de la vacuna sola. Por ejemplo, las composiciones de vacuna de la invención pueden comprender una vacuna contra el virus PRRSV 94881 y un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en MCP-1, α-tocoferol (por ejemplo, acetato de α-tocoferol, una versión a modo de ejemplo que se comercializa como Diluvac Forte®), fracciones de *Haemophilus somnus*, carbopol y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la vacuna contra el virus que comprende la vacuna contra el virus 94881 del PRRS puede ser una vacuna de subunidad recombinante o alternativamente puede ser una vacuna contra el virus vivo atenuado. Una vacuna viva a modo de ejemplo que existe es la MLV del PRRS Ingelvac® y el 94881 del PRRS puede formularse de un modo similar a la MLV del PRRS Ingelvac®.

Además de lo anterior, las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener otros componentes, en tanto que los otros componentes no interfieran con los adyuvantes o la vacuna contra el virus subyacente. Tales otros componentes incluyen, por ejemplo, aglutinantes, colorantes, desecantes, antisépticos, agentes humectantes, estabilizadores, excipientes, adhesivos, plastificantes, agentes de pegajosidad, espesantes, materiales de parche, bases para pomada, eliminadores de queratina, sustancias básicas, promotores de la absorción, ácidos grasos, éster de ácido graso, alcoholes superiores, tensioactivos, agua y agentes de tampón. Otros componentes preferidos incluyen agentes de tampón, bases para pomada, ácidos grasos, antisépticos, sustancias básicas o tensioactivos.

El contenido o la cantidad de los adyuvantes usados en la invención puede variar y puede determinarse considerando, por ejemplo, las propiedades de la vacuna contra el virus del PRRS que se usa, y la forma de dosificación. El adyuvante puede comprender, por ejemplo, 1

al 100% en peso. Las composiciones basadas en el PRRSV 94881 de la invención se producen mezclando juntos el componente de adyuvante y el componente de la vacuna contra el virus, tanto solos como con diversos otros componentes. Las composiciones pueden ser de forma que la vacuna contra el virus y el adyuvante se presenten como una formulación o, alternativamente, el adyuvante y la vacuna se presenten en formulaciones distintas que pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente.

Por tanto, el componente de adyuvante de las composiciones inmunogénicas de la invención puede administrarse por separado de la vacuna contra el virus en la administración a organismos. Alternativamente, el adyuvante según la presente invención, junto con la vacuna contra el virus, pueden administrarse como una única composición de vacuna. La vacuna contra el virus puede ser cualquier vacuna contra el virus. Más realizaciones específicas contemplan el uso de una vacuna contra el virus del PRRS que comprende el PRRSV 94881. Además, una vacuna tal puede combinarse con otras vacunas tales como la MLV del PRRS Ingelvac® y/o Porcilis®. Esto es simplemente una vacuna de combinación del virus del PRRS a modo de ejemplo y fácilmente pueden prepararse otras combinaciones de vacuna tales.

Las composiciones inmunogénicas descritas en la presente memoria son particularmente ventajosas en la inducción de la producción de una respuesta de anticuerpo al virus del PRRS. La administración de las vacunas producirá preferentemente una reducción de la gravedad de uno o más síntomas clínicos, tales como lesiones pulmonares, anorexia, decoloraciones de la piel, letargo, signos respiratorios, lechones momificados, tos, diarrea y combinaciones de los mismos, que están asociados a infección por PRRSV.

Por tanto, las composiciones potencian particularmente el resultado clínico en un animal enfermo con respecto al resultado de la administración de la vacuna contra el virus del PRRS sola. En realizaciones específicas, el resultado clínico potenciado es una reducción del porcentaje de lesiones pulmonares de al menos 50% cuando se compara con animales que no reciben la composición inmunogénica en combinación con dicho adyuvante. En otras realizaciones, el resultado clínico potenciado es una reducción de la viremia en animales de al menos 45% cuando se compara con animales que no reciben la composición inmunogénica en combinación con dicho adyuvante.

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a una vacuna mejorada, más particularmente a una vacuna contra el virus del PRRS mejorada, en el que la mejora comprende mezclar con la vacuna contra el virus un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en MCP-1, fracciones

de *Haemophilus somnus*, carbopol y combinaciones de los mismos. La composición de vacuna de la invención puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

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

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

La vacuna contra el virus del PRRS, el adyuvante, o combinaciones de los mismos, pueden administrarse a organismos por cualquier procedimiento adecuado seleccionado dependiendo, por ejemplo, de la afección de los animales y las propiedades de las enfermedades. Ejemplos de tales procedimientos incluyen administración intraperitoneal, administración dérmica, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intradérmica y parches,

administración nasal, administración por vía oral, administración mucosa (por ejemplo, administración rectal, administración vaginal y administración corneal). Entre ellas se prefiere la administración intramuscular.

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

En ciertas otras realizaciones, la vacuna puede ser una vacuna multivalente que comprende dos o más virus del PRRS en las que al menos uno de los virus del PRRS es el virus 94881 atenuado depositado con el nº de acceso de ECACC 11012502. Los otros virus del PRRS pueden ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en el virus de Lelystad de la cepa del PRRSV (agente de Lelystad (CDI-NL-2.91), u otras cepas tales como aquellas depositadas con los números de acceso ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, nº de acceso de CNCM I-1140, nº de acceso de CNCM I-1387, nº de acceso de CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 y VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, o ECACC V93070108 o de hecho puede ser una cepa US tal como el virus del PRRS norteamericano, pT7P129A; depósito de ATCC VR-2332, depósito de ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 y ATCC VR 2402.

Las vacunas basadas en los virus del PRRS pueden usarse para vacunar tanto lechones como cerdas. En un aspecto de la invención, una pauta de dosis particular se selecciona basándose en la edad del cerdo y el antígeno seleccionado para administración. Esto permitirá que los cerdos de cualquier edad reciban la dosis más eficaz. En un procedimiento preferido, una cantidad terapéutica de la MLV del PRRSV 94881 se administra a un cerdo o lechón que tiene aproximadamente dos semanas de edad $\pm$ 5 días de edad. La cantidad seleccionada variará dependiendo de la edad del cerdo. Alternativamente, una cantidad terapéutica diferente de una MLV tal se administra a un cerdo o lechón que tiene más de aproximadamente 3 semanas, y esta cantidad también se cambiará a medida que el cerdo que recibe una administración tal

envejece o se hace mayor. Por consiguiente, cerdos de aproximadamente cuatro semanas de edad, seis semanas de edad, ocho semanas de edad, diez semanas de edad, doce semanas de edad, catorce semanas de edad, dieciséis semanas de edad, una cerda joven, o una cerda recibirán todos diferentes cantidades. La dosis terapéutica que va a usarse se optimizará en el campo y normalmente se determina en estudios clínicos en los que se define una dosis de inmunización mínima basándose en la protección contra una exposición al PRRSV heterólogo virulento en cerdos susceptibles. Preferentemente, la MLV contra el PRRSV producida según los procedimientos descritos en la presente memoria se administra por administración intramuscular; sin embargo, pueden usarse otros procedimientos de administración tales como intradérmica, intranasal, intrarretiniana, oral, subcutánea y similares que son muy conocidos y usados en la materia.

El experto reconocerá que los procedimientos de vacunación pueden implicar determinar el momento y la dosificación apropiada para la vacunación de un cerdo contra el PRRSV. Tales procedimientos comprenden generalmente las etapas de determinar al menos una variable seleccionada del grupo que consiste en edad, estado de salud, nivel de inmunidad innata y nivel de inmunidad activa, del cerdo y ajustar un nivel de dosificación estándar para explicar estas variables. Generalmente, el nivel de inmunidad innata y el nivel de inmunidad activa se determinarán con referencia a un patrón que comprende los niveles promedio de una población de cerdos de edad y estado de salud similar. En un procedimiento particularmente preferido, todas las variables se consideran antes de determinar el nivel de dosificación óptimo y el momento de la administración.

En realizaciones preferidas, la presente invención también se refiere a ácidos nucleicos aislados que codifican marcos de lectura abiertos específicos del virus 94881 atenuado depositado con el nº de acceso de ECACC 11012502 y el virus 94881 virulento parental depositado con el nº de acceso de ECACC 11012501. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos completa del virus 94881 atenuado depositado con el nº de acceso de ECACC 11012502 tiene una secuencia de SEC ID Nº:1 que codifica las secuencias de proteínas de ORF1a, ORF1b, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 de SEC ID Nº:2, SEC ID Nº:3, SEC ID Nº:4, SEC ID Nº:5, SEC ID Nº:6, SEC ID Nº:7, SEC ID Nº:8 y SEC ID Nº:9, respectivamente. La secuencia de nucleótidos completa del virus 94881 virulento parental depositado con el nº de acceso de ECACC 11012501 tiene una secuencia de SEC ID Nº:10 que codifica las secuencias de proteínas de ORF1a, ORF1b, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 de SEC ID Nº:11, SEC ID Nº:12, SEC ID Nº:13, SEC ID Nº:14, SEC ID Nº:15, SEC ID Nº:16, SEC ID Nº:17 y SEC ID Nº:18, respectivamente.

La vacuna contra el PRRSV 94881 puede administrarse de cualquier forma convencional y en algunos procedimientos preferidos la administración es intramuscularmente. Se prefiere que la vacuna contra el PRRSV administrada proporcione sus beneficios de tratamiento o reducción de la gravedad de o incidencia de la infección por el PRRSV después de una dosis única, como con Ingelvac®; sin embargo, si se seleccionan otros antígenos o vacunas de combinación o multivalentes, debe entenderse que pueden administrarse en su modo convencional, que puede incluir una o más dosis de refuerzo después de la administración inicial. Aquellos expertos en la materia podrán determinar niveles de dosificación apropiados basándose en la vacuna contra el PRRSV seleccionada y el intervalo de edad del animal al que se administrará el antígeno.

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Descripción del modelo de exposición respiratoria al PRRSV

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

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

Grupo 1: Grupo de control

Grupo 2: Grupo de exposición (SD 35)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

europea dentro de los parámetros de este estudio.

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

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

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

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

La exposición fue 4 semanas después de la vacunación. En este momento, sólo 2 animales en el grupo de vacunas de título bajo, 1 animal en el grupo de vacunas de título medio y 3 animales en el grupo de vacunas de título alto fueron positivos por qPCR para PRRS en suero.

El grupo de control de exposición presentó lesiones pulmonares significativas típicas del PRRS después de la exposición. Después de la exposición, los grupos de vacunas de títulos bajo, medio y alto tuvieron medianas de las puntuaciones de lesión pulmonar totales de 0,13%, 0,55% y 0,40%, respectivamente; mientras que el grupo de control de exposición tuvo una

mediana de la puntuación de lesión pulmonar total de 33,40%. Las medianas de las puntuaciones de lesión pulmonar totales para los tres grupos de títulos de vacunas fueron significativamente inferiores a las del grupo de control de exposición ($p<0,0001$). No hubo diferencias estadísticas entre los grupos de títulos de vacunas ($p\geq0,1484$) para las puntuaciones de lesión pulmonar total. El grupo de control negativo tuvo una mediana de la puntuación de lesión pulmonar total de 0,00%.

En los días de estudio 31, 35 y 38 del periodo después de la exposición, los tres grupos de títulos de vacunas tuvieron significativamente menos viremia que el grupo de control de exposición (**$p\leq0,0093$**). No hubo diferencias estadísticas entre los grupos de títulos de vacunas para viremia después de la exposición, excepto en D35, cuando el grupo de vacunas de título alto presentó significativamente menos viremia que el grupo de vacunas de título medio ($p=0,0442$). Los lechones de control negativo fueron negativos para viremia en D31, D35 y D38.

Clínicamente, la gravedad ($p\leq0,0082$) y la frecuencia ($p\leq0,0268$) de la tos fue menos grave en los tres grupos de títulos de vacunas que en el grupo de control de exposición durante el periodo después de la exposición; Día 29 - Día 38. La fiebre fue más importante en el grupo de control de exposición que en los tres grupos de títulos de vacunas después de la exposición. El ADWG fue significativamente mayor para los tres grupos de títulos de vacunas en comparación con el grupo de control de exposición ($p\leq0,0027$).

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

Diseño general del estudio:

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

Tabla 2.1 Grupos de tratamiento

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

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

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

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

Viremia del PRRS: El conjunto de muestras de suero recogido en los días 0, 7, 14, 21, 28, 31, 35 y 38 y mantenido a -70 ± 10ºC se probó para ARN del PRRSv por qPCR (Apéndice 1, Anexo 7). Los resultados se informaron como n.d. (no detectado), positivo (detectado el PRRSv

EU, pero no cuantificable, GE/ml (equivalente de genoma) = < 3,3 log) o un valor informado (log GE/ml). Para fines estadísticos, a “no detectado” se le asignó un valor de 0 log GE/ml y a un valor “positivo” se le asignó un valor de 3,0 log GE/ml.

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

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

Tabla 2.2 Sistema de puntuación de observaciones clínicas

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

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

Las temperaturas rectales se recogieron de D27 a D38.

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

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

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

RESULTADOS

Puntuación de lesión pulmonar total después de la exposición: Un resumen de grupo mínimo, máximo, mediana, intervalo de confianza de 95%, rango de Q y media para las puntuaciones de lesión pulmonar totales mostró que los grupos de vacunas de títulos bajo, medio y alto tuvieron medianas de las puntuaciones de lesión pulmonar totales de 0,13%, 0,55% y 0,40%, respectivamente; mientras que el grupo de control de exposición tuvo una mediana de la puntuación de lesión pulmonar total de 33,40%. Las medianas de las puntuaciones de lesión pulmonar totales para los tres grupos de títulos de vacunas fueron significativamente inferiores a las del grupo de control de exposición ($p<0,0001$). No hubo diferencias estadísticas entre los grupos de títulos de vacunas ($p\geq0,1484$) para las puntuaciones de lesión pulmonar total. El grupo de control negativo tuvo una mediana de la puntuación de lesión pulmonar total de 0,00%.

Para uno de los animales (grupo de vacunas de título alto) se observó neumonía intersticial

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

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

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

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

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

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

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

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

Aunque no se detectaron diferencias entre los grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición para la frecuencia de tejidos de pulmón positivos por qPCR, las

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

Puntuaciones de observaciones clínicas después de la exposición: La respiración y el comportamiento anormal no fueron graves después de la exposición, como se demuestra por las medianas de puntuaciones clínicas máximas de 0 (una puntuación de 0 representó respiración normal o comportamiento normal) para los cinco grupos. Además, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición para tanto la respiración como el comportamiento anormal ($p \geq 0,0996$).

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

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

La frecuencia de la respiración o el comportamiento anormal durante al menos un día de D29 a D38 fue baja para todos los grupos. De hecho, no se observó respiración anormal en grupos de vacunas de títulos bajo y medio de D29 a D38. El grupo de vacunas de título alto tuvo uno de 15 (7%) lechones y el grupo de control de exposición tuvo 3 de 14 (21%) lechones con

respiración anormal. No se observó comportamiento anormal en ningún grupo de títulos de vacunas; mientras que 2 de 14 (14%) lechones del control de exposición mostraron comportamiento anormal durante al menos un día después de la exposición. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos de títulos de vacunas y el grupo de control de exposición para la frecuencia de respiración o comportamiento anormal durante al menos un día después de la exposición ($p \geq 0,0996$). No se observó respiración o comportamiento anormal en el grupo de control negativo.

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

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

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

para el grupo de control negativo fueron 0,00.

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

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

Temperaturas rectales después de la exposición: Las temperaturas rectales medias por grupo máximas para grupos de vacunas de títulos bajo, medio y alto entre D29 y D38 fueron 40,20ºC (D33), 40,33ºC (D35) y 40,20ºC (D37), respectivamente. La temperatura rectal media por grupo máxima para el grupo de control de exposición y el grupo de control negativo entre D29 y D38 fueron 40,51ºC (D33) y 39,95ºC (D33), respectivamente.

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

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

El grupo de vacunas de título alto tuvo una temperatura rectal significativamente menor que el

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

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

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

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

Evaluaciones clínicas después de la vacunación: En el grupo de vacunas de bajo título, un lechón (1735) se anotó como delgado de D0 a D10. Además, un lechón que empezó en D6 se anotó como delgado durante 16 días, presentó tos durante 2 días y depresión durante 9 días, y se sacrificó en D21 por motivos de protección animal debido a una mala salud. El lechón 1727 tuvo una puntuación de lesión pulmonar total de 10,8%. Como este valor se determinó antes de la exposición, no se incluyó en el análisis de lesión pulmonar total después de la exposición. Además, se observaron áreas de consolidación rojas/púrpuras en las áreas craneoventrales de

los pulmones, el hígado estaba pálido y los riñones tenían múltiples áreas rojas/púrpuras en la pelvis renal. El patólogo observó infiltración grasa en los lóbulos centrales en el hígado, comúnmente observada en casos de equilibrio energético negativo y consiguiente lipólisis. No se observaron otras lesiones en las secciones de hígado, riñón y pulmón. El tejido de pulmón fue positivo para PRRS EU por PCR. No se detectó crecimiento para el cultivo bacteriano rutinario.

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

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

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

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

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

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

Viremia del PRRS después de la vacunación: Se determinaron resultados individuales de la viremia del PRRS después de la vacunación. Para fines estadísticos, a un resultado “no detectado” se le asignó un valor de 0 log GE/ml y a un valor “positivo” se le asignó un valor de 3,0 log GE/ml. Todos los grupos fueron negativos para viremia del PRRS en D0. Se evaluaron los datos de los títulos de viremia por grupo (qPCR) – D7 a D28 después de la vacunación (log GE/ml). Los lechones en los tres grupos de títulos de vacunas alcanzaron viremia media pico en D7, después de lo cual los niveles de los títulos para los tres grupos cayeron lentamente antes de exposición (SD 28). En cambio, el grupo de control de exposición y el grupo de control negativo siguieron siendo negativos para viremia durante la fase del estudio antes de la exposición. De los resultados de las pruebas por grupo (valores de p) para los resultados de qPCR en D7, D14, D21 y D28 se observó que los tres grupos de títulos de vacunas tuvieron significativamente mayores medianas de valores de qPCR que el grupo de control de exposición para D7-D28 ($p\leq0,0159$). El grupo de vacunas de título medio tuvo un valor medio de qPCR significativamente mayor que el grupo de vacunas de título bajo ($p=0,0193$); por lo demás no se detectaron diferencias para los valores medios de qPCR entre grupos de vacunas antes de la exposición ($p\geq0,0594$).

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

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

- La ausencia de cualquier brote de bioseguridad durante el estudio y la confirmación de la susceptibilidad de los lechones al PRRS confirmó la validación del estudio y su idoneidad para la interpretación

- La enfermedad clínica del PRRS sustancial fue evidente en el grupo de control de exposición, validándose así este modelo de exposición como una herramienta de laboratorio adecuada para evaluar la eficacia de la vacuna contra el PRRS y más específicamente la MID de MLV contra el 94881 del PRRS

- Los tres niveles de dosis de MLV contra el 94881 del PRRS se asociaron a una reducción significativa en lesiones pulmonares, además de a una reducción significativa en viremia después de la exposición, la carga vírica en tejidos de pulmón, tos, puntuaciones de observaciones clínicas totales, fiebre y ADWG

- La MID de MLV contra el 94881 del PRRS como se determina en este estudio está asociada al nivel de vacuna de título bajo de 1 x $10^{2,77}$ $TCID_{50}$/ml basándose en una reducción relevante en lesiones pulmonares macroscópicas para los tres niveles de títulos en comparación con los controles de exposición después de recibir una exposición del PRRS derivado de europeo heterólogo virulento.

Otra descripción de los resultados

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

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

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

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

En este estudio se usó un número seleccionado, por ejemplo, catorce cerdas preñadas sanas de una piara negativa para el PRRSV confirmada (probada virológicamente y serológicamente). Las cerdas afrontaron un primer o segundo parto y se confirmó que estaban preñadas en el momento de la vacunación/infección por exposición en el día 94 de gestación. Las cerdas se dividieron en tres grupos de tratamiento. El primer grupo se trató con una dosis comercial de Porcilis™ PRRS de 2 ml que contenía al menos $10^{4,0}$ $TCID_{50}$ por administración intramuscular en el día 94 de gestación. El grupo de control de exposición (Grupo 2) recibió una dosis de $10^{4,72}$ $TCID_{50}$ en 2 ml de medio de cultivo celular de la cepa aislada en campo europea patógena (pase 4) intranasalmente. El Grupo 3 se vacunó con una dosis de 2 ml que contenía $10^{7,6}$ $TCID_{50}$ i.m. de la MLV del PRRS que contenía la cepa del PRRS atenuada depositada con el nº de acceso de ECACC 11012502 el 25 de enero de 2011 siete días antes de la inseminación y se expuso a la cepa aislada en campo europea (pase 4) ($10^{4,72}$ $TCID_{50}$ en 2 ml de medio de cultivo celular i.n.) en el día 94 de gestación.

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

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

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

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

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

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

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

Se recogieron macrófagos alveolares porcinos usando un procedimiento descrito por

Wensvoort y col. (Wensvoort, G. y col. Vet. Quat. 1991, 13:121-130) y se modificó del siguiente modo: cada lóbulo del pulmón se infundió con 50-100 ml de PBS y posteriormente se masajeó durante 3 a 5 min. Entonces, el líquido se rescató del lóbulo y se pasó por un filtro de gasa. Este procedimiento se repitió hasta que el líquido de lavado fue claro. El líquido de lavado recogido se centrifugó a 500 g durante 15 min a temperatura ambiente. El sedimento se lavó en PBS y las alícuotas de $1x10^7$ células en 50% de RPMI 1640 (Biochrom), 40% de SBF y 10% de DMSO se congelaron a -196ºC. Para el uso posterior, los PAM se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con 10% de SBF y antibióticos.

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

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

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

Ensayo de inmunofluorescencia: Las células se fijaron a -20ºC durante 15 min usando acetona:metanol (1:1) frío en hielo y después se secaron al aire. Después de la rehidratación

en PBS, las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal específico del PRRSV SDOW17 (Rural Technologies Inc., EE.UU.) diluido 1:1000 en PBS durante 1 hora. Después de 3 lavados con PBS, las células se incubaron con anticuerpo secundario de cabra conjugado con anti-FITC de ratón (Dianova, Hamburgo, Alemania) (1:150 en PBS) durante otra hora. Después de 3 lavados finales con PBS, las células se recubrieron con disolución de glicerina:PBS (1:1) y se sometieron a microscopía de inmunofluorescencia.

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

Una RT-nPCR de diagnóstico a modo de ejemplo puede llevarse a cabo con el kit Titan One Tube (Roche Molecular Biochemicals) del siguiente modo: [5 ml de preparación de ARN total, 1* tampón de RT-PCR, dNTPs 0,4 mM, 20 pmoles de cebadores PLS y PLR, ditiotreitol 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, 2,5-5 U de RNasin (Promega Ltd), 1-2,5 U de mezcla de enzimas, ajustada a un volumen final de 25 ml con agua destilada tratada con DEPC]. Las condiciones de ciclado rutinarias usadas pueden ser: 45ºC durante 1 hora, 94ºC durante 2 min y 30 ciclos de 94ºC durante 30 s, 58ºC durante 45 s y 68ºC durante 45 s, etapa de extensión final a 68ºC durante 5 min. La reacción de PCR anidada se llevó a cabo con Qiagen Taq (Qiagen AG) del siguiente modo: [1 ml de producto de RT-PCR, 1*tampón de PCR, 10 ml de disolución Q, $MgCl_2$ 3,5 mM, dNTPs 0,3 mM, 20 pmoles de cada uno de los cebadores EU-7-n-s y EU-7-n-as, 2,5 U de Taq polimerasa, ajustada a un volumen final de 50 ml con agua destilada]. Las condiciones de ciclado fueron del siguiente modo: 7 ciclos a 94ºC durante 1 min, 58ºC durante 1 min y 72ºC durante 1 min, seguido de 30 ciclos a 94ºC durante 1 min y 70ºC durante 1,5 min (sin etapa de hibridación), etapa de extensión final a 70ºC durante 5 min.

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

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

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

Para la determinación de secuencias del genoma de longitud completa del virus de siembra maestro 94881 se realizó un número total de 1 transcripción inversa, 17 PCR externas y 58 PCR internas, resultando 40 productos de PCR que se usaron para la secuenciación. En el caso de 94881, pase 5, se realizaron 1 transcripción inversa, 17 PCR externas y 67 PCR internas, resultando 40 productos de PCR, por tanto, se usó para la secuenciación.

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

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

se realizaron alineamientos entre MSV 94881 y su cepa parental, pase 5.

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

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

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

NTR: región sin traducir

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

** = La cepa aislada del MSV 94881 muestra dos deleciones en ORF 1a, una con 138

nucleótidos y una con 3 nucleótidos, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos completas del virus de referencia LV se usaron para la homología y los cálculos de identidad, las deleciones se evalúan como desviaciones. La longitud del gen vírico correspondiente de LV es 7191 nucleótidos y la poliproteína correspondiente de 2396 aminoácidos, los cálculos de homología genética y la identidad de aminoácidos se refieren a los números de 7191 nucleótidos y 2396 aminoácidos, respectivamente.
*** = Sólo se compararon 44 nucleótidos entre el virus de Lelystad y el MSV 94881. Los 83 nucleótidos restantes, localizados en la dirección 3', no se habían determinado.

La comparación de secuencias de las secuencias de nucleótidos de longitud completa del 94881 virus de siembra maestro y la cepa parental 94881, pase 5, revelaron un número total de 26 intercambios de nucleótidos entre ambos. Los intercambios de nucleótidos se distribuyeron del siguiente modo: 15 en ORF 1a, 4 en ORF 1b, 2 en ORF 2, ninguno en ORF 3, 1 en ORF 4, 3 en ORF 5, 1 en ORF 6 y ninguno en ORF 7. Estos intercambios de nucleótidos produjeron un número total de 14 intercambios de aminoácidos que se distribuyeron del siguiente modo: 8 en la poliproteína 1a, 1 en la poliproteína 1b, 1 en la glicoproteína 2, ninguno en la glicoproteína 3, 1 en la glicoproteína 4, 2 en la glicoproteína 5 y 1 en la proteína de la matriz. Ambas cepas mostraron las mismas deleciones en comparación con el virus de Lelystad en ORF 1a. Una disposición de todos los intercambios de nucleótidos e intercambios de aminoácidos resultantes que incluyen las posiciones en los genes víricos y las proteínas correspondientes se muestra en detalle en la Tabla 4.2.

Ejemplo 5 – Cultivo del virus depositado y MSV

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

94881 parental: Es un virus de un genotipo que es PRRSV tipo 1, ya que tal es un PRRSV de genotipo europeo. El virus tiene un huésped porcino. El virus parental depositado en 11012501 se depositó a un título de 5,81 log10 $TCID_{50}$/ml. Las células huésped para la propagación de virus son células MA 104. Estas células se cultivan en medio esencial mínimo (MEM) con 3,7 g/l de bicarbonato sódico que contiene 6% de suero bovino fetal irradiado a 37 ± 1ºC. Las células se siembran en placa en matraces T (75 cm^2) con una densidad de siembra de 2 x 10^4 a

2 x 10^5 células/cm^2 y se cultivan durante 3 a 7 días hasta 100% de confluencia antes del pase. Para el crecimiento del virus, el virus se añade a las células a una MOI de 0,001-0,01 en matraces T. Las células infectadas están a una confluencia de aproximadamente 80-100% normalmente 1-3 días después de la siembra de las células. Las células infectadas se cultivan a 37 ± 1ºC durante 3-10 días después de la infección y luego se recoge el virus. La cosecha se realiza cuando las células de la monocapa presentan aproximadamente 80-100% de efecto citopático (CPE) 3-10 días después de la infección. El sobrenadante de cultivos de tejido de MA104 infectado (medio gastado + PRRSV de un cultivo con 80-100% de CPE) se recoge y contiene el virus que se ha propagado. Este sobrenadante puede almacenarse a -70ºC/-80ºC durante varios meses hasta su uso. El virus se evalúa para $TCID_{50}$ con el cálculo de Spearman y Kaerber para determinar log10 $TCID_{50}$/ml de muestra.

Virus de siembra maestro (MSV) 94881 para vacuna (pase alto): Es un virus de un genotipo que es PRRSV tipo 1, ya que tal es un PRRSV de genotipo europeo. El virus tiene un huésped porcino. El MSV depositado en 11012502 se depositó a un título de 6,43 log10 TCID50/ml. Las células huésped usadas para la propagación del MSV son células MA 104. Estas células se cultivan en medio esencial mínimo (MEM) con 1,4 g/l de bicarbonato sódico y que contiene 10% de suero bovino fetal irradiado a 36 ± 2ºC. Las células se siembran en placa en matraces T (75-150 cm^2) o botellas rotatorias de 850 cm^2 con una densidad de siembra de 1 x 10^4 a 1 x 10^5 células / cm^2 y se cultivan durante 3 a 7 días hasta 100% de confluencia antes del pase. Para el crecimiento del virus, el virus se añade a las células a una MOI de 0,001-0,01 en matraces T o botellas rotatorias. Las células infectadas están a una confluencia de aproximadamente 80-100% normalmente 1-3 días después de la siembra de las células. Las células infectadas se cultivan a 36 ± 2ºC durante 3-14 días después de la infección y luego se recoge el virus. La cosecha se realiza cuando las células de la monocapa presentan aproximadamente 80-100% de efecto citopático (CPE) 3-14 días después de la infección. El sobrenadante de cultivos de tejido de MA104 infectado (medio gastado + PRRS de un cultivo con 80-100% de CPE) se recoge y contiene el virus que se ha propagado. Este sobrenadante puede almacenarse a 2-8ºC durante 5-10 días, -70ºC durante varios meses hasta su uso. El MSV se evalúa para $TCID_{50}$ con el cálculo de Reed y Muench para determinar log10 TCID50/ml de muestra.

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

ORF	Nº de nucleótidos que se desvían	Posición en el gen vírico	Intercambio (nn) de la cepa parental a MSV	Sinónimo / no sinónimo	Nº de aminoácidos que se desvían	Posición en la proteína vírica	Intercambio (aa) de la cepa parental a MSV
1a	15	309	C a T	sinónimo	8	---	---
		753	G a T	no sinónimo		251	E a D
		1474	G a A	no sinónimo		492	V a I
		1789	G a A	no sinónimo		597	V a I
		2094	C a T	sinónimo		---	---
		2987	T a C	no sinónimo		996	L a S
		3034	A a G	no sinónimo		1012	T a A
		3065	A a G	no sinónimo		1022	E a G
		3736	A a G	no sinónimo		1246	T a A
		3966	C a T	sinónimo		---	---
		4101	T a C	sinónimo		---	---
		5803	C a T	no sinónimo		1935	L a F
		6354	T a G	sinónimo		---	---
		6519	C a T	sinónimo		---	---
		6588	T a C	sinónimo		---	---
1b	4	591	T a C	sinónimo	1	---	---
		1833	C a T	sinónimo		---	---
		1932	C a T	sinónimo		---	---
		3682	G a A	no		1228	V a I

ORF	Nº de nucleótidos que se desvían	Posición en el gen vírico	Intercambio (nn) de la cepa parental a MSV	Sinónimo / no sinónimo	Nº de aminoácidos que se desvían	Posición en la proteína vírica	Intercambio (aa) de la cepa parental a MSV
				sinónimo			
2	2	13	C a T	no sinónimo	1	5	H to Y
		195	C a T	sinónimo		---	---
3	0	---	---	---	0	---	---
4	1	529	T a C	no sinónimo	1	177	F a L
5	3	109	A a G	no sinónimo	2	37	N a D
		364	C a T	no sinónimo		122	L a F
		570	C a T	sinónimo		---	---
6	1	214	C a T	no sinónimo	1	72	L a F
7	0	---	---	---	0	---	---

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

Resumen

El objetivo de este estudio de exposición a vacunación fue evaluar la dosis de inmunización mínima (MID) de la cepa aislada 94881 derivada de europea de la vacuna del síndrome reproductor y respiratorio porcino, virus vivo modificado, código 19T1.U_ (MLV contra el 94881 del PRRS) en cerdas jóvenes. Se administraron dos niveles de títulos diferentes a cerdas jóvenes seronegativas para PRRS aproximadamente 28 días antes del celo (Día 0; D0), las cerdas jóvenes se expusieron a una cepa aislada europea heteróloga del PRRSv a aproximadamente 90 días de gestación (D118) y las cerdas jóvenes se evaluaron para el número total de lechones nacidos vivos o porcentajes de lechones nacidos vivos y lechones destetados a los 20 días de edad para determinar la MID. En el tiempo de exposición en el Día 118 (D118), el grupo de control de exposición consistió en 8 cerdas jóvenes preñadas (Grupo

1, placebo), el grupo de título bajo consistió en 8 cerdas jóvenes preñadas (Grupo 2, 1 x $10^{2,43}$ $TCID_{50}$/dosis), el grupo de título alto consistió en 8 cerdas jóvenes preñadas (Grupo 3, 1 x $10^{3,90}$ $TCID_{50}$/dosis) y el grupo de control negativo consistió en 5 cerdas jóvenes preñadas (Grupo 4, placebo, no expuesto).

Tanto los grupos de título bajo como de título alto se asociaron a mayores porcentajes de lechones vivos por camada en el parto (**P≤0,0455**) y mayores porcentajes y números de lechones vivos por camada en el destetamiento (**P≤0,0203**) en comparación con el grupo de control de exposición.

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

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

En conclusión, el objetivo del estudio se cumplió y los datos de este estudio establecen la MID de MLV contra el 94881 del PRRS en cerdas jóvenes como 1 x $10^{2,43}$ $TCID_{50}$/2 ml. Además, este estudio establece la duración de la inmunidad (DOI) en cerdas jóvenes en aproximadamente 4 meses.

OBJETIVO(S)/FIN DEL ESTUDIO

El objetivo de este estudio de exposición a vacunación era evaluar la dosis de inmunización mínima (MID) de la cepa aislada 94881 derivada de europea de la vacuna del síndrome reproductor y respiratorio porcino, virus vivo modificado, código 19T1.U_ (MLV contra el 94881 del PRRS), a dos niveles de títulos diferentes (Grupo 2, título bajo; Grupo 3, título alto), administrada a cerdas jóvenes seronegativas para PRRS antes del celo para proporcionar mayores porcentajes de lechones nacidos vivos y lechones destetados a los 21 días de edad, tras la exposición de cerdas jóvenes a una cepa aislada europea heteróloga del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSv) a aproximadamente 90 días de gestación. El criterio primario para satisfacer este objetivo fue que uno o ambos grupos de vacunas debían demostrar porcentaje o número relevantemente mayor de lechones nacidos vivos y lechones destetados a los 20 días de edad (DOF +20) en comparación con el grupo de control de exposición (Grupo 1).

Otros parámetros analizados entre los grupos de vacunas y el grupo de control de exposición incluyeron evaluaciones clínicas de cerdas jóvenes después de la vacunación, serología del PRRS de cerdas jóvenes, viremia de cerdas jóvenes, observaciones clínicas de cerdas jóvenes, viremia de lechones, lechones totales por camada, lechones sanos vivos por camada, lechones vivos débiles por camada, momias por camada, lechones nacidos muertos por camada, lechones aplastados/mortalidad por camada, observaciones clínicas de lechones y aumento de peso diario promedio (ADWG) de lechones. Estos parámetros se analizaron como parámetros de apoyo y no sirvieron de parámetros primarios para satisfacer el objetivo del estudio.

PROGRAMA DE ACONTECIMIENTOS

Tabla 6.1 Programa de acontecimientos de cerdas jóvenes

Día(s) de estudio	**Fechas**	**Acontecimiento clave del estudio**
-2 ó -1	20-Jul-2010 a 21-Jul-2010	Examen de salud
-1 a 21	21-Jul- 2010 a 12-Ago-2010	Grupos 1-4: Evaluaciones clínicas diarias
0	22-Jul-2010	Grupos 1-4: Recogida de sangre; vacunación de

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

*DOF = Día del parto

Tabla 6.2 Programa de acontecimientos de lechones

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

DISEÑO DEL ESTUDIO

Tabla 6.3 Diseño del estudio

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

CRITERIOS DE CEGADO

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

MATERIALES

PRODUCTO VETERINARIO EN INVESTIGACIÓN (IVP) Y PRODUCTO DE CONTROL (CP)

Tabla 6.4 Productos veterinarios en investigación (IVP)

Nombre del producto genérico:	Síndrome reproductor y respiratorio porcino, virus vivo modificado
Cepa aislada:	Cepa aislada 94881
Formulación:	El protocolo de lotes del fabricante (MBP) para la vacuna MLV contra el 94881 del PRRS, lote 390-005 (torta), se presenta en el Apéndice 1. El MBP para el diluyente con adyuvante de carbopol estéril, lote 808-002 (diluyente), se presenta en la Sección 15.1, Apéndice 1. D0 justo antes de la vacunación, BIVI-Ames reconstituyó/diluyó la vacuna MLV contra el 94881 del PRRS, lote 390-005, con diluyente con adyuvante de carbopol estéril, lote 808-002, para formular los dos IVP. IVP nº 1 se formuló a un nivel de título elegido como diana de aproximadamente 1 x $10^{3,0}$ $TCID_{50}$/2 ml y IVP nº 2 se formuló a un nivel de título elegido como diana de aproximadamente 1 x $10^{4,5}$ $TCID_{50}$/2 ml. Un volumen adecuado de cada IVP se formuló para la vacunación y pruebas.
Lote de IVP / nº de serie:	IVP nº 1: N270-142 IVP nº 2: N270-143
Fabricante:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506
Fecha de caducidad:	Se asignó una fecha de caducidad del 22 de julio de 2010 a cada IVP sólo para fines de estudio.
Requisitos de almacenamiento:	IVP rehidratado/diluido se almacenó a 2-8ºC o sobre hielo
Pruebas:	La MLV contra el 94881 del PRRS, serie 390-005, y el diluyente con adyuvante de carbopol estéril, lote 808-002, fueron probados por BIVI-QC. Al principio y al final del procedimiento de vacunación se contactó con BIVI-Ames. BIVI-Ames probó antes y después de la vacunación alícuotas de cada IVP para el título de virus según el Procedimiento de títulos de PRRSv (Sección 15.1).

Resultados de las pruebas:	Los resultados de las pruebas para la MLV contra el 94881 del PRRS, serie 390-005, y para el diluyente con adyuvante de carbopol estéril, lote 808-002, fueron satisfactorios. IVP nº 1 tuvo un título promedio de 1 x $10^{2,43}$ $TCID_{50}$/2 ml y IVP nº 2 tuvo un título promedio de 1 x $10^{3,90}$ $TCID_{50}$/2 ml
Transferencia de IVP:	Dos viales que contenían 35 ml de cada IVP se transfirieron al sitio de estudio en D0 justo antes de la vacunación.
Retención de IVP:	Una muestra de retención de cada IVP se guarda actualmente a -70 ± 10ºC en BIVI-Ames hasta que se haya firmado el informe final.

Tabla 6.6 Producto de control (CP)

Nombre del producto genérico:	Placebo
Formulación:	La producción de BIVI produjo producto de placebo liofilizado que contenía material inerte que consistía en la serie de vacuna sin MLV contra el 94881 del PRRS (lote N240-191-062409) En D0, BIVI-Ames reconstituyó el lote N240-191-062409 con diluyente con adyuvante de carbopol estéril, lote 808-002, para formular el CP, lote nº 270-141.
Fabricante:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506, EE.UU.
Número de lote:	N270-141
Fecha de caducidad:	Se asignó una fecha de caducidad del 22 de julio de 2010 al CP sólo para fines de estudio.
Condiciones de almacenamiento:	Vacuna liofilizada: 2-8ºC CP rehidratado: 2-8ºC o sobre hielo
Pruebas:	CP se probó por BIVI-QC para la esterilidad según EP según Resumen especial nº 96
Resultados de las pruebas:	Se determinó que CP era estéril
Transferencia de CP:	Dos viales que contenían 50 ml cada uno de CP se transfirieron al sitio de estudio en D0 justo antes de la vacunación.
Retención de CP:	CP sólo se formuló para el estudio y no se retuvo.

MATERIAL DE EXPOSICIÓN

Tabla 6.7 Material de exposición

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

Retención del material de exposición:	El material de exposición sólo se formuló para este estudio y no se retuvo.

TRATAMIENTOS ADICIONALES

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

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

TRATAMIENTOS

JUSTIFICACIÓN DE LA DOSIFICACIÓN

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

PAUTA DE DOSIFICACIÓN

En D0, una persona que no recogía los datos del estudio administró cada IVP o CP a cada cerda joven respectiva IM en la región derecha del cuello usando una jeringuilla Luer-lock de 3,0 ml estéril y una aguja de 18g x 1 pulgada (2,54 cm) estéril. La pauta de dosificación se muestra a continuación en la Tabla 6.8.

Tabla 6.8 Pauta de dosificación

Grupo	Número	Tratamiento	Dosis/vía	Día de estudio
1	28	CP	2,0 ml IM	D0
2	28	IVP nº 1 (dosis de título bajo)	2,0 ml IM	D0
3	28	IVP nº 2 (dosis de título alto)	2,0 ml IM	D0
4	10	CP	2,0 ml IM	D0

PROCEDIMIENTOS Y PRECAUCIONES PARA EL PERSONAL DEL ESTUDIO

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

INFORMACIÓN SOBRE LOS ANIMALES

DETALLES DE LOS ANIMALES DEL ESTUDIO

Tabla 6.9 Información sobre los animales

Fuente:	Wilson Prairie View Farms N5627 Highway DD Burlington, WI 53105
Número de cerdas jóvenes:	94
Fecha de llegada:	Las cerdas jóvenes llegaron a las instalaciones de Veterinary Resources, Inc. en dos envíos el 15 de julio de 2010 (D-7) y el 20 de junio de 2011 (D-2).
Identificación:	Oreja etiquetada individualmente con un único número
Especie:	Porcina
Raza:	Cruzada comercial
Sexo:	Hembras

Intervalo de edad:	Aproximadamente 8 meses de edad en D0	
Propietario de los animales de prueba:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.	
Estado fisiológico:	Todas las cerdas jóvenes fueron seronegativas por ELISA para PRRS en D0. Las cerdas jóvenes seleccionadas para la asignación al estudio fueron observadas por el investigador del estudio en D-2 o D-1 y determinó que estaban en buen estado de salud y nutricional.	
Resultados del embarazo:	Las cerdas jóvenes se comprobaron para el embarazo en D84.	
Asignaciones de cerdas jóvenes a grupos en D0	Grupo 1 (n=28): 1, 3, 5, 6, 8, 11, 15, 18, 19, 34, 35, 39, 40, 52, 54, 68, 79, 82, 88, 90, 95, 96, 98, 101, 102, 107, 109 y 110	Grupo 2 (n=28): 12, 26, 31, 32, 41, 47, 49, 56, 58, 59, 60, 64, 67, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 85, 89, 93, 94, 100, 103 y 104
	Grupo 3 (n=28): 2, 7, 14, 22, 23, 25, 27, 28, 30, 33, 36, 42, 46, 48, 51, 53, 57, 61, 62, 65, 66, 80, 84, 86, 91, 92, 105 y 106	Grupo 4 (n=10): 4, 10, 13, 16, 17, 20, 21, 24, 29 y 108
Nº de cerdas jóvenes a grupos restantes en el estudio en D118	Grupo 1 (n=16): 1, 6, 11, 18, 19, 40, 54, 68, 79, 82, 88, 95, 96, 98, 102 y 107	Grupo 2 (n=16): 12, 26, 31, 32, 41, 47, 49, 58, 64, 67, 72, 85, 89, 93, 100 y 104
	Grupo 3 (n=16): 7, 14, 23, 27, 33, 36, 46, 48, 57, 61, 62, 65, 66, 84, 92 y 106	Grupo 4 (n=5): 4, 13, 16, 17 y 108

CRITERIOS DE INCLUSIÓN/EXCLUSIÓN

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

ELIMINACIÓN DESPUÉS DE LA INCLUSIÓN DE CERDAS JÓVENES

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

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

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

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

MANIPULACIÓN Y ALOJAMIENTO DE LOS ANIMALES

Alojamiento de los animales

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

separadas, previniéndose la contaminación cruzada de aire entre habitaciones. Cada habitación se limpió y se desinfectó antes de uso para este estudio. El personal de los servicios de animales se duchó y se puso ropas limpias antes de entrar en cada habitación.

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

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

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

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

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA

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

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

CRITERIOS PARA UNA PRUEBA VÁLIDA

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

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

PARÁMETROS DE RESULTADOS PRIMARIOS

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

9.2.1 Porcentaje de lechones vivos en el nacimiento por cerda joven

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

Tabla 6.10 Categorías del resultado del parto

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

Lechones vivos por camada en DOF +20

Los lechones se observaron para signos clínicos de enfermedad como se explica más adelante en la Tabla 6.11 de DOF+1 a DOF+20. Las observaciones se realizaron por el investigador del

estudio o representantes y se registraron en el cuaderno de recogida de datos de observaciones clínicas.

Tabla 6.11 Sistema de puntuación de observaciones clínicas

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

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

PARÁMETROS DE APOYO

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

Evaluaciones diarias de las cerdas jóvenes

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

Serología del PRRS en cerdas jóvenes

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

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

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

Observaciones clínicas de cerdas jóvenes después de la exposición

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

Viremia del PRRS en lechones

Se recogió sangre venosa completa de lechones en DOF 0, DOF+7, DOF+13 y DOF+20, o

cuando un lechón se encontró muerto. Se prefirió la recogida de sangre pre-colostral de lechones recién nacidos, pero no fue obligatorio. Si no pudo cogerse la sangre pre-colostral, fue permisible la sangre peri-natal en el plazo de 12 horas desde el parto. Las muestras no recogidas antes de la primera lactancia se marcaron como “peri-natales” y se guardaron separadas de las muestras pre-colostrales.

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

Aumento de peso diario promedio del lechón

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

Cuantificación del virus del PRRS en tejido de pulmón

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

Los recipientes Whirlpak® y con formalina se etiquetaron apropiadamente con el número de animal, número de estudio, fecha de muestreo, día de estudio, tipo de muestra y si las muestras fueron del lado izquierdo, lado derecho o ambos. Las muestras en Whirlpak® se almacenaron a -70 ± 10ºC y las muestras en 10% de formalina se almacenaron a temperatura ambiente hasta que se llevaron a BIVI-Ames. Un cuaderno de recogida de datos de la entrega

de especímenes completo se incluyó con cada envío de muestras. En BIVI-Ames, las muestras en Whirlpak® se almacenaron a -70 ± 10ºC hasta que se enviaron de BIVI-Ames a Alemania, y las muestras fijadas en formalina se almacenaron en BIVI-Ames a temperatura ambiente.

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

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

ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

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

PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS

UNIDAD EXPERIMENTAL

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

ALEATORIZACIÓN

Noventa y cuatro (94) cerdas jóvenes seronegativas para PRRS de un conjunto de 107 cerdas jóvenes elegibles para la prueba se asignaron aleatoriamente a uno de los 4 grupos antes de D0. Los Grupos 1-3 estuvieron cada uno constituido por 28 cerdas jóvenes. El Grupo 4 estuvo constituido por 10 cerdas jóvenes. Para el Grupo 1, el nº 45 y 55 fueron excluidos por el

gerente de la granja antes del envío debido a motivos de salud y se sustituyeron por dos cerdas jóvenes adicionales, el nº 15 y 18, respectivamente. Para el Grupo 3, la cerda joven nº 44 fue excluida por el gerente de la granja antes del envío debido a motivos de salud y se sustituyó por la cerda joven adicional nº 25.

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

Todos los procedimientos de aleatorización fueron realizados por un bioestadístico.

ANÁLISIS

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

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

Variables para la evaluación estadística del estudio:

Variables primarias

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

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

Variables de apoyo

Evaluaciones clínicas de cerdas jóvenes después de la vacunación

Serología del PRRS en cerdas jóvenes

Viremia de cerdas jóvenes

Observaciones clínicas de cerdas jóvenes

Viremia de lechones

Rendimiento reproductivo
Observaciones clínicas de lechones
Aumento de peso diario promedio (ADWG) de lechones

Hipótesis que van a probarse y suposiciones hechas:

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

Detalles sobre las manipulaciones y evaluación de datos:

Evaluaciones clínicas de cerdas jóvenes después de la vacunación

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

Observaciones clínicas de cerdas jóvenes después de la exposición

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

Serología de cerdas jóvenes

Se generaron tablas de frecuencias de resultados “positivos” por ELISA en los días de estudio 7, 14, 21, 56, 84, 118, 125, 132 (antes del parto) y DOF+0, DOF+7, DOF+13 y DOF+20. Las diferencias entre los grupos de control de exposición y los grupos de vacunas se probaron por la prueba exacta de Fisher.

Viremia en cerdas jóvenes

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

Rendimiento reproductivo

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

Viremia en lechones

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

Peso corporal y aumento de peso diario promedio de lechones

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

Observaciones clínicas de lechones

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

RESULTADOS

RENDIMIENTO REPRODUCTIVO DE CERDAS JÓVENES

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

Los porcentajes medios de lechones sanos vivos por camada fueron 41,4%, 65,8%, 67,9% y 93,0% para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. Los grupos de título bajo y de título alto tuvieron significativamente mayores porcentajes de lechones sanos vivos por camada en el parto en comparación con el grupo de control de exposición (**P≤0,0138**). El número medio de lechones sanos vivos por camada en el parto fueron 4,9, 7,2, 8,1 y 10,8 para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. El grupo de título alto tuvo un número significativamente mayor de lechones sanos vivos por camada en el parto (**P=0,0211**), mientras que no se detectó diferencia para el grupo de título bajo en comparación con el grupo de control de exposición (P=0,0640).

Los porcentajes medios de lechones vivos débiles por camada en el parto fueron 7,4%, 7,1%, 0,4% y 0,0% para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. El número medio de lechones vivos débiles por camada en el parto fue 0,9, 0,8, 0,1 y 0,0 para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de

control negativo, respectivamente. El grupo de título alto tuvo significativamente menor porcentaje y número de lechones vivos débiles por camada en el parto en comparación con el grupo de control de exposición (**P≤0,0090**). En cambio, no se detectaron diferencias entre el grupo de título bajo y el grupo de control de exposición para el porcentaje o número de lechones vivos débiles en el parto (P≥0,8569).

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

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

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

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

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

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

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

Lechones	Grupo *	N	Mín.	Máx.	Mediana	Media	IC de 95%		DE	P
Total	1	16	6	15	12,0	11,6	10,4	12,9	2,31	
	2	16	9	13	11,0	11,1	10,4	11,7	1,24	0,1857
	3	16	7	15	12,0	11,6	10,3	12,9	2,42	0,9623
	4	5	10	14	12,0	11,6	9,5	13,7	1,67	
Vivos	1	16	0	11	6,0	6,5	4,7	8,3	3,35	
	2	16	4	12	8,0	8,3	7,0	9,5	2,27	0,1543
	3	16	2	13	9,0	8,6	6,6	10,6	3,77	0,1039
	4	5	9	14	10,0	10,8	8,4	13,2	1,92	
Sanos	1	16	0	11	5,5	4,9	3,1	6,7	3,36	
	2	16	1	12	7,0	7,2	5,7	8,7	2,83	0,0640
	3	16	2	13	8,5	8,1	6,1	10,1	3,76	**0,0211**
	4	5	9	14	10,0	10,8	8,4	13,2	1,92	
Débiles	1	16	0	3	0,5	0,9	0,3	1,5	1,09	
	2	16	0	3	0,0	0,8	0,2	1,4	1,11	0,8569
	3	16	0	1	0,0	0,1	-0,1	0,2	0,25	**0,0090**
	4	5	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	
Nacidos muertos	1	16	0	6	1,0	2,0	0,9	3,1	2,03	
	2	16	0	5	0,5	1,3	0,4	2,1	1,65	0,1681
	3	16	0	10	1,0	2,1	0,8	3,5	2,58	0,9478
	4	5	0	2	1,0	0,8	-0,2	1,8	0,84	
Momias	1	16	0	7	3,0	3,1	2,1	4,1	1,89	
	2	16	0	6	1,0	1,6	0,7	2,5	1,67	**0,0125**
	3	16	0	4	0,5	0,9	0,2	1,5	1,20	**0,0003**
	4	5	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	

Lechones	Grupo *	N	Mín.	Máx.	Mediana	Media	IC de 95%		DE	P
Mortalidades / Aplastados	1	16	0	3	0,0	0,7	0,1	1,2	1,01	
	2	16	0	2	0,0	0,3	-0,1	0,6	0,58	0,2200
	3	16	0	2	0,0	0,4	0,0	0,8	0,73	0,6115
	4	5	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	
Vivos en DOF+20	1	16	0	10	2,0	2,9	1,2	4,7	3,21	
	2	16	1	10	6,5	6,2	4,5	7,9	3,19	**0,0063**
	3	16	2	12	7,5	6,9	5,0	8,9	3,71	**0,0026**
	4	5	9	14	10,0	10,8	8,4	13,2	1,92	

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

LECHONES VIVOS EN DOF+20

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

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

VIREMIA POR qPCR EN CERDAS JÓVENES

Todas las cerdas jóvenes fueron negativas por qPCR para ARN del PRRSv en D0. Todas las cerdas jóvenes del control de exposición y del control negativo siguieron siendo negativas por qPCR para ARN del PRRSv hasta e incluyendo el día de exposición (D118). El grupo de

control negativo siguió siendo negativo por qPCR para el resto del estudio, con excepción de la cerda joven nº 108, que fue “positiva” en DOF+7. La cerda joven nº 108 fue negativa en otros momentos de tiempo para ARN del PRRSv por pruebas de qPCR.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabla 6.16: Resumen de los resultados de qPCR de cerdas jóvenes por grupo (log_{10} GE/ml) de D7 a D132

Día de estudio	Grupo *	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	P
7	1	28	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	2	28	0,00	3,00	1,500	0,000	3,000	3,000	1,500	**<0,0001**
	3	28	0,00	3,00	0,000	0,000	3,000	3,000	1,071	**0,0007**
	4	10	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
14	1	28	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	2	28	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,107	1,0000
	3	28	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,0000
	4	10	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
21	1	28	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	2	28	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,107	1,0000
	3	28	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,107	1,0000
	4	10	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
56	1	23	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	2	26	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,115	1,0000
	3	25	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,120	1,0000
	4	9	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
84	1	23	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	2	26	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,0000
	3	25	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,0000
	4	9	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	1	16	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
118 (Día de	2	16	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,0000
exposición)	3	16	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,0000
	4	5	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
125	1	16	3,00	5,38	4,495	4,130	4,880	0,765	4,419	
	2	16	0,00	6,46	0,000	0,000	3,000	3,000	1,293	**0,0001**
	3	16	0,00	3,00	0,000	0,000	3,000	1,500	0,750	**<0,0001**
	4	5	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

Día de estudio	Grupo *	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	P
132	1	16	0,00	4,47	3,000	0,000	3,000	3,000	1,967	
	2	16	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,563	**0,0230**
	3	16	0,00	3,00	0,000	0,000	3,000	3,000	0,938	0,1144
	4	5	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

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

Tabla 6.17: Resumen de los resultados de qPCR de cerdas jóvenes por grupo (log_{10} GE/ml) de DOF 0 a DOF+20

Día de estudio	Grupo *	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	P
DOF+0	1	16	0,00	3,00	3,000	3,000	3,000	0,000	2,813	
	2	16	0,00	3,00	0,000	0,000	3,000	1,500	0,750	**0,0002**
	3	16	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188	**<0,0001**
	4	5	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
DOF+7	1	16	0,00	3,00	0,000	0,000	3,000	3,000	0,938	
	2	16	0,00	5,55	0,000	0,000	0,000	0,000	0,534	0,3944
	3	16	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188	0,1719
	4	5	0,00	3,00	0,000	0,000	3,000	0,000	0,600	
DOF+13	1	15	0,00	3,00	0,000	0,000	3,000	3,000	1,400	
	2	16	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	**0,0024**
	3	16	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188	**0,0155**
	4	5	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
DOF+20	1	16	0,00	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,563	
	2	16	0,00	6,45	0,000	0,000	0,000	0,000	0,903	0,7924
	3	16	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,2258
	4	5	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

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

PUNTUACIONES DE OBSERVACIONES CLÍNICAS DE CERDAS JÓVENES DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN

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

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

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

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

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

SEROLOGÍA POR ELISA DEL PRRS EN CERDAS JÓVENES

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

En D14, 18% y 21% de las cerdas jóvenes de título bajo y título alto, respectivamente, fueron seropositivas para PRRS. El grupo de título alto tuvo un porcentaje significativamente mayor de

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

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

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

Día de estudio	Grupo*	N	%	IC de 95%		Total	P
7	1	0	0	0,0	12,3	28	
	2	0	0	0,0	12,3	28	n.a.
	3	0	0	0,0	12,3	28	n.a.
	4	0	0	0,0	30,8	10	
14	1	0	0	0,0	12,3	28	
	2	5	18	6,1	36,9	28	0,0515
	3	6	21	8,3	41,0	28	**0,0232**
	4	0	0	0,0	30,8	10	
21	1	0	0	0,0	12,3	28	
	2	13	46	27,5	66,1	28	**<0,0001**
	3	11	39	21,5	59,4	28	**0,0003**
	4	0	0	0,0	30,8	10	
56	1	0	0	0,0	14,8	23	
	2	17	65	44,3	82,8	26	**<0,0001**
	3	15	60	38,7	78,9	25	**<0,0001**
	4	0	0	0,0	33,6	9	
84	1	0	0	0,0	14,8	23	
	2	15	58	36,9	76,6	26	**<0,0001**
	3	14	56	34,9	75,6	25	**<0,0001**
	4	0	0	0,0	33,6	9	
118	1	0	0	0,0	20,6	16	
	2	9	56	29,9	80,2	16	**0,0008**
	3	8	50	24,7	75,3	16	**0,0024**
	4	0	0	0,0	52,2	5	
125	1	1	6	0,2	30,2	16	
	2	14	88	61,7	98,4	16	**<0,0001**
	3	16	100	79,4	100,0	16	**<0,0001**
	4	0	0	0,0	52,2	5	

Día de estudio	Grupo*	N	%	IC de 95%		Total	P
132	1	16	100	79,4	100,0	16	
	2	16	100	79,4	100,0	16	n.a.
	3	16	100	79,4	100,0	16	n.a.
	4	0	0	0,0	52,2	5	

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

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

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

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

EVALUACIONES DE CERDAS JÓVENES DESPUÉS DE LA VACUNACIÓN

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

Individualmente, el nº 109 (grupo de control de exposición) presentó cojera de la pata trasera derecha en D85, el nº 12 (grupo de título bajo) presentó una hinchazón en la región izquierda del cuello de D78 a D89 y el nº 21 (grupo de control negativo) presentó cojera de D81 a D83.

Un resumen del porcentaje por grupo de cerdas jóvenes que presentó una evaluación anormal durante al menos un día de D1 a D21 y de D1 a D113 se muestra a continuación en la Tabla 6.21.

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

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

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

PUNTUACIONES DE OBSERVACIONES CLÍNICAS DE LECHONES

Los porcentajes medios de lechones por camada positivos para enfermedad clínica (una puntuación de observación clínica de > 0) durante al menos un día de DOF+1 a DOF+20 fueron

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

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

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

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

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

RESULTADOS DE qPCR DE SUERO/FLUIDOS CORPORALES DE LECHÓN

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

qPCR (P=0,0860). No se detectaron diferencias significativas entre los grupos en DOF+20 (P≥0,0614).

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

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

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

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

El grupo de título alto tuvo una mediana significativamente menor de resultado de qPCR en comparación con el grupo de control de exposición en DOF 0 (**P=0,0030**); mientras que no se detectó diferencia entre el grupo de título bajo y el grupo de control de exposición (P=0,0620).

En DOF+7, DOF+13 y DOF+20, ambos grupos de vacunas tuvieron medianas significativamente menores de valores de qPCR en comparación con el grupo de control de exposición (**p≤0,0122**).

Un resumen de los resultados de qPCR en GE/ml de suero/fluido corporal de lechones por grupo por cerda joven se muestra a continuación en la Tabla 6.24.

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

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

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

ADWG DE LECHONES

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

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

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

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

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

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

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

Día(s) de estudio	Grupo*	Media por LS	Intervalo de confianza de 95%		P
Pesos corporales en DOF+0	**1**	1,32	1,169	1,477	
	2	1,42	1,318	1,522	
	3	1,41	1,317	1,497	
	Dif. 1-2	-0,10	-0,281	0,088	0,2972
	Dif. 1-3	-0,08	-0,262	0,094	0,3467
Pesos corporales en DOF+20	**1**	3,82	3,072	4,567	
	2	5,32	4,827	5,819	
	3	5,35	4,910	5,785	
	Dif. 1-2	-1,50	-2,401	-0,606	**0,0016**
	Dif. 1-3	-1,53	-2,394	-0,662	**0,0010**
Pesos corporales en DOF+20**	**1**	4,01	3,341	4,685	
	2	5,28	4,843	5,727	
	3	5,34	4,950	5,728	
	Dif. 1-2	-1,27	-2,078	-0,466	**0,0028**
	Dif. 1-3	-1,33	-2,103	-0,550	**0,0013**
ADWG (DOF+0 a DOF+20)	**1**	0,125	0,0903	0,1594	
	2	0,195	0,1722	0,2181	
	3	0,197	0,1768	0,2172	
	Dif. 1-2	-0,070	-0,1118	-0,0289	**0,0014**
	Dif. 1-3	-0,072	-0,1122	-0,0322	**0,0008**
ADWG (DOF+0 a DOF+20)**	**1**	0,130	0,0969	0,1640	
	2	0,194	0,1720	0,2161	
	3	0,197	0,1773	0,2162	
	Dif. 1-2	-0,064	-0,1039	-0,0233	**0,0028**
	Dif. 1-3	-0,066	-0,1052	-0,0275	**0,0013**

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

OBSERVACIONES Y DIAGNÓSTICOS DE AUTOPSIAS DE LECHONES

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

Un lechón del control de exposición 102-428 murió posteriormente a la recogida de sangre, que se confirmó por autopsia.

RESULTADOS DE qPCR DE PULMONES DE LECHONES

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

Un resumen de los resultados de qPCR del PRRSv en los pulmones por grupo ($\log_{10}$ GE/ml) se muestra a continuación en la Tabla 6.27.

Tabla 6.27: Resumen de los resultados de qPCR del PRRSv en los pulmones de lechones por grupo (log_{10} GE/ml)

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

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

DISCUSIÓN/CONCLUSIÓN

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

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

Validación del estudio (Grupo de control negativo 4)

Para garantizar que las cerdas jóvenes fuente estuvieron libres del PRRSv y que no se produjo exposición externa al PRRSv o contaminación cruzada entre los grupos de tratamiento y de control durante el estudio, un grupo de control negativo (Grupo 4) se incluyó en el diseño del estudio. Las cerdas jóvenes de control negativo fueron negativas para anticuerpos del PRRS

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

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

Es necesario un modelo de exposición que implique una cepa derivada de EU virulenta del PRRSv que induzca enfermedad clínica del PRRS suficiente y reproducible para evaluar adecuadamente la eficacia de la vacuna contra el PRRS en un entorno de laboratorio. Tras la inoculación con la cepa aislada del PRRS europea 190136 (1 x $10^{6,30}$ $TCID_{50}$/6 ml), el grupo de control de exposición sólo presentó 54,4% de lechones vivos por camada en el nacimiento (93,0% para el grupo de control negativo), 17,5% y 28,1% por camada de nacidos muertos y momias, respectivamente (7,0% y 0,0%, respectivamente, para el grupo de control negativo), 91,6% de los lechones por camada presentó enfermedad clínica durante al menos un día de DOF+1 a DOF+20 (3,2% lechones por camada para el grupo de control negativo), una media de 2,9 lechones vivos por camada a los 20 días de edad (una media de 10,8 para el grupo de control negativo) y 86,3% de los lechones por camada virémicos en el nacimiento (0% para el grupo de control negativo). Estos resultados ponen de relieve que se indujo enfermedad clínica específica del PRRS grave en el grupo de control de exposición sin vacunar de cerdas jóvenes y su progenie, validándose así este modelo de exposición como una herramienta de laboratorio clínico adecuada para evaluar la eficacia de la vacuna contra el PRRS y más específicamente la MID de MLV contra el 94881 del PRRS en cerdas jóvenes.

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

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

con el grupo de control de exposición.

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

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

Otros análisis de los datos del parto revelaron más información que soporta la eficacia de la vacuna tras la exposición al PRRSv, especialmente con respecto al grupo de título alto. El grupo de título alto presentó estadísticamente un mayor porcentaje y un mayor número medio de lechones sanos en el nacimiento (**P≤0,0211**); mientras que presentó porcentajes significativamente menores y números medios de fetos débiles y momificados (**P≤0,0090**) en comparación con el grupo de control de exposición. Estos datos soportan que la dosis de vacuna alta induce inmunidad protectora contra una cepa de exposición del PRRSv virulenta y heteróloga. El grupo de título bajo también presentó eficacia de la vacuna en el parto, como es evidente por un mayor porcentaje de lechones sanos vivos por camada (**P=0,0138**) y porcentajes y número medios significativamente menores de fetos momificados (**P≤0,0190**). En cambio, no se detectaron diferencias entre grupos para el porcentaje o número de fetos nacidos muertos o aplastados/mortalidades en el parto (P≥0,1681).

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

Normalmente, el PRRSv no induce enfermedad clínica en cerdas jóvenes y cerdas, distinta de aborto. En este estudio, el 25%, 25%, 38% y 60% de las cerdas jóvenes de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente, presentaron enfermedad clínica (recibieron una puntuación de observación clínica > 0) durante al menos un día después de la exposición. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos de vacunas y el grupo de control de exposición con respecto al porcentaje de cerdas jóvenes con enfermedad clínica durante al menos un día de D116 a DOF +20 (P≥0,7043). Las cerdas

jóvenes que presentaron alguna forma de enfermedad clínica lo hicieron en el peri-parto y no inmediatamente después de la exposición. El alto porcentaje de cerdas jóvenes de control negativo (60%) que presentó enfermedad clínica y el hecho de que la enfermedad clínica no fuera principalmente aproximadamente en el momento del parto para todos los grupos en este estudio soporta que la enfermedad clínica no se atribuyó a enfermedad del PRRS, sino a cambios fisiológicos asociados al parto.

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

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

Los resultados de viremia del PRRS en lechones sobre el DOF dieron adicionalmente la oportunidad de ver el nivel de protección en cerdas jóvenes en la prevención de infección placentaria cruzada de lechones. En el DOF, una media de 58,1% y 55,0% de los lechones por cerda joven en los grupos de título bajo y de título alto, respectivamente, fueron positivos por qPCR. En cambio, una media de 86,3% de los lechones por cerda joven en el grupo de control de exposición fueron positivos por qPCR en suero/fluidos corporales, que fue significativamente superior a ambos grupos de vacunas (**P≤0,0381**). Cuando se examinó la carga vírica de los lechones en DOF 0, los lechones de título alto tuvieron significativamente menor carga vírica en comparación con los lechones del control de exposición (**P=0,0030**); mientras que no se detectó diferencia para la carga vírica entre lechones de título bajo y de control de exposición (P=0,0620). Reducciones significativas (P≤0,05) en el porcentaje de lechones por cerda joven positivos para viremia indican una reducción de la transmisión vertical del PRRSv virulento de cerda joven vacunada a cría cuando se inmuniza con cualquier dosis de MLV contra el 94881 del PRRS EU. Además, el grupo de título alto tuvo una mediana del valor de lechón por qPCR por cerda joven de 3,00 $\log_{10}$ GE/ml en el DOF; mientras que el grupo de control de exposición tuvo una mediana del valor de lechón por qPCR por cerda joven de 6,40 $\log_{10}$ GE/ml en suero/fluidos corporales (**P=0,0030**). No se detectó diferencia significativa entre el grupo de dosis baja y el grupo de control de exposición para la carga vírica de los lechones en DOF (P=0,0620). Los datos soportan adicionalmente la eficacia de la dosis alta de MLV contra el 94881 del PRRS cuando se administra a cerdas jóvenes y cerdas.

Los grupos de título bajo y de título alto presentaron medias de 32,5% y 33,4%, respectivamente, para lechones por camada con enfermedad clínica (una puntuación de observación clínica de > 0) durante al menos un día de DOF+1 a DOF +20. Estos resultados fueron significativamente inferiores para el grupo de control de exposición, que presentó una media de 91,6% de lechones por camada para el mismo parámetro (**P≤0,0001**), soportando adicionalmente la eficacia de la vacuna para ambos niveles de dosis.

No se detectó diferencia significativa entre grupos para pesos corporales medios de lechones en DOF 0 (P≥0,2972); mientras que ambos grupos de vacunas tuvieron pesos corporales significativamente mayores en DOF+20 y ADWG de DOF 0 a DOF+20 (**P≤0,0028**). De nuevo, estos resultados soportan la eficacia de ambas dosis de MLV contra el 94881 del PRRS.

Los resultados de la autopsia confirmaron la correcta clasificación de casi todos los fetos en el parto. Debido al número muy pequeño de fetos que se anotaron como aplastados que fueron en realidad nacidos muertos y nacidos muertos que fueron en realidad aplastados en el parto,

en comparación con el número total de fetos correctamente clasificados en el parto, no se hicieron cambios en los datos de rendimiento de las cerdas jóvenes antes de analizarse. Un lechón de control de exposición murió posteriormente a la recogida de sangre. Como esta situación sólo implicó a un lechón en comparación con el gran número total de lechones en el grupo de control de exposición, este lechón no se eliminó de los análisis.

Las muestras de pulmón se recogieron de 141, 79, 75 y 4 fetos/lechones muertos de los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. Se determinó un valor de pulmón por qPCR medio de 4,68, 4,10, 3,55 y 0,00 $\log_{10}$ GE/ml para los grupos de control de exposición, de título bajo, de título alto y de control negativo, respectivamente. No se realizaron análisis en estos datos ya que a los lechones vivos a los 20 días de edad no se les hizo la autopsia, pero estos resultados ponen de relieve que las cerdas jóvenes vacunadas con MLV contra el 94881 del PRRS produjeron menor carga vírica en los pulmones de lechones cuando las cerdas jóvenes se expusieron a un PRRSv virulento.

En conclusión, los resultados de este estudio demostraron porcentajes significativamente mayores de lechones vivos por camada en el parto (**P≤0,0455**) y mayores porcentajes y números de lechones por camada en el destetamiento (**P≤0,0203**) para ambos grupos de vacunas en comparación con el grupo de control de exposición. Por tanto, se cumplió el objetivo del estudio y los datos de este estudio establecen la MID de MLV contra el 94881 del PRRS en cerdas jóvenes como 1 x $10^{2,43}$ $TCID_{50}$/2 ml. Estos resultados se alcanzaron 118 días después de la vacunación, que además establece la duración de la inmunidad (DOI) en cerdas jóvenes en aproximadamente 4 meses.

Cuando se examinaron los datos de apoyo, la dosis alta de MLV contra el 94881 del PRRS (1 x $10^{3,90}$ $TCID_{50}$/2 ml) se asoció a un mayor porcentaje y número de lechones sanos por cerda joven en el parto (**P≤0,0211**), un menor porcentaje y número de fetos débiles y momificados (**P≤0,0090**), un menor porcentaje de cerdas jóvenes positivas por qPCR y menor carga vírica en cerdas jóvenes después de la exposición en D125, DOF 0 y DOF+13 (**P≤0,0155**), un menor porcentaje de lechones por cerda joven positiva por qPCR y menor carga vírica en lechones en DOF 0 (**P≤0,0030**), un menor porcentaje de lechones por cerda joven con enfermedad clínica (**P<0,0001**) y mayores pesos corporales de los lechones en DOF+20 y ADWG (**P<0,0013**).

El grupo de dosis baja se asoció a un mayor porcentaje de lechones sanos por cerda joven en el parto (**P=0,0138**), un menor porcentaje y número de fetos momificados (**P≤0,0190**), un menor porcentaje de cerdas jóvenes positivas por qPCR y menor carga vírica en cerdas jóvenes

después de la exposición en D125, D132, DOF 0 y DOF+13 (**P≤0,0290**), un menor porcentaje de lechones por cerda joven positiva por qPCR en DOF 0 (**P=0,0381**), un menor porcentaje de lechones por cerda joven con enfermedad clínica (**P<0,0001**) y mayor peso corporal de los lechones en DOF+20 y ADWG (**P<0,0028**).

Ejemplo 7 Evaluación de la aparición de inmunidad de MLV contra el 94881 del PRRS en lechones susceptibles tras la exposición a una cepa aislada europea heteróloga del PRRS dos semanas después de la vacunación

El objetivo de este estudio de exposición a vacunación fue evaluar la aparición de inmunidad (OOI) dos semanas después de la administración del candidato a vacuna contra el síndrome reproductor y respiratorio porcino, la cepa aislada derivada de europea 94881, virus vivo modificado (MLV contra el 94881 del PRRS), en lechones susceptibles de 14 ± 3 días de edad. El criterio de eficacia primaria para satisfacer una OOI de 2 semanas después de la vacunación fue si el grupo vacunado (Grupo 1) demostró una diferencia significativa (p≤0,05) para lesiones pulmonares después de la exposición en comparación con el grupo de control de exposición sin vacunar (Grupo 2). Los parámetros secundarios incluyeron evaluaciones clínicas después de la vacunación, observaciones clínicas después de la exposición, temperaturas rectales, aumento de peso diario promedio, evaluación de anticuerpos del PRRS y viremia en muestras de suero y cuantificación del virus del PRRS en muestras de pulmón recogidas en la autopsia.

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

Todos los animales asignados a este estudio completaron el estudio. No se informaron acontecimientos adversos durante este estudio. Las puntuaciones de lesión pulmonar medias en D24 fueron 27,4% y 54,8% para los cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS y los controles de exposición, respectivamente. La puntuación de lesión pulmonar media para los cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS fue significativamente menor que la de los controles de exposición (**p=0,0002**) y, por tanto, se cumplió la variable de eficacia primaria y la OOI se estableció en 2 semanas tras una única vacunación. Una proporción significativamente mayor de cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS tuvieron

títulos de anticuerpos del PRRS positivos en D14, D17 y D21 en comparación con los controles de exposición (**p≤0,0012**). El ABC media para viremia fue significativamente menor para cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS en comparación con los controles de exposición para D17-D24 (50,72 y 54,61 log_{10} GE/ml, respectivamente; **p=0,0039**) después de la exposición. Los cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS no presentaron signos de letargo (0%) después de la exposición en comparación con 45% de los cerdos del control de exposición (**p=0,0012**). Los cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS tuvieron mayores aumentos de peso durante la fase después de la exposición (SD 14-SD 24) del estudio en comparación con los controles de exposición (0,3 y 0,1 kg, respectivamente; **p=0,0003**).

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

Objetivos/fin del estudio

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

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

Un grupo de control negativo (Grupo 3), que no se vacunó ni se expuso, se incluyó en el

estudio para demostrar que la piara fuente estuvo libre de infección por PRRSv durante el periodo de ensayo y que la bioseguridad no se infringió durante este ensayo.

Programa de acontecimientos

Tabla 7.1 Programa de acontecimientos

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

Diseño del estudio

Tabla 7.2 Diseño del estudio

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

Criterios de cegado

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

Materiales

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

Tabla 7.3 IVP

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

Tabla 7.4 CP

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

Material de exposición

Tabla 7.5 Material de exposición

Nombre/número de cepa aislada	Cepa aislada del PRRS 205817
Localización y fecha de aislamiento, incluidos síntomas clínicos	La cepa aislada del virus del PRRS europeo 205817 se derivó de la cepa aislada 190136 originariamente obtenida de tejido de pulmón de un lechón recién nacido de una granja que mostraba signos reproductivos típicos de PRRS (abortos en cerdas y debilidad en lechones recién nacidos) durante un brote en baja Sajonia, Alemania, en abril de 2004. Los veterinarios enviaron las muestras de pulmón a BioScreen (la muestra llegó el 21 de abril de 2004) para pruebas de diagnóstico. La cepa aislada nº 190136 se propagó directamente en células MA 104 y para su uso en futuros ensayos clínicos en BIVI se preparó una disolución madre de exposición de cultivo puro. Un cultivo puro de la cepa aislada 190136 se usó para inocular cerdos para la evaluación de su capacidad para reproducir la enfermedad respiratoria específica para PRRS en un ensayo de laboratorio controlado. Los animales expuestos presentaron dificultades respiratorias y revelaron pruebas de neumonía intersticial tras el examen histopatológico. Al virus del PRRS que se volvió a aislar satisfactoriamente de lesiones pulmonares se le dio la designación de cepa aislada 205817. La cepa aislada 205817 se propagó directamente en células MA104 y para su uso en futuros ensayos clínicos de BIVI se preparó una disolución madre de exposición de cultivo puro.
Formulación:	El virus de exposición se descongeló y se diluyó con MEM (medio esencial mínimo) a un título elegido como diana de aproximadamente 1 x 10^6 $TCID_{50}$/3 ml en D14. Se preparó un volumen adecuado de material de exposición. Se tomaron dos alícuotas del material de exposición.
Número de lote:	N257-093
Fabricante:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. – EE.UU.
Condiciones de almacenamiento	Se almacenó material de exposición a granel a -70 ± 10ºC. Una vez preparado, el material de exposición diluido se mantuvo sobre hielo hasta que se administró.
Pruebas:	Al principio y al final del procedimiento de exposición se contactó con BIVI-

	Ames. El personal del laboratorio de BIVI-Ames probó antes y después de la exposición alícuotas para el título de virus según el Procedimiento de títulos de PRRSv
Resultados de las pruebas:	El material de exposición tuvo un título medio de 1 x $10^{4,71}$ $TCID_{50}$/3 ml de dosis
Vía de administración	1,0 ml/orificio nasal y 1,0 ml IM en el cuello izquierdo (administrado a todos los cerdos en los Grupos 1 y 2 en D14).
Retención del material de exposición:	El material de exposición sólo se formuló para este estudio y no se retuvo.

Tratamientos

Justificación de la dosificación

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

Pauta de dosificación

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

Tabla 7.6 Pauta de dosificación

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

Información sobre los animales

Detalles de los animales del estudio

Tabla 7.7 Información sobre los animales

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

5

CRITERIOS DE INCLUSIÓN/EXCLUSIÓN

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

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN DESPUÉS DE LA INCLUSIÓN

No se eliminaron cerdos del estudio.

MANIPULACIÓN Y ALOJAMIENTO DE LOS ANIMALES

Alojamiento de los animales

Los lechones se alojaron en Veterinary Resources, Inc. (VRI) en Cambridge, IA, durante la duración del estudio. Los grupos 1, 2 y 3 se alojaron en habitaciones uniformes pero separadas para garantizar la bioseguridad. Los lechones se alojaron en múltiples corrales (5 lechones/corral) dentro de cada habitación. El Grupo 1 se alojó en 4 corrales en la Habitación 5, el Grupo 2 se alojó en 4 corrales en la Habitación 6 y el Grupo 3 se alojó en 2 corrales en la Habitación 4. Los corrales estaban constituidos por cubas de plástico sobre bases elevadas con revestimiento del suelo de pizarra de plástico. Cada corral contuvo un comedero de 6 orificios de plástico y un bebedero de boquilla. Cada habitación de aislamiento se construyó idéntica a las otras y todas cumplen el nivel de biorriesgo 2 (BL2), se filtran con Hepa, se ventilan mecánicamente con control de temperatura regulado por termostato.

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

Cada habitación en la instalación tiene ventiladores y calefactores para ayudar en la suficiente

circulación y el calentamiento del aire. El sistema de ventilación es separado aunque idéntico para cada habitación, por lo que el aire no es compartido entre habitaciones.

El pienso sólido se almacenó en bolsas, libres de bichos. El agua estaba a voluntad. Los lechones se alimentaron con una ración comercial (Lean Metrics Infant, Purina Mills, St. Louis, MO) medicada con tiamulina (35 g/ton) y clortetraciclina (400 g/ton) a voluntad apropiada para su tamaño, edad y condición; según prácticas de cría de animales aceptables para la región.

Los cerdos tenían buen estado de salud y nutricional antes de iniciarse el estudio como se ha determinado por el investigador del estudio.

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

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

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA

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

Los parámetros de eficacia secundaria analizados entre el grupo de vacunas y el grupo de control de exposición incluyeron evaluaciones clínicas después de la vacunación, observaciones clínicas después de la exposición, temperaturas rectales, peso corporal y

aumento de peso diario promedio (ADWG), evaluación de anticuerpos del PRRS y viremia en muestras de suero y cuantificación del virus del PRRS en muestras de pulmón recogidas en la autopsia.

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

CRITERIOS PARA UNA PRUEBA VÁLIDA

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

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

PARÁMETROS DE RESULTADOS PRIMARIOS

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

Puntuaciones de lesión pulmonar total

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

PARÁMETROS DE APOYO

Otros parámetros que iban a analizarse entre el Grupo 1 y el Grupo 2 incluyeron evaluaciones

clínicas después de la vacunación, serología del PRRS, viremia después de la vacunación, observaciones clínicas después de la exposición, ADWG, temperaturas rectales y cuantificación del virus en los pulmones después de la exposición. Estos parámetros se analizaron como parámetros de apoyo y no sirvieron de parámetros primarios para satisfacer el objetivo del estudio.

Evaluación clínica

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

Serología del PRRS

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

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

Viremia del PRRS

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

Un cuaderno de recogida de datos de la entrega de especímenes completo se incluyó con el

envío. BioScreen probó las muestras de suero para ARN del PRRSv por qPCR. Los resultados se informaron como equivalente de genoma/ml (log GE/ml).

Observaciones clínicas después de la exposición

Los lechones se observaron para signos clínicos de enfermedad en los días expuestos en la Tabla 7.1. Las observaciones se realizaron por el investigador del estudio o representantes y se registraron en el cuaderno de recogida de datos de las observaciones clínicas. Los lechones se observaron cada día para respiración, comportamiento y tos basándose en el sistema de puntuación de observaciones clínicas explicado a continuación en la Tabla 7.8.

Tabla 7.8 Sistema de puntuación de observaciones clínicas

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

Aumento de peso diario promedio (ADWG)

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

Temperaturas rectales

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

Cuantificación del virus del PRRS en tejido de pulmón

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

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

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

ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

No se informó de acontecimientos adversos durante este estudio.

PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS

UNIDAD EXPERIMENTAL

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

confundir los efectos de “habitación” y “tratamiento”, y el lechón se usó como unidad experimental.

ALEATORIZACIÓN

Cincuenta (50) lechones se asignaron a bloques por peso (n=5 lechones/bloque). A cada cerdo se le asignó un número aleatorio usando la función de números aleatorios en Excel. Dentro de cada bloque de peso, los cerdos se clasificaron en orden numérico ascendente del número aleatorio asignado. Entonces, los grupos de tratamiento se asignaron a cerdos en este orden numérico: los 2 números aleatorios más bajos se asignaron al grupo 1, los 2 siguientes números se asignaron al grupo 2 y el número más alto se asignó al Grupo 3. Los Grupos 1 y 2 contuvieron cada uno 20 cerdos y el Grupo 3 contuvo 10 cerdos.

ANÁLISIS

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

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

Puntuaciones de lesión pulmonar total

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

Tabla 7.9 Factores para calcular las puntuaciones de lesión pulmonar

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

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

Evaluación clínica después de la vacunación

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

Serología del PRRS

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

Viremia del PRRS

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

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

Observaciones clínicas después de la exposición

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

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

Peso corporal y aumento de peso diario promedio

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

Temperaturas rectales

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

Cuantificación del virus del PRRS en tejidos de pulmón

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

Se generaron tablas de frecuencias de resultados por qPCR positivos. Las diferencias entre los

grupos de tratamiento se probaron por la prueba exacta de Fisher.

RESULTADOS

Puntuaciones de lesión pulmonar total

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

Tabla 7.10 Puntuaciones de lesión pulmonar totales (%)

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

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NI = no incluido en el análisis estadístico.

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

Viremia del PRRS

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

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

Día	Grupo[1]	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	Valor de p
7	1	20	0,00	5,34	3,00	3,00	3,79	0,82	3,17	**<0,0001**
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
14	1	20	0,00	4,29	3,32	3,00	3,77	0,84	3,30	**<0,0001**
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
17	1	20	5,54	8,07	6,72	6,47	7,08	0,80	6,78	**<0,0001**
	2	20	6,44	9,02	8,18	7,47	8,47	1,09	8,00	
	3	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
21	1	20	6,18	8,73	7,38	7,13	8,08	0,98	7,51	0,0565
	2	20	7,22	8,86	7,87	7,62	8,11	0,57	7,88	
	3	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
24	1	20	5,82	8,54	7,15	6,73	7,84	1,16	7,26	0,6251
	2	20	6,53	8,29	7,27	6,97	7,60	0,67	7,34	
	3	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
ABC 14-24	1	20	56,95	78,02	65,10	60,39	70,05	9,76	65,84	0,4945
	2	20	58,74	74,30	67,02	64,38	68,24	4,83	66,61	
	3	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
ABC17-24	1	20	42,98	59,51	49,52	47,46	54,30	7,14	50,72	**0,0039**
	2	20	49,08	60,99	54,35	52,93	55,38	3,63	54,61	
	3	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI

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

El ARN del PRRSv no se detectó en el suero de ningún lechón en D0. Los cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS tuvieron valores medios de 3,17 y 3,30 log_{10} GE/ml en D7 y D14, respectivamente. Los valores fueron significativamente superiores a los controles de exposición en ambos días (**p<0,0001**), ya que los controles de exposición no tuvieron ARN del PRRSv detectado hasta D17. En ese día, los valores medios fueron 6,78 y 8,00 log_{10} GE/ml

para lechones vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS y controles de exposición, respectivamente. El valor de D17 para controles de exposición fue significativamente mayor que para los lechones vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS (**p<0,0001**). Los valores medios para cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS en D21 y D24 fueron 7,51 y 7,26 log_{10} GE/ml en D21 y D24 respectivamente, en comparación con 7,88 y 7,34 log_{10} GE/ml para controles de exposición en los mismos días. No hubo diferencias significativas entre cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS en D21 ó 24 (p≥0,0565). No se detectó ARN del PRRSv en suero de ningún cerdo de control negativo durante este estudio.

No hubo diferencias entre el ABC 14-24 para cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS y cerdos del control de exposición (65,84 y 66,61, respectivamente; p=0,4945). Los cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS tuvieron un ABC significativamente menor para D17-D24 en comparación con los controles de exposición (50,72 y 54,61, respectivamente; **p=0,0039**).

Cuantificación del virus del PRRS en tejidos de pulmón

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

Tabla 7.12 Aislamiento del virus de los pulmones, qPCR (log10 GE/ml medio) en la autopsia (D24)

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

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NA = no aplicable debido a la falta de variabilidad. NI = no incluido en el análisis estadístico.

Tabla 7.13 Frecuencia de animales con posible ARN del PRRSv, PCR de tejidos de pulmón

recogidos en la autopsia (D24)

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

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NA = no aplicable debido a la falta de variabilidad. NI = no incluido en el análisis estadístico.

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

Observaciones clínicas después de la exposición

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

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

Parámetro	Grupo[1]	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Total	Valor de p
Respiración	1	2	10	1,2	31,7	20	0,2351
	2	6	30	11,9	54,3	20	
	3	0	0	0,0	30,8	10	NI
Comportamiento	1	0	0	0,0	16,8	20	**0,0012**
	2	9	45	23,1	68,5	20	
	3	0	0	0,0	30,8	10	NI
Tos	1	6	30	11,9	54,3	20	0,2003
	2	11	55	31,5	76,9	20	
	3	0	0	0,0	30,8	10	NI

Parámetro	Grupo[1]	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Total	Valor de p
Total	1	6	30	11,9	54,3	20	0,0562
	2	13	65	40,8	84,6	20	
	3	0	0	0,0	30,8	10	NI

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NI = no incluido en el análisis estadístico.

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

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

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

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

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

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

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

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

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NI = no incluido en el análisis estadístico.

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

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

Se observó tos en tanto el grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS como en el

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

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

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

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

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

Parámetro	**Grupo[1]**	**N**	**Mín.**	**Máx.**	**Mediana**	**IC de 95%**		**Rango de Q**	**Media**	**Valor de p**
Respiración	1	20	0,0	0,2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,1394
	2	20	0,0	0,6	0,00	0,00	0,10	0,10	0,07	
	3	10	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
Comportamiento	1	20	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	**0,0012**
	2	20	0,0	0,8	0,00	0,00	0,10	0,10	0,12	
	3	10	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
Tos	1	20	0,0	0,4	0,00	0,00	0,10	0,10	0,07	0,0835
	2	20	0,0	0,7	0,10	0,00	0,30	0,35	0,17	
	3	10	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI

Total	1	20	0,0	0,4	0,00	0,00	0,10	0,15	0,08	**0,0103**
	2	20	0,0	1,4	0,25	0,00	0,40	0,50	0,35	
	3	10	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NI = no incluido en el análisis estadístico

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

Las puntuaciones de respiración medias fueron 0,02 y 0,07 para el grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS y el grupo de control de exposición, respectivamente. Las puntuaciones de comportamiento medias fueron 0,00 y 0,12 para el grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS y el grupo de control de exposición, respectivamente. Las puntuaciones de tos medias fueron 0,07 y 0,17 para el grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS y el grupo de control de exposición, respectivamente. Las puntuaciones totales medias fueron 0,08 y 0,35 para el grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS y grupo de control de exposición, respectivamente.

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

Peso corporal y aumento de peso diario promedio

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

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

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

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto.

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

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

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

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

Día(s)	**Grupo[1]**	**Media por LS**	**Intervalo de confianza de 95%**		**Valor de p**
0	1	4,14	3,865	4,405	0,8743
	2	4,17	3,895	4,435	
	Dif. 1-2	-0,03	-0,411	0,351	
14	1	7,64	7,196	8,074	0,4297
	2	7,39	6,951	7,829	
	Dif. 1-2	0,25	-0,376	0,866	
24	1	10,26	9,566	10,944	**0,0063**
	2	8,87	8,176	9,554	
	Dif. 1-2	1,39	0,416	2,364	
ADWG 0 – 14	1	0,2500	0,22898	0,27102	0,1889
	2	0,2304	0,20934	0,25138	
	Dif. 1-2	0,0196	-0,01008	0,04937	
ADWG 14 – 24	1	0,2620	0,22133	0,30267	**0,0003**
	2	0,1475	0,10683	0,18817	
	Dif. 1-2	0,1145	0,05699	0,17201	

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto.

Los pesos corporales medios por LS en Día 0 fueron 4,14 y 4,17 kg para los lechones vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS y el grupo de control de exposición, respectivamente. La diferencia fue -0,03 kg, que no fue significativamente diferente (p=0,8743). En D14, los pesos corporales medios por LS fueron 7,64 y 7,39 kg para el grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS y el grupo de control de exposición, respectivamente. La

diferencia fue 0,25 kg, que tampoco fue significativamente diferente (p=0,4297). En D24, los pesos corporales medios por LS fueron 10,26 y 8,87 para el grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS y el grupo de control de exposición, respectivamente. La diferencia en este día fue 1,39 kg, y el peso del grupo vacunado fue significativamente superior al del grupo de control de exposición (**p=0,0063**).

Los ADWG medios por LS durante el periodo de vacunación (D0-D14) fueron 0,25 y 0,23 kg/d para el grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS y el grupo de control de exposición, respectivamente. Estos valores no fueron significativamente diferentes (p=0,1889). Los ADWG medios por LS durante el periodo después de la exposición (D14-D24) fueron 0,26 y 0,15 para el grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS y el grupo de control de exposición, respectivamente. El ADWG para el grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS fue significativamente superior al ADWG para el grupo de control de exposición (**p=0,0003**).

Temperaturas rectales

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

Tabla 7.19 Temperatura rectal (ºC) Día 13-22

Día	Grupo[1]	N	Mín.	Máx.	Mediana	Media	DE
13	1	20	39,3	40,3	39,80	39,77	0,247
	2	20	38,9	40,0	39,35	39,39	0,292
	3	10	39,0	39,7	39,15	39,26	0,267
14	1	20	39,4	40,2	39,75	39,76	0,226
	2	20	39,0	39,8	39,40	39,37	0,220
	3	10	39,1	40,3	39,40	39,51	0,375
15	1	20	39,3	40,4	39,65	39,69	0,258
	2	20	39,4	41,1	39,70	39,90	0,538
	3	10	39,1	40,3	39,40	39,52	0,371
16	1	20	39,9	41,3	40,80	40,68	0,417

	2	20	39,3	40,3	39,75	39,77	0,279
	3	10	39,1	39,9	39,45	39,46	0,263
17	1	20	39,2	40,6	39,80	39,89	0,363
	2	20	39,4	40,6	39,85	39,90	0,285
	3	10	39,2	40,0	39,50	39,53	0,226
18	1	20	39,3	41,0	39,95	39,99	0,492
	2	20	39,5	41,2	40,20	40,29	0,472
	3	10	38,9	39,7	39,30	39,30	0,211
19	1	20	39,7	41,6	40,35	40,40	0,464
	2	20	39,5	41,1	40,65	40,55	0,451
	3	10	39,0	39,6	39,20	39,22	0,199
20	1	20	39,7	41,5	40,50	40,52	0,449
	2	20	39,5	41,5	40,65	40,61	0,531
	3	10	39,1	40,1	39,40	39,49	0,281
21	1	20	39,6	41,1	40,30	40,22	0,413
	2	20	39,4	41,0	40,10	40,12	0,371
	3	10	39,2	40,2	39,45	39,59	0,351
22	1	20	39,8	41,0	40,20	40,34	0,391
	2	20	39,6	41,2	40,30	40,41	0,437
	3	10	39,0	40,0	39,40	39,45	0,276

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto.

Tabla 7.20 Temperatura rectal (ºC) Día 23-24

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

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto

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

Día	Grupo[1]	Media por LS	Intervalo de confianza de 95%		Valor de p
13	1	39,77	39,648	39,892	**<0,0001**
	2	39,39	39,268	39,512	
	Dif. 1-2	0,38	0,207	0,553	
14	1	39,76	39,654	39,856	**<0,0001**
	2	39,37	39,269	39,471	
	Dif. 1-2	0,39	0,242	0,528	
15	1	39,69	39,494	39,876	0,1241
	2	39,90	39,704	40,086	
	Dif. 1-2	-0,21	-0,480	0,060	
16	1	40,68	40,514	40,836	**<0,0001**
	2	39,77	39,609	39,931	
	Dif. 1-2	0,91	0,678	1,132	
17	1	39,89	39,737	40,033	0,8852
	2	39,90	39,752	40,048	
	Dif. 1-2	-0,02	-0,224	0,194	
18	1	39,99	39,767	40,203	0,0528
	2	40,29	40,072	40,508	
	Dif. 1-2	-0,31	-0,614	0,004	
19	1	40,40	40,188	40,602	0,3065
	2	40,55	40,338	40,752	
	Dif. 1-2	-0,15	-0,443	0,143	
20	1	40,52	40,293	40,737	0,5659
	2	40,61	40,383	40,827	
	Dif. 1-2	-0,09	-0,405	0,225	

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto

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

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

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS a MID, expuesto; Grupo 2= tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto

La temperatura rectal media y media por LS para los lechones vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS fue 39,77ºC en el día antes de la exposición y osciló de 39,69ºC (D15) a 40,68ºC (D16) después de la exposición. La temperatura rectal media y media por LS para los controles de exposición fue 39,39ºC en el día antes de la exposición y osciló de 39,77ºC (D16) a 40,61ºC (D20) después de la exposición. Las temperaturas rectales medias por mínimos cuadrados fueron significativamente inferiores para controles de exposición en comparación con lechones vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS antes de la administración de exposición (D13 y D14) y en D16 después de la exposición (**p<0,0001**). No hubo otras diferencias significativas en temperaturas rectales entre cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS y controles de exposición en este estudio (p≥0,0528). Las temperaturas rectales medias y medias por LS para los controles negativos siguieron siendo ≤ 39,68ºC durante el estudio.

Evaluación clínica después de la vacunación

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

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

Grupo[1]	**Nº de positivos**	**% de positivos**	**IC de 95%**		**Total**	**Valor de p**
1	0	0	0,0	16,8	20	1,0000
2	1	5	0,1	24,9	20	
3	0	0	0,0	30,8	10	NI

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NI = no incluido en el análisis estadístico.

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

Serología del PRRS

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

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

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

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS a MID, expuesto; Grupo 2 = tratado con placebo, expuesto; Grupo 3 = tratado con placebo, no expuesto. NA = no aplicable, no expuesto. NI = no incluido en el análisis estadístico.

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

DISCUSIÓN/CONCLUSIÓN

Para lograr el objetivo del estudio, tres grupos se incluyeron en el diseño del estudio en D0: un grupo de vacunas que recibió 1 x $10^{3,82}$ $TCID_{50}$ de MLV contra el 94881 del PRRS (Grupo 1); un grupo de control de exposición que recibió producto de control (Grupo 2) y un grupo de control negativo (Grupo 3) que también recibió producto de control.

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

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

Validación del estudio (Grupo de control negativo 3)

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

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

Es necesario un modelo de exposición que induzca suficiente enfermedad clínica de PRRS para evaluar adecuadamente la aparición de inmunidad a la vacuna contra el PRRS en un entorno de laboratorio. Tras la inoculación con la cepa aislada del PRRS europea 205817 mediante el procedimiento descrito anteriormente, el grupo de control de exposición presentó una temperatura rectal media de ≥ 40,50ºC en D19, D20 D23 y D24 (≤ 39,68ºC en los mismos días, grupo de control negativo), un ADWG medio de 0,15 kg/día en comparación con un

ADWG medio de 0,34 kg/día para el grupo de control negativo de D14 a D24, comportamiento anormal, tos y una mediana de la puntuación de lesión pulmonar de 55,2% (0,00%; grupo de control negativo). Estos resultados ponen de relieve que la enfermedad clínica específica para PRRS grave se indujo en el grupo de control de exposición aún cuando el título de virus de exposición era ligeramente menor que la dosis elegida como diana, validándose así este modelo de exposición como una herramienta de laboratorio clínico adecuada para evaluar la eficacia de la vacuna contra el PRRS y más específicamente la OOI de MLV contra el 94881 del PRRS.

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

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

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

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

La viremia después de la exposición se seleccionó como el parámetro secundario más importante debido a que representa el nivel de replicación y persistencia vírica que se produce dentro del animal huésped tras la exposición. Una reducción significativa ($p \leq 0,05$) en la viremia se correspondería con una vacuna contra el PRRS que induce inmunidad adecuada para limitar la patogénesis del PRRS dentro del huésped. 3 días después de la exposición (D17), el grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS se asoció a una reducción significativa en la mediana de viremia (qPCR) en comparación con el grupo de control de exposición (6,72 GE/ml frente a 8,18 GE/ml; **$p \leq 0,0001$**). Para evaluar adicionalmente la viremia después de la exposición entre grupos se calculó la cantidad de la carga vírica durante una duración específica de tiempo después de la exposición, como se representa como “área bajo la curva” o ABC. El grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS tuvo una mediana del valor de ABC de D17 a D24 de 49,52 GE/ml/día; mientras que el grupo de control de exposición tuvo una mediana del valor de ABC de 54,35 GE/ml/día. La mediana del valor de ABC fue significativamente menor para el grupo de vacunas en comparación con el grupo de control de exposición de D17 a D24 (**$p=0,0039$**). Si la viremia se examinó 3 días después de la exposición o durante el transcurso del periodo después de la exposición, la MLV contra el 94881 del PRRS administrada 2 semanas antes de exposición a una cepa europea heteróloga virulenta del PRRS redujo significativamente ($p \leq 0,05$) la viremia después de la inoculación de la exposición.

En asociación con una reducción de viremia del PRRS después de la exposición, una reducción significativa ($p \leq 0,05$) en la carga vírica en el tejido de pulmón también sería de gran importancia desde el punto de vista de la inmunidad de la vacuna contra el PRRS. Una reducción de la carga vírica en el tejido de pulmón puede asociarse a una estabilidad vírica reducida, replicación y persistencia dentro del huésped y puede conducir secundariamente a una reducción de la propagación del PRRSv a otros cerdos. En este estudio, los tejidos de pulmón del grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS tuvieron una mediana del resultado de qPCR de pulmón de 7,46 $\log_{10}$ GE/ml 10 días después de la exposición (D24), mientras que el grupo de control de exposición tuvo una mediana del resultado de qPCR de pulmón de 7,88 $\log_{10}$ GE/ml. La diferencia entre el grupo de vacunas y el grupo de control de exposición fue significativa (**$p=0,0101$**), soportándose así adicionalmente una OOI de 2 semanas.

Una reducción marcada en la gravedad y frecuencia de signos clínicos después de la exposición en lechones también soportaría la eficacia de la vacuna contra el PRRS y el establecimiento de una OOI de 2 semanas para MLV contra el 94881 del PRRS. No se observó respiración anormal de suficiente gravedad y frecuencia en ningún grupo después de la

exposición y no se detectaron diferencias (p≥0,1394). En cambio, la gravedad y la frecuencia de la tos fueron aproximadamente iguales entre grupos y no se detectaron diferencias (p≥0,0835). Se detectaron diferencias entre los grupos para gravedad y frecuencia del comportamiento anormal (letargo) después de la exposición. Cero de 20 (0%) y 9 de 20 (45%) lechones vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS y del control de exposición, respectivamente, presentaron comportamiento anormal durante al menos un día después de la exposición (**p=0,0012**). Asimismo, el grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS presentó menores puntuaciones clínicas anormales máximas y clínicas anormales medias después de la exposición en comparación con el grupo de control de exposición (**p=0,0012**). Las puntuaciones clínicas totales (suma de puntuaciones de respiración, comportamiento y tos) fueron significativamente diferentes entre grupos cuando se analizaron las puntuaciones máximas y las puntuaciones medias de D15 a D24. Debido a la influencia de las puntuaciones de comportamientos anormales sobre las puntuaciones totales, el grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS tuvo una puntuación total máxima significativamente menor y puntuación total media menor en comparación con el grupo de control de exposición (**p≤0,0103**). Las diferencias entre los grupos para gravedad y frecuencia de comportamiento anormal soportan adicionalmente una OOI de 2 semanas después de la vacunación.

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

La presencia de comportamiento anormal significativo, viremia, patología pulmonar y carga vírica en tejidos de pulmón debido a PRRS en el grupo de control de exposición produjo diferencias significativas (p≤0,05) entre los grupos para ADWG después de la exposición. En este estudio, los grupos vacunados y de control de exposición tuvieron ADWG medios de D14 a D24 de 0,3 kg/día y 0,1 kg/día, respectivamente, y la diferencia entre grupos fue significativa

(**p=0,0003**). Una diferencia significativa (p≤0,05) entre los grupos para ADWG después de la exposición soporta adicionalmente el establecimiento de una OOI de 2 semanas después de la vacunación.

Parámetros examinados después de la vacunación en este estudio

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

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

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

Conclusión

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

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

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

En el Día 0 (D0), 22 cerdos asignados al grupo vacunado recibieron 1,0 ml IM de MLV contra el 94881 del PRRS ($1 \times 10^{4,27}$ $TCID_{50)}$ IM (Grupo 1), 22 cerdos asignados al grupo de control de exposición recibieron 1,0 ml IM de producto de control (placebo del mismo producto sin MLV contra el 94881 del PRRS, Grupo 2) y 12 cerdos asignados al grupo de control negativo también recibieron 1,0 ml IM de producto de control (Grupo 3). Los Grupos 1 y 2 se expusieron en D179 (día después de la exposición {DPC} 0) a una cepa virulenta del PRRSv europeo y los cerdos se monitorizaron 10 días después de la exposición para signos clínicos, aumento de peso diario promedio y viremia. A los cerdos se les hizo la autopsia en D189 (DPC 10) y se determinaron las lesiones pulmonares macroscópicas e histológicas, y la carga vírica del pulmón.

Las medianas de las puntuaciones de lesión pulmonar macroscópica en D189 (DPC 10) fueron 0,1% y 13,8% para cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS y controles de exposición, respectivamente (**p<0,0001**). Las medianas de las puntuaciones de lesión pulmonar histológica en DPC 10 fueron 6,0 y 19,5 para cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS y controles de exposición, respectivamente (**p<0,0001**). Los cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS tuvieron significativamente menos carga vírica en suero 3, 7 y 10 días después de la exposición en comparación con los controles de exposición (**p≤0,0001**). El análisis del área bajo la curva (ABC) después de la exposición para viremia de DPC 0 a DPC 10 y DPC 3 a DPC 10 también fue significativamente inferior para cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS (15,54 y 8,88 log_{10} GE/ml por día, respectivamente) en comparación con el grupo de control de exposición (44,77 y 36,43 log_{10} GE/ml por día, respectivamente,

p<0,0001). La mediana de valores de qPCR para tejidos de pulmón recogidos en la autopsia fue 3,69 y 6,25 log_{10} GE/ml para cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS y controles de exposición, respectivamente (**p<0,0001**). No hubo diferencias significativas en signos clínicos después de la exposición (p≥0,4878).

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

OBJETIVO(S)/FIN DEL ESTUDIO

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

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

Programa de acontecimientos

Tabla 8.1 Programa de acontecimientos

Día de estudio	**Fechas**	**Acontecimiento clave del estudio**
-7	04-Feb-10	Recogida de muestras de sangre para cribar para estado por ELISA del PRRS negativo
-2	09-Feb-10	Realización del examen de salud
-1 a 21	10-Feb-10-04-Mar-10	Realización diaria de evaluaciones clínicas
0	11-Feb-10	Registro de pesos corporales; recogida de muestras de sangre para serología y viremia; vacunación del Grupo 1 con IVP, vacunación de los Grupos 2 y 3 con CP
7	18-Feb-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
13	24-Feb-10	Vacunación de cerdos con 1,0 ml de la vacuna CircoFlex® Inserción SC de microchip en el cuello izquierdo de cada cerdo en estudio
14	25-Feb-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
21	04-Mar-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
22 a 177	05-Mar-10-07 -Ago-10	Evaluaciones clínicas al menos 3 veces/semana
28	11-Mar-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
56	08 -Abr-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
84	06-May-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
112	03-Jun-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
140	01-Jul-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
168	29-Jul-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
D178 (DPC-1) a D189 (DPC 10)	08-Ago-10-19-Ago-10	Observaciones clínicas y temperaturas rectales diarias

Día de estudio	Fechas	Acontecimiento clave del estudio
D179 (DPC 0)	09-Ago-10	Recogida de pesos corporales; recogida de muestras de sangre para serología y viremia; exposición de Grupos 1 y 2 a la cepa aislada del PRRS europea heteróloga
D182 (DPC 3)	12-Ago-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
D186 (DPC 7)	16-Ago-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia
D188 (DPC 9)	18-Ago-10	Recogida de pesos corporales
D189 (DPC 10)	19-Ago-10	Recogida de muestras de sangre para serología y viremia Sacrificio y autopsia de cerdos Puntuación de lesiones pulmonares para patología Recogida de tejidos de pulmón para el aislamiento del virus e histopatología

Diseño del estudio

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

Tabla 8.2 Diseño del estudio

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

Criterios de cegado

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

Materiales

Producto veterinario en investigación (IVP) y producto de control

Tabla 8.3 IVP

Nombre del producto genérico:	Síndrome reproductor y respiratorio porcino, virus vivo modificado
Cepa:	94881
Producción y formulación:	La producción de BIVI-St. Joseph produjo MLV contra el 94881 del PRRS, lote 390-005 (Sección 15.4), según el Resumen de producción, código 19S1.U_ y el Dosier EU parte 2b. En D0, BIVI-Ames reconstituyó/diluyó la vacuna MLV contra el 94881 del PRRS, lote 390-005, con solución salina tamponada con fosfato (PBS; lote 809-002, Sección 15.5) para formular el IVP, lote nº N257-137, a una dosificación diana de aproximadamente 1 x $10^{4,5}$ $TCID_{50}$/ml.
Fabricante:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506, EE.UU.
Lote nº:	390-005, reconstituido al lote N257-137
Fecha de caducidad:	Se asignó una fecha de caducidad del 11-Feb-10 al IVP sólo para fines de estudio.
Condiciones de almacenamiento:	Vacuna liofilizada: 2-8ºC IVP rehidratado/diluido: sobre hielo

Pruebas:	MLV contra el 94881 del PRRS, lote 390-005, y PBS, lote 809-002, se probaron por BIVI-QC según el borrador del Resumen de producción (Sección 15.1) y como se ha especificado adicionalmente en el Dosier de EU parte 2.F. El personal de laboratorio de BIVI-Ames probó antes de y después de la vacunación alícuotas del IVP para el título de virus según el Procedimiento de títulos de PRRSv (Sección 15.1).
Resultados de las pruebas:	Lote 390-005: Los resultados fueron satisfactorios (Sección 15.4). Lote 809-002: Los resultados fueron satisfactorios (Sección 15.5). Lote de IVP N257-137: Título medio de 1 x $10^{4,27}$ $TCID_{50}$/ml (Sección 15.7).
Retención de IVP:	El IVP sólo se reconstituyó / diluyó para uso inmediato en este estudio y no se retuvo más allá del acontecimiento de vacunación.

Tabla 8.4 CP

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

pruebas:	esterilidad (Sección 15.6). Lote 809-002: Los resultados fueron satisfactorios para esterilidad. Se determinó que CP era estéril (Sección 15.7).
Retención de CP:	CP sólo se reconstituyó para su uso en este estudio y no se retuvo más allá del acontecimiento de vacunación.

Material de exposición

Tabla 8.5 Material de exposición

Nombre/número de cepa aislada	Cepa aislada del PRRS 205817
Localización y fecha de aislamiento, incluidos síntomas clínicos	La cepa aislada del virus del PRRS europeo 205817 se derivó de cepa aislada 190136 originariamente obtenida de tejido de pulmón de un cerdo recién nacido de una granja con signos reproductivos típicos de PRRS (abortos en cerdas y debilidad en cerdos recién nacidos) durante un brote en baja Sajonia, Alemania, en abril de 2004. Los veterinarios enviaron las muestras de pulmón a BioScreen (la muestra llegó el 21 de abril de 2004) para pruebas de diagnóstico. La cepa aislada 190136 se propagó directamente en células MA 104 y se preparó una disolución madre de exposición de cultivo puro. Un cultivo puro de la cepa aislada 190136 se usó para inocular cerdos para la evaluación de su capacidad para reproducir la enfermedad respiratoria específica para PRRS en un ensayo de laboratorio controlado. Los animales expuestos presentaron dificultades respiratorias y revelaron pruebas de neumonía intersticial tras el examen histopatológico. Al virus del PRRS que se volvió a aislar satisfactoriamente de lesiones pulmonares se le dio la designación de cepa aislada 205817. La cepa aislada 205817 se propagó directamente en células MA104 y para su uso en futuros ensayos clínicos de BIVI se preparó una disolución madre de exposición de cultivo puro.
Formulación:	El virus de exposición se propagó en células AK-MA104 y se formuló a un título elegido como diana de aproximadamente 1 x 10^6 $TCID_{50}$/3 ml de dosis en D179. Se preparó un volumen adecuado de material de exposición. Se tomaron dos alícuotas x 5 ml del material de exposición para fines de ensayo antes de que el material de exposición se

	transportara a VRI.
Número de lote:	N270-179
Fabricante:	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. - EE.UU.
Condiciones de almacenamiento	Se almacenó material de exposición a granel a -70 ± 10ºC. Una vez preparado, el material de exposición diluido se mantuvo sobre hielo hasta que se administró.
Pruebas:	El personal del laboratorio de BIVI-Ames probó antes y después de la exposición alícuotas para el título de virus según el Procedimiento de títulos de PRRSv
Resultados de las pruebas:	El material de exposición tuvo un título medio de 1 x $10^{6,27}$ $TCID_{50}$/3 ml de dosis
Vía de administración	1,0 ml/orificio nasal y 1,0 ml IM en el cuello derecho
Retención del material de exposición:	El material de exposición sólo se descongeló / diluyó para este estudio y no se retuvo más allá del acontecimiento de exposición.

Tratamientos

Justificación de la dosificación

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

Pauta de dosificación

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

Tabla 8.6 Pauta de dosificación

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

Tratamientos concomitantes

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

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

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

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

Día 42: EXCEDE® (ceftiofur, Pfizer Animal Health, EE.UU.), 1,0 ml en el jamón izquierdo.

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

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

INFORMACIÓN SOBRE LOS ANIMALES

Detalles de los animales del estudio

Tabla 8.7 Información sobre los animales

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

CRITERIOS DE INCLUSIÓN/EXCLUSIÓN

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

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN DESPUÉS DE LA INCLUSIÓN

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

MANIPULACIÓN Y ALOJAMIENTO DE LOS ANIMALES

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

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

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

Cada habitación en la instalación tenía ventiladores y calefactores para ayudar en la suficiente circulación y el calentamiento del aire. El sistema de ventilación era separado aunque idéntico

para cada habitación, por lo que el aire no era compartido entre habitaciones.

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

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

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA

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

Los parámetros de eficacia secundaria analizados entre el grupo de vacunas y el grupo de control de exposición incluyeron viremia después de la vacunación y después de la exposición, observaciones clínicas después de la exposición, temperaturas rectales después de la exposición, evaluaciones clínicas después de la vacunación, aumento de peso diario promedio (ADWG) y serología del PRRS. La viremia después de la exposición se consideró que era el parámetro secundario más importante ya que es un parámetro objetivo y cuantificable. La

temperatura rectal y las observaciones clínicas se consideraron entonces de apoyo en el procedimiento de definición de DOI. Por último lugar, el rendimiento del crecimiento, la serología y la detección del virus en los pulmones se usaron como parámetros de apoyo hacia los parámetros primarios en satisfacer el objetivo del estudio.

CRITERIOS PARA UNA PRUEBA VÁLIDA

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

PARÁMETRO DE RESULTADOS PRIMARIOS

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

Puntuaciones de lesión pulmonar macroscópica

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

Puntuaciones de lesión pulmonar histológica

Para cada conjunto de pulmones se retuvieron dos muestras de los lóbulos apicales izquierdo y derecho, los lóbulos cardíacos izquierdo y derecho, los lóbulos diafragmáticos izquierdo y derecho y el lóbulo intermedio. Cada muestra de pulmón tenía aproximadamente 1 pulgada (2,54 cm) x 1 pulgada (2,54 cm). Para un conjunto de muestras de pulmón, las tres muestras del lado izquierdo se combinaron en un recipiente; mientras que las tres muestras del lado

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

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

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

Tabla 8.8 Sistema de puntuación de histopatología pulmonar

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

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

Parámetros secundarios

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

qPCR del PRRS en suero

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

Observaciones clínicas después de la exposición

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

Tabla 8.9 Sistema de puntuación de observaciones clínicas

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

Temperaturas rectales

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

Peso corporal y aumento de peso diario promedio

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

qPCR del PRRS en los pulmones

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

Evaluación clínica después de la vacunación

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

Serología del PRRS

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

ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

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

PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS

UNIDAD EXPERIMENTAL

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

ALEATORIZACIÓN

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

168 de un conjunto de cinco cerdos adicionales que cumplieron los criterios de inclusión.

ANÁLISIS

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

Puntuaciones de lesión pulmonar macroscópica

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

Tabla 8.10 Factores para calcular las puntuaciones de lesión pulmonar macroscópica

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

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

Puntuaciones de lesión pulmonar histológica

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

qPCR del PRRS en los pulmones

Los datos de PCR cuantitativa (carga vírica del PRRS [log_{10} GE/ml]) de pulmones recogidos en D189 se usaron para comparaciones entre los grupos de tratamiento por la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney. El promedio (log_{10} GE/ml) de los resultados de qPCR del pulmón izquierdo y derecho se usaron para la evaluación. Antes de los cálculos, el resultado analítico 'no detectado' se sustituyó por log_{10} GE/ml de 0,0 y 'positivo' se sustituyó por 3,0.

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

qPCR del PRRS en suero

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

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

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

Observaciones clínicas después de la exposición

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

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

Peso corporal y aumento de peso diario promedio

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

Temperaturas rectales

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

Evaluación clínica después de la vacunación

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

Serología del PRRS

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

RESULTADOS

Puntuaciones de lesión pulmonar macroscópica

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

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

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

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

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

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. [2] El nº 123 no se puntuó debido a pleuritis difusa y

adhesiones debido a infecciones bacterianas. [3] Un cerdo de MLV contra el 94881 del PRRS y dos cerdos del control de exposición murieron antes de la exposición y no se incluyeron en el análisis. NI = no incluido en el análisis estadístico

Puntuaciones de lesión pulmonar histológica

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

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

Tabla 8.12 Resumen de puntuaciones de lesión pulmonar histológica por grupo

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

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

qPCR del PRRS en los pulmones

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

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

Tabla 8.13 Resumen de los valores de qPCR de pulmón por grupo (media log_{10} GE/ml)

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

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

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

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

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

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

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

qPCR del PRRS en suero

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

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

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

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

Tabla 8.15 Resumen de resultados por qPCR para PRRS en suero (log_{10} GE/ml) de D0 a D168

Día	Grupo[1]	N	Mín.	Máx.	Mediana	IC de 95%		Rango de Q	Media	Valor de p
0	1	22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,0000
	2	22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
7	1	21	3,00	4,63	3,00	3,00	3,00	0,00	3,23	**<0,0001**
	2	22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
14	1	21	0,00	3,00	0,00	0,00	3,00	3,00	1,43	**0,0005**
	2	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
21	1	21	0,00	3,00	0,00	0,00	3,00	3,00	1,29	**0,0013**
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
28	1	21	0,00	3,88	3,00	0,00	3,00	3,00	1,93	**<0,0001**
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
56	1	21	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,57	0,1069
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
84	1	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,0000
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
112	1	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,0000
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
140	1	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,0000
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI
168	1	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,0000
	2	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	3	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NI

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición;

Grupo 3 = grupo de control negativo. NI = no incluido en el análisis estadístico

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

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

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

Después de la vacunación, el grupo de MLV contra el 94881 del PRRS tuvo proporciones de cerdos positivos por qPCR significativamente mayores en D7, D14, D21 y D28 en comparación con el grupo de control de exposición. (**p≤0,0013)**. No se detectó diferencia significativa entre grupos en D56 para la proporción de cerdos positivos por qPCR (p=0,1069).

En D182 (DPC 3), 100% de los cerdos en los grupos de MLV contra el 94881 del PRRS y de

control de exposición fueron positivos por qPCR (no se realizó la prueba). En D186 (DPC 7) y D189 (DPC 10), el grupo de MLV contra PRRS tuvo una proporción de cerdos positivos por qPCR significativamente menor en comparación con el grupo de control de exposición **(<0,0001**).

Los resúmenes de las proporciones por grupo de datos positivos por qPCR se muestran a continuación en las Tablas 8.17 y 8,18.

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

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

Día	Grupo[1]	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Número total	Valor de p
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
140	1	0	0	0,0	16,1	21	n.a.
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
168	1	0	0	0,0	16,1	21	n.a.
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI

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

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

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

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

Observaciones clínicas después de la exposición

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

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

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

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

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

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

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

Parámetro	Grupo[1]	Nº de positivos	% de positivos	IC de 95%		Número total[2]	Valor de p
Total	1	0	0	0,0	16,1	21	0,4878
	2	1	5	0,1	24,9	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI

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

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

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

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

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

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo. [2] Un cerdo de MLV contra el 94881 del PRRS y dos

cerdos del control de exposición murieron antes de la exposición y no se incluyeron en el análisis. NI = no incluido en el análisis estadístico

Las puntuaciones de observaciones clínicas medias siguieron un patrón similar al porcentaje de cerdos con puntuaciones clínicas positivas. No hubo diferencias significativas entre el grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS y el grupo de control de exposición (p≥0,4878).

Un resumen de las puntuaciones de observaciones clínicas medias por grupo para el periodo después de la exposición (DPC 1 a DPC 10) se muestra a continuación en la Tabla 8.21.

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

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

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

Peso corporal y aumento de peso diario promedio

La diferencia entre grupos no fue significativa (p=0,2389). En D179 (DPC 0), los pesos corporales medios y medios por LS fueron 134,6 y 128,2 kg para el grupo de MLV contra el

94881 del PRRS y el grupo de control de exposición, respectivamente. La diferencia no fue significativamente diferente (p=0,1090). En D188 (DPC 9), los pesos corporales medios y medios por LS fueron 138,3 y 130,3 kg para el grupo de MLV contra el 94881 del PRRS y el grupo de control de exposición, respectivamente. El peso corporal para el grupo vacunado fue significativamente superior al del grupo de control de exposición en D188 (**p=0,0455**).

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

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

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

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

Día(s)	Grupo[1]	N	Mín.	Máx.	Mediana	Media	DE
Pesos corporales en 0	1	22	2,8	5,4	4,00	3,96	0,730
	2	22	2,4	4,8	3,75	3,72	0,547
	3	12	2,7	4,5	3,60	3,71	0,552
Pesos corporales en D179 (DPC 0)	1	21	108,5	155,0	136,60	134,57	12,737
	2	20	103,3	152,6	130,10	128,15	12,288
	3	12	117,2	156,5	133,05	134,61	10,900
Pesos corporales en D188 (DPC 9)	1	21	112,2	157,8	141,50	138,28	12,879
	2	20	109,4	150,9	131,90	130,27	11,896
	3	12	120,0	162,5	136,60	139,11	11,922

ADWG DPC 0 a DPC 9	1	21	-0,422	0,956	0,4111	0,4124	0,31653
	2	20	-0,589	0,844	0,2889	0,2350	0,36530
	3	12	-1,600	2,656	0,5111	0,5000	0,92391

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo

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

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

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo

Temperaturas rectales

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

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

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

Día	Grupo[1]	N[2]	Mín.	Máx.	Mediana	Media	DE
D179 (DPC 0)	1	21	38,5	40,0	39,40	39,33	0,360
	2	20	38,6	40,0	39,00	39,07	0,380
	3	12	38,8	39,7	39,30	39,27	0,257
D180 (DPC 1)	1	21	38,7	40,4	39,40	39,46	0,370
	2	20	38,9	40,9	39,60	39,61	0,527
	3	12	38,8	39,5	39,00	39,09	0,227
D181 (DPC 2)	1	21	39,0	41,0	39,80	39,82	0,473
	2	20	38,6	40,5	39,35	39,42	0,487
	3	12	38,8	39,2	38,80	38,90	0,141
D182 (DPC 3)	1	21	38,5	40,6	39,50	39,52	0,542
	2	20	39,0	41,1	40,05	39,86	0,588
	3	12	38,7	39,4	39,00	39,05	0,254
D183 (DPC 4)	1	21	38,9	40,8	39,50	39,52	0,411
	2	20	38,4	40,3	39,00	39,08	0,508
	3	11	38,8	39,4	39,10	39,08	0,209
D184 (DPC 5)	1	21	39,0	40,3	39,70	39,72	0,360
	2	20	38,7	39,7	39,10	39,15	0,302
	3	12	38,8	39,5	39,10	39,10	0,191
D185 (DPC 6)	1	21	39,1	40,5	39,60	39,66	0,376
	2	20	38,9	40,9	39,25	39,48	0,546
	3	12	38,4	39,4	38,85	38,88	0,313
D186 (DPC 7)	1	21	38,1	40,4	39,20	39,22	0,413
	2	20	38,6	40,4	39,35	39,39	0,479
	3	12	38,5	39,6	38,90	38,98	0,328
D187 (DPC 8)	1	21	38,8	39,9	39,20	39,23	0,290
	2	20	38,8	40,8	39,45	39,58	0,573
	3	12	38,5	39,5	38,85	38,93	0,296

Día	Grupo[1]	N[2]	Mín.	Máx.	Mediana	Media	DE
D188 (DPC 9)	1	21	38,8	39,9	39,10	39,17	0,288
	2	20	38,3	40,5	39,00	39,20	0,598
	3	12	38,4	39,1	38,85	38,85	0,173
D189 (DPC 10)	1	21	38,7	39,7	39,00	39,06	0,256
	2	20	39,0	40,8	39,50	39,51	0,408
	3	12	38,6	39,3	39,05	39,00	0,226

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

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

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

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

Día	Grupo[1]	Media por LS	Intervalo de confianza de 95%		Valor de p
(DPC 2)	2	39,42	39,198	39,632	
	Dif. 1-2	0,41	0,105	0,712	
D182 (DPC 3)	1	39,52	39,274	39,773	0,0642
	2	39,86	39,604	40,116	
	Dif. 1-2	-0,34	-0,693	0,021	
D183 (DPC 4)	1	39,52	39,320	39,727	**0,0034**
	2	39,08	38,867	39,283	
	Dif. 1-2	0,45	0,158	0,740	
D184 (DPC 5)	1	39,72	39,572	39,866	**<0,0001**
	2	39,15	38,999	39,301	
	Dif. 1-2	0,57	0,359	0,779	
D185 (DPC 6)	1	39,66	39,457	39,869	0,2164
	2	39,48	39,269	39,691	
	Dif. 1-2	0,18	-0,112	0,478	
D186 (DPC 7)	1	39,22	39,027	39,421	0,2408
	2	39,39	39,188	39,592	
	Dif. 1-2	-0,17	-0,448	0,116	
D187 (DPC 8)	1	39,23	39,034	39,432	**0,0183**
	2	39,58	39,376	39,784	
	Dif. 1-2	-0,35	-0,631	-0,062	
D188 (DPC 9)	1	39,17	38,966	39,377	0,8454
	2	39,20	38,989	39,411	
	Dif. 1-2	-0,03	-0,323	0,266	
D189 (DPC 10)	1	39,06	38,908	39,207	**0,0001**
	2	39,51	39,352	39,658	
	Dif. 1-2	-0,45	-0,662	-0,234	

[1] Grupo 1 = vacuna MLV contra el 94881 del PRRS; Grupo 2 = grupo de control de exposición; Grupo 3 = grupo de control negativo

Tres de 21 (14%) cerdos vacunados con MLV contra el 94881 del PRRS y 5 de 20 (25%) controles de exposición tuvieron una temperatura rectal ≥ 40,5ºC durante al menos un día

después de la exposición. No se detectó diferencia entre grupos para la proporción de cerdos que presentó a temperatura rectal ≥ 40,5ºC durante al menos un día después de la exposición (p=0,4537). Un resumen de la proporción por grupo de cerdos con fiebre (≥ 40,5ºC) durante al menos un día después de la exposición se muestra a continuación en la Tabla 8.26.

Tabla 8.26 Resumen de la proporción por grupo de fiebre (≥ 40,5ºC) durante al menos un día después de la exposición

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

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

Evaluación clínica después de la vacunación

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

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

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

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

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

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

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

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

Serología del PRRS

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

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

Los cerdos en el grupo de control negativo fueron seronegativos por ELISA para PRRS durante el estudio, con la excepción de dos cerdos en D112. Los números 116 y 120 fueron seropositivos por ELISA para PRRS en D112.

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

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

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

140	1	21	100	83,9	100,0	21	**<0,0001**
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
168	1	20	95	76,2	99,9	21	**<0,0001**
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI

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

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

Día	**Grupo[1]**	**Nº de positivos**	**% de positivos**	**IC de 95%**		**Número total**	**Valor de p**
D179 (DPC 0)	1	20	95	76,2	99,9	21	**<0,0001**
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
D182 (DPC 3)	1	20	95	76,2	99,9	21	**<0,0001**
	2	0	0	0,0	16,8	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
D186 (DPC 7)	1	21	100	83,9	100,0	21	**<0,0001**
	2	6	30	11,9	54,3	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI
D189 (DPC 10)	1	21	100	83,9	100,0	21	**0,0478**
	2	16	80	56,3	94,3	20	
	3	0	0	0,0	26,5	12	NI

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

DISCUSIÓN/CONCLUSIÓN

Para lograr el objetivo del estudio, veintidós (22) cerdos sanos, susceptibles y seronegativos para PRRS se inocularon IM con 1 ml de MLV contra el 94881 del PRRS a aproximadamente

14 días de edad. Treinta y cuatro (22 cerdos del grupo de control de exposición y 12 cerdos del grupo de control negativo) cerdos susceptibles y seronegativos para PRRS se inocularon IM con 1 ml de producto de control a aproximadamente 14 días de edad.

Validación del estudio y modelo de exposición

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

Tras la inoculación con la cepa aislada del PRRS europea 205817 mediante el procedimiento descrito anteriormente, el grupo de control de exposición presentó un ADWG medio de DPC 0 a DPC 9 de 0,2 kg/día (un ADWG medio de 0,5 kg/día para el grupo de control negativo), una mediana de la puntuación de lesión pulmonar macroscópica de 13,8% (0,0% para el grupo de control negativo), una mediana de la puntuación de lesión pulmonar histológica de 19,5 (9,0 para el grupo de control negativo) y un valor medio de 6,25 $\log_{10}$ GE/ml para la detección de ARN del PRRSv en el tejido de pulmón (mediana de 0,0 $\log_{10}$ GE/ml para el grupo de control negativo). Estos resultados ponen de relieve que la enfermedad clínica específica para PRRS se indujo en el grupo de control de exposición, validándose así este modelo de exposición como una herramienta de laboratorio clínico adecuada para evaluar la eficacia de la vacuna contra el PRRS y más específicamente una duración de26 semanas de inmunidad de MLV contra el 94881 del PRRS.

Determinación de la duración de 26 semanas de la inmunidad de MLV contra el 94881 del PRRS

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

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

El grupo de MLV contra el 94881 del PRRS presentó una reducción significativa en la patología pulmonar macroscópica después de la exposición, como se demuestra por una mediana de la puntuación de lesión pulmonar macroscópica de 0,1% en comparación con el grupo de control de exposición, que presentó una mediana de la puntuación de lesión pulmonar macroscópica de 13,8% (**p<0,0001**). Además, el grupo de MLV contra el 94881 del PRRS presentó una reducción significativa en las puntuaciones de lesión pulmonar histológica, como se demuestra por una mediana de la puntuación de lesión pulmonar de histología de 6,0 para el grupo de MLV contra el 94881 del PRRS en comparación con una mediana de la puntuación de lesión pulmonar de histología de 19,5 para el grupo de control de exposición (**p<0,0001**). Por tanto, la DOI de 26 semanas para MLV contra el 94881 del PRRS a la dosificación de $1 \times 10^{4,27}$ $TCID_{50}$ se estableció basándose en el parámetro primario de una reducción significativa para lesiones pulmonares después de la exposición. Este resultado se logró con una dosis de vacuna ligeramente menor que la dosis de inmunización mínima elegida como diana de $1 \times 10^{4,5}$ $TCID_{50}$/ml. Un cerdo del control de exposición (nº 123) no pudo puntuarse para lesiones pulmonares macroscópicas debido a pleuritis y adhesiones debido a infecciones bacterianas, pero se puntuó para lesiones pulmonares histológicas. La omisión de este cerdo del grupo de control del análisis de la puntuación de lesión pulmonar macroscópica de la exposición no afectó el resultado de este estudio.

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

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

Una reducción marcada en la gravedad y la frecuencia de signos clínicos después de la exposición en cerdos también soportaría la eficacia de la vacuna contra el PRRS y el

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

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

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

Parámetros examinados después de la vacunación en este estudio

Se encontraron muertos tres cerdos durante la fase de vacunación de este estudio. El cerdo 179 (vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS) se encontró muerto en D6 asociado a infecciones por *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. sin complicaciones. El cerdo 161 (grupo de control de exposición) se encontró muerto en D10 asociado a infecciones por *Bordetella bronchiseptica, Streptococcus* alfa hemolítico y *Staphylococcus auricularis*. El cerdo 124 (grupo de control de exposición) se encontró muerto en D21 asociado a una infección por

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

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

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

7, 14, 21 y 28 días después de la vacunación, el grupo vacunado con MLV contra el 94881 del PRRS presentó las medianas de resultados de qPCR de 3,00, 0, 0 y 3,00 $\log_{10}$ GE/ml,

respectivamente. Estos resultados ponen de relieve que en el plazo de 4 semanas desde la vacunación, una dosificación de 1 x $10^{4,27}$ $TCID_{50}$ de MLV contra el 94881 del PRRS indujo suficiente replicación de la MLV que frecuentemente se requiere para construir la inmunidad protectora ya a las 4 semanas después de la vacunación. En cambio, el grupo de control de exposición fue negativo para viremia del PRRS hasta tres días después de la exposición.

Conclusión

Una reducción significativa ($p \leq 0,05$) de lesiones pulmonares macroscópicas e histológicas en la autopsia, la carga vírica en tejidos de pulmón en la autopsia y la viremia después de la exposición para el grupo de MLV contra el 94881 del PRRS en comparación con el grupo de control de exposición demostró la eficacia de la vacuna contra el PRRSv virulento cuando se vacunó a las 2 semanas de edad y se expuso a las 26 semanas después de la vacunación. Por tanto, los resultados de este estudio soportan la demostración de la duración de la inmunidad de 26 semanas después de la vacunación con MLV contra el 94881 del PRRS. Estos resultados se alcanzaron con una dosis de vacuna de 1 x $10^{4,27}$ $TCID_{50}$/ml, que fue ligeramente menor que la dosis de inmunización mínima (1 x $10^{4,5}$ $TCID_{50}$/ml).

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

SEC ID Nº:1: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA del virus de siembra maestro del PRRS de 94881

1 TTTGTGTACC TTGGAGGCGT GGGTACAGCC CTGCCCCACC CTTTGGTCCC TGTTCTAGCC
61 CGACAAGTAC CCTTCTCTCT CGGGGCGAGC GCGCCGCCTG CTGCTCCCTT GCGGCGGGAA
121 GGACCTCCCG AGTATTTCCG GAGAGCACCT GCTTTACGGG ATCTCCGCCC TTTAACCATG
181 TCTGGGATGT TCTCCCGGTG CATGTGCACC CCGGCTGCCC GGGTATTTTG GAACGCCGGC
241 CAAGTCTATT GCACACGGTG TCTCAGTGCA CGGTCTCTTC TCTCTCCAGA ACTTCAGGAC
301 ACGGACCTCG GTGCAGTTGG CTTGTTTCAC AAGCCTAAAG ACAAGCTCCA TTGGAAAGTT
361 CCCATTGGTA TCCCCCAGGT GGAATGTTCT CCATCTGGGT GTTGCTGGCT GTCAACCATT
421 TTTCCTTTAG CGCGCATGAC CTCCGGCAAT CACAACTTCC TTCAACGACT CGTGAAGGTT
481 GCTGATGTAT TGTACCGTGA CGGTTGCTTA ACCCCTAGAC ACCTCCGTGA ACTCCAAGTT
541 TACGAGCGTG GTTGCAATTG GTATCCGATT ACGGGGCCTG TGCCTGGGAT GGCTGTGTAC
601 GCGAACTCCA TGCACGTGTC CGACCAACCG TTCCCTGGTG CCACTCATGT GTTAACAAAT
661 TCCCCTTTGC CTCAACGGGC TTGTCGGCAG CCGTTCTGTC CGTTCGAAGA GGCCCATTCT
721 AGCATATACA GGTGGGAAAA ATTTGTAATT TTTATGGATT CCTCCTCCGA CGGTCGATCT
781 CGCATGATGT GGACTCCGGA ATCCGATGAC TCCACGGCTT TGGAAGTTCT GCCGCCCGAG
841 CTAGAACACC AGGTCAAGGT CCTTGTTCGG AGCTTTCCCG CCCATCACCT TGTCGACCTT
901 GCCGATTGGG AGCTCACTGA GTCCCCTGAT AACGGTTTTT CCTTCAGCAC GTCACATCCT
961 TGCGGCTACC TTGTTCGGGA CCCGGCTGTA TCCGAAGGCA AGTGTTGGCT TTCCTGCTTT
1021 TTGAGCCAGT CAGCCGAAGT GCTCAGTCGC GAGGCGCATC TGGCTACCGC CTATGGTTAC
1081 CAAACCAAGT GGGGTGTGCC TGGCAAGTAC ATCCAGCGCA GACTTCAAGT TCACGGTCTC
1141 CGTGCTGTGG TCGACCCTGA TGGTCCCATT CACGTTGAAG CATTGTCTTG CCCCCAGTCT
1201 TGGATCAGGC ACTTGACCCT GAATGATGAT GTCACCCCGG GATTCGTTCG CCTAATGTCT
1261 CTTCGCATTG TGCCGAACAC AGAGCCTACC ACACACCGGA TCTTTCGTTT TGGAGTGCAC
1321 AAGTGGTATG GTGCCGCCGG CAAACGGGCC CGTGGCAAGC GTGCCGCCAA AAGTGAGAAA
1381 GACTCGGCTT CCACCCTCAA GGTTGCCCGA CCGACTTCCA CCAGTGGAAT CGTCACCTAC
1441 TCCCCACCTG CGGACGGGTC TTGTGGTTGG CATGCCCTTG CCGCCATACT GAACCGGATG
1501 ATTAATAATG ACTTCACGTC CCCTCTGCCT CGGTACAACA GGCCGGAGGA CGATTGGGCT
1561 TCTGATGGTG ACCTTGCTCA GGCCATTCAA TGTTTGCAAC TACCTGCCGC CATAGCTCGG
1621 AACCGCGCCT GCCCTAACGC CAAATACCTC ATAAAACTCA ACGGAGTTCA TTGGGAGGTA
1681 GAGGTGAGGC CTGGAATGGC TCCTCGCTCC CTCTCTCGTG AGTGCGTTGT TGGCGTCTGC
1741 TCTGAAGGCT GTGTCGCGTC GCCTTACCCG GAGGACGGGT TGCCTAAACG TGCACTTGAG

1801 GCCCTGGCGT CTGCTTATAG ACTGCCTTCA GACTGTGTTT GTGATGGTAT TATTGACTTC
1861 CTTGCCAATC CACCTCCCCA GGAGTTCTGG ACTCTTGACA AAATGTTGAC TTCCCCGTCA
1921 CCGGAGCAGT CCGGCTTCTC TAGTCTGTAT AAATTGTTGT TAGAGATCTT GCCGCAGAAA
1981 TGCGGATCCA CAGAAGGGGA ATTCATCTAT ACTGTTGAGA GGATGTTGAA GGATTGTCCG
2041 AGCTCCAAAC AGGCCATGGC CCTCCTTGCA AAAATTAAGG TCCCATCCTC AAAGGCCCCA
2101 TCCGTGACTC TGAACGAGTG CTTCCCCACG GATGTTCCAG TCAACTCTGA GTTAATATCT
2161 TGGGAAGAGC CCAAAGACCC TGGCGCTGCT GTTGTCCTAT GTCCATCGGA TGCAAAAGAA
2221 TCTAAGGAAA CAGCCCCTGA AGAAGCTCAA GCGAGAAACC GTAAGGTCCT TCACCCTGTG
2281 GTCCTTACCG AGGAACTTAG CGAGCAACAG GTGCAGGTGG TTGAGGGTGA TCAGGATATG
2341 CCACTGGATT TGACTTGGCC AACCTTAACC GCTACGGCGA CCCCTGTTAG AGGGCCGGTA
2401 CCGGACAATT TGAGCTCTGG CATTGGTGCC CAGCCCGCTA CCGTTCAAGA ACTCATTCTG
2461 GCGAGGCCTG CACCCCGTCT TGTTGAGCGC TGTGGCACGG AGTCGAACGG CAGCAGTTCA
2521 TTTCTGGATT TGCCTGACGT GCAGACCTCG GACCAGCCTT TAGACCTGTC CCTGGCCGCG
2581 TGGCCTGTAA GGGCTACCGC GTCTGACCCC GGTTGGATCC ACGGTAGGCG TGAGCCTGTC
2641 TTTGTGAAGC CTCGAGGTGT TTTCTCTGAT GGCGAGTCGG CCCTTCAGTT CGGAGAGCTT
2701 TCCGAAGCCA GTTCTGTCGT CGATGACCGG ACAAAAGAAG CTCCGGTGGT TGACGCCCCC
2761 ATCGATTTGA CAACTTCGAA CGAGACGCTC TCTGGGTCTG ACCCCTTTGA ATTCGCCAAA
2821 TTCAGGCGCC CGCGTTTCTC CGCGCAAGCT TTAATCGACC GAGGTGGTCC GCTTGCCGAT
2881 GTTCATGCAA AGATAAAGAG TCGGGTATAT GAACAATGCC TTCAAGCTTG TGAACCTGGT
2941 AGTCGTGCGA CCCCAGCCAC CAAGAAGTGG CTCGACAAAA TGTGGGACAG GGTGGACATG
3001 AAAACTTGGC GCTGCACCTC GCAGTTCCAA GCTGGTCACA TTCTTGAGTC CCTCAAATTC
3061 CTCCCTGACA TGATTCAAGA CACACCGCCT CCTGTTCCCA GGAAGAACCG AGCTGGTGAC
3121 AGTGCCGGCC TGAAGCAACT GGTGGCGCAG TGGGATAGGA AATCGAGTGT GACACCCCCC
3181 ACAAAACCGG TTGGACCGGT GCTTGACCAG GCCGTCCCTC TGCCTATGGA CATCCAGCAA
3241 GGAGATGCCA TCTCCGCTGA CAAGCCACCC CATTCGCAAA ACCCTTCTAG TCAAGTAGAT
3301 GTGGGTGGAG GTTGGAAAAG TTTTATGCTC TCCGGCACCC GTTTCGCGGG GTCCGTTAGT
3421 CTTTTCTCGC CACGGGGCTC TATGGCTCCA GGTGATTGGC TGTTTGCAGG TGCTGTTCTA
3481 CTTGCTCTCC TGCTCTGCCG TTCTTACCCA ATACTCGGAT GCCTTCCCTT ATTGGGTGTC
3541 TTTTCTGGTT CTGTGCGGTG TGTTCGTTTG GGTGTTTTTG GTTCTTGGAT GGCTTTTGCT
3601 GTATTTTTAT TCTCGACTCC ACCCGACCCA GTCGGTTCTT CTTGTGACCA CGATTCGCCG
TGTGCGCAGC
3721 CTTGTGGTCG GGCCATCGGG CCTCTTATGC GTCATTCTTG GCAAGTTACT CGGTGGGTCA
3781 CGTTGTCTCT GGTTTGTTCT CCTACGTATA TGCATGCTCG CAGATTTGGC AATTTCTCTT
3841 ATTTATGTGG TGTCCCAAGG GCGTTGTCAC AAGTGTTGGG GAAAGTGTAT AAGGACGGCT
3901 CCTGCAGAAG TGGCCCTTAA TGTGTTTCCT TTTTCGCGCG CCACCCGCTC ATCTCTTGTG
3961 TCCTTGTGTG ATCGGTTCCA AGCGCCAAAA GGAGTTGACC CCGTGCACTT GGCGACAGGC
4021 TGGCGCGGGT GCTGGTGTGG TGAGAGCCCT ATTCATCAAT CACACCAAAA ACCGATAGCT

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

6301 GCTTGCAAGT TGTCGCAAGC TGACCTTGAT TTTTTGTCCA GTTTAACGAA CTTCAAGTGC
6361 TTTGTGTCCG CTTCAAACAT GAAAAATGCA GCTGGCCAAT ACATCGAGGC GGCGTATGCT
6421 AGAGCTCTGC GTCAGGAGCT GGCCTCCTTG GTTCAGGTTG ACAAGATGAA AGGAGTATTG
6481 GCCAAGCTCG AGGCTTTCGC TGAGACGGCC ACTCCGTCAC TTGACACAGG GGACGTGATT
6541 GTTCTGCTTG GGCAACACCC CCATGGATCC ATCCTCGACA TTAATGTGGG GGGTGAAAGG
6601 AAAACTGTGT CTGTGCAAGA AACACGATGC CTGGGTGGTT CCAAATTCAG TGTCTGCACT
6661 GTCGTGTCCA ACACGCCCGT GGATACCTTG ACCGGTATCC CACTTCAGAC GCCAACCCCA
6721 CTTTTTGAAA ATGGCCCGCG CCATCGCAGC GAGGACGACG ACCTCAAAGT TGAGAGAATG
6781 AAAAAACACT GTGTATCCCT CGGCTTCCAC AAAATCAATG GTAAAGTTTA CTGCAAAATT
6841 TGGGACAAGT CTAACGGCGA CACCTTTTAC ACGGATGATT CCCGATACAC TCAAGACCAT
6901 GCTTTTCAGG ACAGGTCAAC CGACTATAGA GACAGGGATT ATGAAGGTGT ACAGACCGCC
6961 CCCCAACAGG GATTCGATCC AAAGTCCGAA GCCCCTGTTG GCACTGTTGT AATCGGTGGC
7021 ATTACGTATA ACAGGCATCT GGTCAAAGGT AAGGAGGTCC TAGTTCCCAA ACCTGACAAC
7081 TGCCTTGAAG CTGCCAGACT GTCCCTTGAG CAAGCTCTTG CTGGGATGGG CCAAACTTGT
7141 GACCTTACAG CTACCGAAGT GGAGAAACTA AAGCGCATCA TTAGTCAACT CCAAGGTCTG
7201 ACCACTGAAC AGGCTTTAAA CTGCTAGCCG CCAGCGGCTT GACCCGCTGT GGCCGCGGCG
7261 GCCTAGTTGT AACTGAAACG GCGGTAAAAA TCGTAAAATA CCACAGCAGA ACTTTCACCT
7321 TAGGCTCTTT AGACCTAAAA GTCACCTCCG AGGTGGAGGT GAAGAAATCA ACTGAGCAGG
7381 GGCACGCTGT CGTGGCGAAC TTATGTTCCG GTGTCGTCTT GATGAGGCCT CACCCACCGT
7441 CCCTTGTTGA CGTTCTCCTC AAACCCGGAC TTGACACAAC ACCCGGCATT CAACCAGGGC
7501 ATGGGGCCGG GAATATGGGC GTGAACGGTT CTATTTGGGA TTTTGAAACT GCACCCACAA
7561 AGGTAGAACT AGAGTTGTCC AAGCAAATAA TCCAAGCATG TGAAGTCAGG CGCGGGGACG
7621 CCCCTAACCT CCAACTCCCC TACAAGCTTT ATCCTGTCAG GGGGGACCCC GAGCGGCGTA
7681 AAGGTCGCCT TGTCAACACT AGGTTTGGAG ATTTACCTTA CAAAACTCCC CAAGACACCA
7741 AGTCCGCAAT TCATGCGGCT TGTTGCCTGC ATCCCAATGG GGTCCTCGTG TCTGATGGCA
7801 AATCCACGCT GGGTACCACT CTTCAACATG GTTTCGAGCT TTATGTCCCC ACTGTACCTT
7861 ATAGTGTCAT GGAATACCTT GATTCACGCC CTGACACCCC TTTTATGTGT ACTAAACATG
7921 GCACTTCCAA GGCTGCTGCA GAGGACCTCC AAAAATATGA CCTATCCACT CAAGGGTTTG
7981 TCTTGCCTGG GGTCCTACGC CTAGTGCGCA GGTTCATCTT TAGCCATGTT GGTAAGGCGC
8041 CACCACTGTT CCTTCCATCA ACCTACCCTG CCAAGAACTC CATGGCAGGG GTCAATGGCC
8101 AGAGGTTCCC AACAAAGGAT GTCCAGAGCA TACCTGAAAT TGATGAAATG TGCGCCCGTG
8161 CCGTCAAGGA AAATTGGCAG ACTGTGACAC CTTGCACCCT CAAAAAACAG TACTGTTCCA
8221 AACCTAAAAC TAGAACCATC CTAGGTACCA ACAACTTCAT AGCCTTGGCT CACAGGTCAG
8281 CACTCAGTGG TGTCACCCAG GCGTTCATGA AGAAGGCCTG GAAGTCCCCA ATTGCCTTGG
8341 GGAAAAACAA GTTTAAGGAA TTGCATTGCA CTGTCGCCGG CAGATGCCTT GAGGCTGACC
8401 TGGCTTCCTG CGATCGCAGC ACCCCCGCCA TTGTGAGGTG GTTTGTTGCC AACCTCCTGT
8461 ATGAACTTGC AGGATGTGAA GAGTACTTGC CTAGCTACGT GCTCAACTGT TGCCATGACC

8521 TTGTGGCAAC GCAGGATGGC GCTTTCACAA AACGCGGTGG CCTGTCGTCC GGGGACCCCG
8581 TCACCAGTGT GTCCAACACC GTCTACTCAC TGATAATTTA CGCCCAGCAC ATGGTGCTTT
8641 CGGCCTTGAA GATGGGTCAT GAAATTGGTC TCAAGTTCCT TGAGGAACAG CTCAAATTTG
8701 AGGACCTTCT TGAAATCCAG CCCATGTTAG TGTATTCTGA TGACCTCGTC TTGTATGCGG
8761 AAAGACCCAC TTTTCCCAAC TACCATTGGT GGGTCGAGCA TCTTGACCTG ATGTTGGGCT
8821 TTAAAACGGA CCCAAAGAAA ACTGTCATAA CTGATAAACC CAGTTTTCTC GGCTGCAGAA
8881 TTGAAGCAGG ACGGCAGTTA GTCCCCAATC GCGACCGTAT TCTGGCTGCT CTTGCATATC
8941 ATATGAAGGC GCAGAACGCC TCAGAGTATT ATGCGTCCGC TGCCGCAATT CTGATGGATT
9001 CGTGTGCTTG CATTGACCAT GACCCCGAGT GGTATGAGGA TCTTATCTGC GGCATCGCCC
9061 GGTGTGCTCG CCAGGACGGT TACCGTTTTC CAGGCCCGGC ATTTTTCATG TCCATGTGGG
9121 AGAAGCTGAA AAGTCATAAT GAAGGGAAGA AATGCCGTCA CTGCGGCATC TGCGACGCCA
9181 AAGCCGACTA TGCGTCCGCC TGTGGACTTG ATTTGTGTTT GTTCCATTCA CACTTTCATC
9241 AACACTGCCC AGTCACTCTG AGCTGTGGCC ACCATGCCGG TTCAAAGGAA TGTTCGCAGT
9301 GTCAGTCACC TGTCGGGGCT GGCAAATCCC CCCTTGACGC TGTGCTGAAA CAAATCCCGT
9361 ACAAACCTCC TCGTACCATT ATCATGAAGG TGGACAACAA AACAACGACC CTTGACCCGG
9421 GAAGATATCA GTCCCGTCGA GGTCTTGTTG CAGTCAAAAG AGGTATTGCA GGTAATGAGG
9481 TTGATCTTTC TGATGGAGAC TACCAAGTGG TGCCTCTTTT GCCGACTTGC AAAGACATAA
9541 ACATGGTGAA GGTGGCTTGC AACGTACTAC TCAGCAAGTT TATAGTAGGG CCGCCAGGTT
9601 CCGGAAAAAC CACCTGGCTA CTGAACCAAG TCCAGGACGA TGATGTCATT TACACACCTA
9661 CTCATCAGAC AATGTTTGAC ATAGTCAGTG CTCTTAAAGT TTGCAGGTAT TCCATCCCAG
9721 GAGCCTCAGG ACTCCCTTTT CCACCACCTG CCAGGTCCGG GCCGTGGGTT AGGCTCATCG
9781 CCAGCGGACA TGTCCCTGGC CGAGTGTCAT ATCTCGATGA GGCAGGATAT TGCAATCATC
9841 TAGACATTCT AAGGCTGCTT TCCAAAACAC CCCTTGTGTG TTTGGGTGAC CTTCAGCAAC
9901 TTCACCCGGT CGGCTTTGAT TCCTATTGTT ATGTGTTCGA TCAGATGCCT CAGAAGCAGC
9961 TGACCACCAT TTATAGATTT GGCCCTAACA TCTGTGCAGC CATCCAGCCT TGTTACAGGG
10021 AGAAACTTGA ATCCAAGGCC AGGAACACCA GAGTGGTTTT CACCACCCGG CCTGTGGCCT
10081 TTGGTCAGGT CCTGACACCG TACCACAAAG ATCGTACCGG CTCTGCAATA ACTATAGATT
10141 CATCCCAGGG GGCGACCTTC GACATTGTGA CATTGCATCT ACCATCGCCA AAGTCCCTAA
10201 ACAAATCCCG AGCACTTGTA GCCATCACTC GGGCAAGACA TGGGTTGTTC ATTTATGACC
10261 CTCATGACCA ACTCCAGGAG TTTTTCAACT TAACCCCCGA GCGCACTGAT TGTAACCTTG
10321 CGTTCAGCCG TGGGGATGAG CTGGTTGTTT TGAATGTGGA TAATGCGGTC ACAACTGTAG
10381 CGAAGGCCCT AGAGACAGGT TCACCCCGAT TTCGAGTATC GGACCCGAGG TGCAAGTCTC
10441 TCTTAGCCGC TTGTTCGGCC AGTCTAGAAG GGAGCTGCAT GCCACTACCA CAAGTAGCAC
10501 ATAACCTGGG GTTTTACTTT TCCCCGGACA GCCCAGCTTT TGCACCCCTG CCAAAAGAGC
10561 TGGCGCCACA TTGGCCAGTG GTCACCCACC AGAATAATCG AGCGTGGCCT GATCGACTTG
10621 TCGCTAGTAT GCGCCCAATT GATGCCCGCT ACAGCAAGCC AATGGTCGGT GCAGGGTATG
10681 TGGTCGGGCC ATCCATTTTT CTTGGCACTC CTGGTGTGGT GTCATACTAT CTCACATTAT

10741 ACATCGGGGG CGAGCCTCAG GCCCTGCCAG AAACACTCGT TTCAACAGGA CGTATAGCCA
10801 CAGATTGTCG GGAATATCTC GACGCGGCTG AGGAAGAGGC AGCGAGAGAA CTTCCCCACG
10861 CATTTATTGG CGATGTCAAA GGCACTACGA TCGGGGGGTG TCACCACATT ACATCGAAAT
10921 ACCTACCTAG GTCCCTGCCT AAAGACTCTG TTGCTGTGGT TGGGGTGAGT TCGCCCGGTA
10981 GGGCTGCTAA AGCCGTGTGC ACTCTCACCG ATGTGTACCT CCCCGAACTC CGACCATATT
11041 TGCAACCGGA GACGGCATCA AAATGCTGGA AACTTAAACT GGATTTCAGG GATGTTCGAC
11101 TGATGGTCTG GAAAGGCGCC ACAGCCTATT TCCAGTTGGA AGGGCTGACA TGGTCAGCGC
11161 TGCCCGATTA TGCTAGGTTC ATTCAGCTAC CCAAGGATGC CGTTGTGTAC ATCGATCCGT
11221 GTATAGGGCC GGCAACAGCC AATCGCAAGG TTGTGCGAAC CACAGACTGG CGGGCCGACC
11281 TGGCAGTGAC ACCGTATGAT TACGGTGCTC AGGTCATTTT GACAACAGCC TGGTTCGAGG
11341 ACCTTGGGCC GCAGTGGAAG ATTTTGGGGT TGCAGCCTTT CAGACGAACA TTTGGCTTTG
11401 AGAACACTGA AGATTGGGCA ATTCTCGCAC GCCGTATGAA TGACGGCAAA GATTACACTG
11461 ACTATAATTG GCATTGTGTA CGAGAACGCC CACACGCAAT TTACGGGCGC GCCCGTGACC
11521 ATACGTATCA TTTTGCCCTT GGCACTGAAC TGCAAGTAGA GCTGGGCAGA CCCCGGCTGC
11581 CTCCTGAGCA AGTGCCGTGA ACGCGGAGTG ATGCAATGGG TTTACTGTGG AGTAAAATCA
11641 GTCAGTTGTT CGTGGATGCC TTCACTGAGT TCCTTGTTAG TGTGGTTGAC ATTGTCATCT
11701 TTCTCGCCAT ATTGTTTGGG TTCACTGTTG CAGGCTGGTT ATTGGTCTTC CTTCTCAGAG
11761 TGGTTTGCTC CGCGTTTCTC CGTTCGCGCT CTGCCATTCA CTCTTCCGAA CTATCGAAGG
11821 TCCTATGAGG GCTTGCTACC CAACTGCAGA CCGGATGTCC CACAATTCGC AGTTAAGCAC
11881 CCGTTGGGTA TACTTTGGCA TATGCGAGTC TCCCACCTAA TTGACGAAAT GGTCTCTCGC
11941 CGCATTTACC GGACCATGGA ACATTCGGGT CAAGCGGCCT GGAAGCAGGT TGTTAGTGAA
12001 GCCACTCTCA CAAAACTGTC AAGGCTTGAC GTAGTCACTC ATTTCCAACA CCTGGCCGCA
12061 GTGGAGGCTG ATTCTTGCCG CTTCCTTAGC TCACGACTCG CGATGCTGAA AAACCTTGCC
12121 GTTGGCAATG TGAGCCTGGA GTACAACACT ACTTTGGACC GCGTTGAGCT CATCTTTCCC
12181 ACACCAGGTA CGAGGCCCAA GTTGACCGAT TTTAGGCAAT GGCTTATCAG CGTGCACGCT
12241 TCCATCTTCT CCTCTGTGGC TTCGTCTGTT ACCTTGTTCA CAGTGCTTTG GCTTCGAATT
12301 CCAGCTCTAC GCTATGTTTT TGGTTTCCAT TGGCCCACGG CAACACATCA TTCGAACTAA
12361 CTATCAATTA CACTATATGT AAGCCATGCC CTACCAGTCA AGCTGCCCAA CAAAGACTCG
12421 AGCCTGGCCG TAACGTGTGG TGCAAAATAG GGCACGACAG GTGTGAGGAA CGTGACCATG
12481 ATGAGTTGTC AATGTCCATT CCGTCCGGGT ACGACAACCT CAAACTTGAG GGTTATTATG
12541 CTTGGCTGGC TTTTTTGTCC TTTTCCTACG CGGCCCAATT CCATCCGGAG CTGTTCGGAA
12601 TAGGAAACGT GTCGCGCGTC TTTGTGGATA AGCGACACCA GTTCATTTGC GCCGAGCATG
12661 ATGGACAAAA TTCAACCATA TCTGCCAGAC ACAACATCTC CGCGTCGTAT GCGGTGTATT
12721 ACCATCATCA AATAGACGGG GGCAATTGGT TTCATTTGGA ATGGCTGCGA CCATTCTTTT
12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT
12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCCT
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT

12961 CAGGAGGTCG TCCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAACGGC
13021 TAATGTGACC GATGAATCGT ATTTGTACAA CGCGGACTTG CTGATGCTTT CCGCGTGCCT
13081 TTTCTACGCC TCGGAAATGA GCGAGAAAGG CTTCAAAGTC ATCTTTGGGA ATATTTCTGG
13141 CGTTGTTTCC GCTTGTGTTA ATTTCACAGA TTATGTGGCC CATGTGACCC AACACACTCA
13201 GCAGCACCAT TTGGTAATTG ATCACATTCG GTTACTACAC TTCTTGACAC CGTCTACGAT
13261 GAGGTGGGCT ACAACCATTG CTTGTTTGCT TGCCATTCTT TTGGCGGTAT GAAATGTTCT
13321 TGCAAGTTGG GGCATTTCTT GACTCCTCAC TCTTGCTTCT GGTGGCTTTT TTTGCTGTGT
13381 ACCGGCTTGT CTTGGTCCTT TGTCGATGGC AACGACGACA GCTCGACATC CCAATACATA
13441 TATAATTTGA CGATATGCGA GCTGAATGGG ACCGAATGGT TGTCCGGTCA TTTTGATTGG
13501 GCAGTCGAAA CCTTTGTGCT TTACCCAGTT GCCACTCATA TCATTTCACT GGGTTTTCTC
13561 ACAACAAGCC ATTTCCTTGA TGCGCTCGGT CTCGGCGCTG TGTCCGCCAC AGGATTCATT
13621 GGCGAGCGGT ATGTACTTAG CAGCATGTAC GGCGTTTGCG CCTTCGCGGC GTTCGTATGT
13681 TTTGTCATCC GTGCTGCTAA AAATTGCATG GCTTGCCGCT ATGCCCGCAC CCGGTTTACC
13741 AACTTCATCG TGGACGACCG GGGAAGAATC CATCGATGGA AGTCTTCAAT AGTGGTGGAG
13801 AAATTGGGCA AAGCTGAAGT CGGTGGTGAC CTTGTCAACA TTAAGCATGT TGTCCTCGAA
13861 GGGGTTAAAG CTCAACCTTT GACGAGGACT TCGGCTGAGC AATGGGAAGC CTAGACGACT
13921 TTTGCAACGA TCCCACCGCC GCACAAAAAC TCGTGCTGGC CTTTAGCATC ACATATACAC
13981 CCATAATGAT ATACGCCCTT AAGGTGTCAC GCGGCCGACT CCTGGGGCTG TTGCACATCT
14041 TGATATTTCT GAATTGTTCC TTTACTTTTG GGTACATGAC ATATGTGCAT TTTCAATCCA
14101 CCAACCGTGT CGCATTCACT CTGGGGGCTG TAGTCGCCCT TTTGTGGGGT GTTTACAGCC
14161 TCACAGAGTC ATGGAAGTTC ATCACTTCCA GATGCAGATT GTGTTGCCTA GGCCGGCGAT
14221 ACATTCTGGC CCCTGCCCAT CACGTAGAAA GTGCTGCAGG CCTCCATTCA ATCCCAGCGT
14281 CTGGTAACCG AGCATACGCT GTGAGAAAGC CCGGACTAAC ATCAGTGAAC GGCACTCTAG
14341 TACCTGGGCT TCGGAGCCTC GTGCTGGGCG GCAAACGAGC TGTTAAACGA GGAGTGGTTA
14401 ACCTCGTCAA GTATGGCCGG TAAGAACCAG AGCCAGAAGA AAAGAAGAAA TGCAGCTCCG
14461 ATGGGGAAAG GCCAGCCAGT CAATCAACTG TGCCAGTTGC TGGGTACAAT GATAAAGTCC
14521 CAGCGCCAGC AATCTAGGGG AGGACAGGCC AAAAAGAAGA AGCCTGAGAA GCCACATTTT
14581 CCCCTAGCTG CTGAAGATGA CATTCGGCAC CATCTCACCC AGGCCGAACG TTCCCTCTGC
14641 TTGCAATCGA TCCAGACGGC TTTCAATCAA GGCGCAGGAA CTGCGTCGCT TTCATCCAGC
14701 GGGAAGGTCA GTTTCCAGGT TGAGTTCATG CTGCCGGTTG CTCATACAGT GCGCCTGATT
14761 CGCGTGACTT CTACATCCGC CAGTCAGGGT GCAAATTAAT TTGACAGTCA GGTGAATGGC
14821 CGCGATTGAC GTGTGGCCTC TAA

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

MSGMFSRCMCTPAARVFWNAGQVYCTRCLSARSLLSPELQDTDLGAVGLFHKPKDKLHWKVPIGI
PQVECSPSGCCWLSTIFPLARMTSGNHNFLQRLVKVADVLYRDGCLTPRHLRELQVYERGCNWY
PITGPVPGMAVYANSMHVSDQPFPGATHVLTNSPLPQRACRQPFCPFEEAHSSIYRWEKFVIFMD
SSSDGRSRMMWTPESDDSTALEVLPPELEHQVKVLVRSFPAHHLVDLADWELTESPDNGFSFSTS
HPCGYLVRDPAVSEGKCWLSCFLSQSAEVLSREAHLATAYGYQTKWGVPGKYIQRRLQVHGLRA
VVDPDGPIHVEALSCPQSWIRHLTLNDDVTPGFVRLMSLRIVPNTEPTTHRIFRFGVHKWYGAAGK
RARGKRAAKSEKDSASTLKVARPTSTSGIVTYSPPADGSCGWHALAAILNRMINNDFTSPLPRYNR
PEDDWASDGDLAQAIQCLQLPAAIARNRACPNAKYLIKLNGVHWEVEVRPGMAPRSLSRECVVGV
CSEGCVASPYPEDGLPKRALEALASAYRLPSDCVCDGIIDFLANPPPQEFWTLDKMLTSPSPEQSG
FSSLYKLLLEILPQKCGSTEGEFIYTVERMLKDCPSSKQAMALLAKIKVPSSKAPSVTLNECFPTDVP
VNSELISWEEPKDPGAAVVLCPSDAKESKETAPEEAQARNRKVLHPVVLTEELSEQQVQVVEGDQ
DMPLDLTWPTLTATATPVRGPVPDNLSSGIGAQPATVQELILARPAPRLVERCGTESNGSSSFLDL
PDVQTSDQPLDLSLAAWPVRATASDPGWIHGRREPVFVKPRGVFSDGESALQFGELSEASSVVD
DRTKEAPVVDAPIDLTTSNETLSGSDPFEFAKFRRPRFSAQALIDRGGPLADVHAKIKSRVYEQCLQ
ACEPGSRATPATKKWLDKMWDRVDMKTWRCTSQFQAGHILESLKFLPDMIQDTPPPVPRKNRAG
DSAGLKQLVAQWDRKSSVTPPTKPVGPVLDQAVPLPMDIQQGDAISADKPPHSQNPSSQVDVGG
GWKSFMLSGTRFAGSVSQRLTTWVFEVLSHLPAFMLTLFSPRGSMAPGDWLFAGAVLLALLLCRS
YPILGCLPLLGVFSGSVRCVRLGVFGSWMAFAVFLFSTPPDPVGSSCDHDSPECHAELLALEQRQL
WEPVRSLVVGPSGLLCVILGKLLGGSRCLWFVLLRICMLADLAISLIYVVSQGRCHKCWGKCIRTAP
AEVALNVFPFSRATRSSLVSLCDRFQAPKGVDPVHLATGWRGCWCGESPIHQSHQKPIAYANLDE
KKISAQTVIAVPYDPSQAIKCLKVLQAGGAIVDQPTPEVVRVSEIPFSAPFFPKVPVNPDCRVVVDSD
TFVAAVRCGYSTAQLVLGRGNFAKLNQTPLRNSVPTKTTGGASYTLAVAQVSVWTLVHFILGLWLT
SPQVCGRGTSDPWCSNPFSYPTYGPGVVCSSRLCVSADGVTLPLFSAVAHLSGREVGIFILVLASL
GALAHRLALKADMSMVFLAFCAYAWPMSSWLICFFPMLLRWVTLHPLTMLWVHSFLVFCLPAAGV
LSLGITGLLWAVGRFTQVAGIITPYDIHQYTSGPRGAAAVATAPEGTYMAAVRRAALTGRTLIFTPSA
VGSLLEGAFRTQKPCLNTVNVVGSSLGSGGVFTIDGRRVIVTATHVLNGNTARVTGDSYNRMHTF
NTNGDYAWSHADDWQGVAPMVKIAKGYRGRAYWQTSTGVEPGIMGEGFAFCFTNCGDSGSPVI
SEAGDLIGVHTGSNKLGSGLVTTPEGETCSIKETRLSDLSRHFAGPSVPLGDIKLSPAIIPDVTTIPSD
LASLLASVPVMEGGLSTVQLLCVFFLLWRMMGHAWTPIVAVGFFLLNEILPAVLVRAVFSFALFVLA
WATPWSAQVLMIRLLTAALNRNRLSLAFYAFGGVVGLATEIGTFAGGWPELSQALSTYCFLPRFLA
VTSYVPTIIIGGLHALGVILWLFKYRCLHNMLVGDGSFSSAFFLRYFAEGNLRKGVSQSCGMNNESL
TAALACKLSQADLDFLSSLTNFKCFVSASNMKNAAGQYIEAAYARALRQELASLVQVDKMKGVLAK
LEAFAETATPSLDTGDVIVLLGQHPHGSILDINVGGERKTVSVQETRCLGGSKFSVCTVVSNTPVDT
LTGIPLQTPTPLFENGPRHRSEDDDLKVERMKKHCVSLGFHKINGKVYCKIWDKSNGDTFYTDDSR
YTQDHAFQDRSTDYRDRDYEGVQTAPQQGFDPKSEAPVGTVVIGGITYNRHLVKGKEVLVPKPDN
CLEAARLSLEQALAGMGQTCDLTATEVEKLKRIISQLQGLTTEQALNC

SEC ID Nº:3 ORF 1B DEL MSV 94881 CODIFICADO POR SECUENCIA DE SEC ID Nº:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 7209…11600

TGFKLLAASGLTRCGRGGLVVTETAVKIVKYHSRTFTLGSLDLKVTSEVEVKKSTEQGHAVVANLC
SGVVLMRPHPPSLVDVLLKPGLDTTPGIQPGHGAGNMGVNGSIWDFETAPTKVELELSKQIIQACE
VRRGDAPNLQLPYKLYPVRGDPERRKGRLVNTRFGDLPYKTPQDTKSAIHAACCLHPNGVLVSDG
KSTLGTTLQHGFELYVPTVPYSVMEYLDSRPDTPFMCTKHGTSKAAAEDLQKYDLSTQGFVLPGVL
RLVRRFIFSHVGKAPPLFLPSTYPAKNSMAGVNGQRFPTKDVQSIPEIDEMCARAVKENWQTVTPC
TLKKQYCSKPKTRTILGTNNFIALAHRSALSGVTQAFMKKAWKSPIALGKNKFKELHCTVAGRCLEA
DLASCDRSTPAIVRWFVANLLYELAGCEEYLPSYVLNCCHDLVATQDGAFTKRGGLSSGDPVTSVS
NTVYSLIIYAQHMVLSALKMGHEIGLKFLEEQLKFEDLLEIQPMLVYSDDLVLYAERPTFPNYHWWV
EHLDLMLGFKTDPKKTVITDKPSFLGCRIEAGRQLVPNRDRILAALAYHMKAQNASEYYASAAAILM
DSCACIDHDPEWYEDLICGIARCARQDGYRFPGPAFFMSMWEKLKSHNEGKKCRHCGICDAKADY
ASACGLDLCLFHSHFHQHCPVTLSCGHHAGSKECSQCQSPVGAGKSPLDAVLKQIPYKPPRTIIMK
VDNKTTTLDPGRYQSRRGLVAVKRGIAGNEVDLSDGDYQVVPLLPTCKDINMVKVACNVLLSKFIV
GPPGSGKTTWLLNQVQDDDVIYTPTHQTMFDIVSALKVCRYSIPGASGLPFPPPARSGPWVRLIAS
GHVPGRVSYLDEAGYCNHLDILRLLSKTPLVCLGDLQQLHPVGFDSYCYVFDQMPQKQLTTIYRFG
PNICAAIQPCYREKLESKARNTRVVFTTRPVAFGQVLTPYHKDRTGSAITIDSSQGATFDIVTLHLPS
PKSLNKSRALVAITRARHGLFIYDPHDQLQEFFNLTPERTDCNLAFSRGDELVVLNVDNAVTTVAKA
LETGSPRFRVSDPRCKSLLAACSASLEGSCMPLPQVAHNLGFYFSPDSPAFAPLPKELAPHWPVV
THQNNRAWPDRLVASMRPIDARYSKPMVGAGYVVGPSIFLGTPGVVSYYLTLYIGGEPQALPETLV
STGRIATDCREYLDAAEEEAARELPHAFIGDVKGTTIGGCHHITSKYLPRSLPKDSVAVVGVSSPGR
AAKAVCTLTDVYLPELRPYLQPETASKCWKLKLDFRDVRLMVWKGATAYFQLEGLTWSALPDYAR
FIQLPKDAVVYIDPCIGPATANRKVVRTTDWRADLAVTPYDYGAQVILTTAWFEDLGPQWKILGLQP
FRRTFGFENTEDWAILARRMNDGKDYTDYNWHCVRERPHAIYGRARDHTYHFALGTELQVELGR
PRLPPEQVP

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

MQWVYCGVKSVSCSWMPSLSSLLVWLTLSSFSPYCLGSLLQAGYWSSFSEWFAPRFSVRALPFT
LPNYRRSYEGLLPNCRPDVPQFAVKHPLGILWHMRVSHLIDEMVSRRIYRTMEHSGQAAWKQVVS
EATLTKLSRLDVVTHFQHLAAVEADSCRFLSSRLAMLKNLAVGNVSLEYNTTLDRVELIFPTPGTRP
KLTDFRQWLISVHASIFSSVASSVTLFTVLWLRIPALRYVFGFHWPTATHHSN

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

MAYQRARFHLLLCGFVCYLVHSALASNSSSTLCFWFPLAHGNTSFELTINYTICKPCPTSQAAQQR
LEPGRNVWCKIGHDRCEERDHDELSMSIPSGYDNLKLEGYYAWLAFLSFSYAAQFHPELFGIGNVS
RVFVDKRHQFICAEHDGQNSTISARHNISASYAVYYHHQIDGGNWFHLEWLRPFFSSWLVLNISWF
LRRSPASPASRRIYQILRPTRPRLPVSWSFRTSIVSNLTGPQQRKVPLPSGGRPNVVKPSAFPSTS
R

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

MAATILFLLAGAQHLMVSEAFACKPCFSTHLSDIKTNTTAAAGFMVLQNINCFQSHRASTAQGTTPL
RRSSQCREAVGIPQYITITANVTDESYLYNADLLMLSACLFYASEMSEKGFKVIFGNISGVVSACVNF
TDYVAHVTQHTQQHHLVIDHIRLLHFLTPSTMRWATTIACLLAILLAV

SEC ID Nº:7 ORF 5 DEL MSV 94881 CODIFICADO POR SECUENCIA DE SEC ID Nº:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 13309…13914

MKCSCKLGHFLTPHSCFWWLFLLCTGLSWSFVDGNDDSSTSQYIYNLTICELNGTEWLSGHFDWA
VETFVLYPVATHIISLGFLTTSHFLDALGLGAVSATGFIGERYVLSSMYGVCAFAAFVCFVIRAAKNC
MACRYARTRFTNFIVDDRGRIHRWKSSIVVEKLGKAEVGGDLVNIKHVVLEGVKAQPLTRTSAEQW
EA

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

MGSLDDFCNDPTAAQKLVLAFSITYTPIMIYALKVSRGRLLGLLHILIFLNCSFTFGYMTYVHFQSTNR
VAFTLGAVVALLWGVYSLTESWKFITSRCRLCCLGRRYILAPAHHVESAAGLHSIPASGNRAYAVRK
PGLTSVNGTLVPGLRSLVLGGKRAVKRGVVNLVKYGR

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

MAGKNQSQKKRRNAAPMGKGQPVNQLCQLLGTMIKSQRQQSRGGQAKKKKPEKPHFPLAAEDDI
RHHLTQAERSLCLQSIQTAFNQGAGTASLSSSGKVSFQVEFMLPVAHTVRLIRVTSTSASQGAN

SEC ID Nº:10 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE LA CEPA DEL PRRS PARENTAL 94881

1 TTTGTGTACC TTGGAGGCGT GGGTACAGCC CTGCCCCACC CCTTGGCCCC TGTTCTAGCC
61 CGACAGGTAC CCTTCTCTCT CGGGGCGAGC GCGCCGCCTG CTGCTCCCTT GCGGCGGGAA
121 GGACCTCCCG AGTATTTCCG GAGAGCACCT GCTTTACGGG ATCTCCGCCC TTTAACCATG
181 TCTGGGATGT TCTCCCGGTG CATGTGCACC CCGGCTGCCC GGGTATTTTG GAACGCCGGC
241 CAAGTCTATT GCACACGGTG TCTCAGTGCA CGGTCTCTTC TCTCTCCAGA ACTTCAGGAC
301 ACGGACCTCG GTGCAGTTGG CTTGTTTCAC AAGCCTAAAG ACAAGCTCCA TTGGAAAGTT
361 CCCATTGGTA TCCCCCAGGT GGAATGTTCT CCATCTGGGT GTTGCTGGCT GTCAACCATT
421 TTTCCTTTAG CGCGCATGAC CTCCGGCAAT CACAACTTCC TTCAACGACT CGTGAAGGTT
481 GCTGACGTAT TGTACCGTGA CGGTTGCTTA ACCCCTAGAC ACCTCCGTGA ACTCCAAGTT
541 TACGAGCGTG GTTGCAATTG GTATCCGATT ACGGGGCCTG TGCCTGGGAT GGCTGTGTAC
601 GCGAACTCCA TGCACGTGTC CGACCAACCG TTCCCTGGTG CCACTCATGT GTTAACAAAT
661 TCCCCTTTGC CTCAACGGGC TTGTCGGCAG CCGTTCTGTC CGTTCGAAGA GGCCCATTCT
721 AGCATATACA GGTGGGAAAA ATTTGTAATT TTTATGGATT CCTCCTCCGA CGGTCGATCT
781 CGCATGATGT GGACTCCGGA ATCCGATGAC TCCACGGCTT TGGAAGTTCT GCCGCCCGAG
841 CTAGAACACC AGGTCAAGGT CCTTGTTCGG AGCTTTCCCG CCCATCACCT TGTCGACCTT
901 GCCGATTGGG AGCTCACTGA GTCCCCTGAG AACGGTTTTT CCTTCAGCAC GTCACATCCT
961 TGCGGCTACC TTGTTCGGGA CCCGGCTGTA TCCGAAGGCA AGTGTTGGCT TTCCTGCTTT
1021 TTGAGCCAGT CAGCCGAAGT GCTCAGTCGC GAGGCGCATC TGGCTACCGC CTATGGTTAC
1081 CAAACCAAGT GGGGTGTGCC TGGCAAGTAC ATCCAGCGCA GACTTCAAGT TCACGGTCTC
1141 CGTGCTGTGG TCGACCCTGA TGGTCCCATT CACGTTGAAG CATTGTCTTG CCCCCAGTCT
1201 TGGATCAGGC ACTTGACCCT GAATGATGAT GTCACCCCGG GATTCGTTCG CCTAATGTCT
1261 CTTCGCATTG TGCCGAACAC AGAGCCTACC ACACACCGGA TCTTTCGTTT TGGAGTGCAC
1321 AAGTGGTATG GTGCCGCCGG CAAACGGGCC CGTGGCAAGC GTGCCGCCAA AAGTGAGAAA
1381 GACTCGGCTT CCACCCTCAA GGTTGCCCGA CCGACTTCCA CCAGTGGAAT CGTCACCTAC
1441 TCCCCACCTG CGGACGGGTC TTGTGGTTGG CATGCCCTTG CCGCCATACT GAACCGGATG
1501 ATTAATAATG ACTTCACGTC CCCTCTGCCT CGGTACAACA GGCCGGAGGA CGATTGGGCT
1561 TCTGATGGTG ACCTTGCTCA GGCCATTCAA TGTTTGCAAC TACCTGCCGC CATAGCTCGG
1621 AACCGCGCCT GCCCTAACGC CAAATACCTC GTAAAACTCA ACGGAGTTCA TTGGGAGGTA
1681 GAGGTGAGGC CTGGAATGGC TCCTCGCTCC CTCTCTCGTG AGTGCGTTGT TGGCGTCTGC
1741 TCTGAAGGCT GTGTCGCGTC GCCTTACCCG GAGGACGGGT TGCCTAAACG TGCACTTGAG
1801 GCCCTGGCGT CTGCTTATAG ACTGCCTTCA GACTGTGTTT GTGATGGTAT TATTGACTTC
1861 CTTGCCAATC CACCTCCCCA GGAGTTCTGG ACTCTTGACA AAATGTTGAC TTCCCCGTCA

1921 CCGGAGCAGT CCGGCTTCTC TAGTCTGTAT AAATTGTTGT TAGAGGTCTT GCCGCAGAAA
1981 TGCGGATCCA CAGAAGGGGA ATTCATCTAT ACTGTTGAGA GGATGTTGAA GGATTGTCCG
2041 AGCTCCAAAC AGGCCATGGC CCTCCTTGCA AAAATTAAGG TCCCATCCTC AAAGGCCCCA
2101 TCCGTGACTC TGAACGAGTG CTTCCCCACG GATGTTCCAG TCAACTCTGA GTTAATATCT
2161 TGGGAAGAGC CCAAAGACCC TGGCGCTGCT GTTGTCCTAT GTCCATCGGA TGCAAAAGAA
2221 TCTAAGGAAA CAGCCCCTGA AGAAGCTCAA GCGAGAAACC GTAAGGTCCT CCACCCTGTG
2281 GTCCTTACCG AGGAACTTAG CGAGCAACAG GTGCAGGTGG TTGAGGGTGA TCAGGATATG
2341 CCACTGGATT TGACTTGGCC AACCTTAACC GCTACGGCGA CCCCTGTTAG AGGGCCGGTA
2401 CCGGACAATT TGAGCTCTGG CATTGGTGCC CAGCCCGCTA CCGTTCAAGA ACTCATTCTG
2461 GCGAGGCCTG CACCCCGTCT TGTTGAGCGC TGTGGCACGG AGTCGAACGG CAGCAGTTCA
2521 TTTCTGGATT TGCCTGACGT GCAGACCTCG GACCAGCCTT TAGACCTGTC CCTGGCCGCG
2581 TGGCCTGTAA GGGCTACCGC GTCTGACCCC GGTTGGATCC ACGGTAGGCG TGAGCCTGTC
2641 TTTGTGAAGC CTCGAGGTGT TTTCTCTGAT GGCGAGTCGG CCCTTCAGTT CGGAGAGCTT
2701 TCCGAAGCCA GTTCTGTCGT CGATGACCGG ACAAAAGAAG CTCCGGTGGT TGACGCCCCC
2761 ATCGATTTGA CAACTTCGAA CGAGACGCTC TCTGGGTCTG ACCCCTTTGA ATTCGCCAAA
2821 TTCAGGCGCC CGCGTTTCTC CGCGCAAGCT TTAATCGACC GAGGTGGTCC GCTTGCCGAT
2881 GTTCATGCAA AGATAAAGAG TCGGGTATAT GAACAATGCC TTCAAGCTTG TGAACCTGGT
2941 AGTCGTGCGA CCCCAGCCAC CAAGAAGTGG CTCGACAAAA TGTGGGACAG GGTGGACATG
3001 AAAACTTGGC GCTGCACCTC GCAGTTCCAA GCTGGTCACA TTCTTGAGTC CCTCAAATTC
3061 CTCCCTGACA TGATTCAAGA CACACCGCCT CCTGTTCCCA GGAAGAACCG AGCTGGTGAC
3121 AGTGCCGGCC TGAAGCAACT GGTGGCGCAG TGGGATAGGA AATTGAGTGT GACACCCCCC
3181 ACAAAACCGG TTGGACCGGT GCTTGACCAG ACCGTCCCTC TGCCTATGGA CATCCAGCAA
3241 GAAGATGCCA TCTCCGCTGA CAAGCCACCC CATTCGCAAA ACCCTTCTAG TCAAGTAGAT
3301 GTGGGTGGAG GTTGGAAAAG TTTTATGCTC TCCGGCACCC GTTTCGCGGG GTCCGTTAGT
3361 CAGCGCCTTA CGACATGGGT TTTTGAGGTT CTCTCCCATC TCCCAGCTTT TATGCTCACA
3421 CTTTTCTCGC CACGGGGCTC TATGGCTCCA GGTGATTGGC TGTTTGCAGG TGCTGTTCTA
3481 CTTGCTCTCC TGCTCTGCCG TTCTTACCCA ATACTCGGAT GCCTTCCCTT ATTGGGTGTC
3541 TTTTCTGGTT CTGTGCGGTG TGTTCGTTTG GGTGTTTTTG GTTCTTGGAT GGCTTTTGCT
3601 GTATTTTTAT TCTCGACTCC ACCCGACCCA GTCGGTTCTT CTTGTGACCA CGATTCGCCG
3661 GAGTGTCATG CTGAGCTTTT GGCTCTTGAG CAGCGCCAAC TTTGGGAACC TGTGCGCAGC
3721 CTTGTGGTCG GGCCATCGGG CCTCTTATGC GTCATTCTTG GCAAGTTACT CGGTGGGTCA
3781 CGTTGTCTCT GGTTTGTTCT CCTACGTATA TGCATGCTCG CAGATTTGGC AATTTCTCTT
3841 ATTTATGTGG TGTCCCAAGG GCGTTGTCAC AAGTGTTGGG GAAAGTGTAT AAGGACGGCT
3901 CCTGCAGAAG TGACCCTTAA TGTGTTTCCT TTTTCGCGCG CCACCCGCTC ATCTCTTGTG
3961 TCCTTGTGTG ATCGGTTCCA AGCGCCAAAA GGAGTTGACC CCGTGCACTT GGCGACAGGC
4021 TGGCGCGGGT GCTGGTGTGG TGAGAGCCCT ATTCATCAAT CACACCAAAA ACCGATAGCT
4081 TATGCCAACT TGGATGAAAA GAAGATATCC GCCCAGACGG TGATTGCTGT CCCGTATGAT

4141 CCCAGTCAGG CCATTAAATG CCTGAAAGTT TTGCAGGCAG GAGGGGCTAT TGTGGACCAG
4201 CCTACGCCCG AGGTCGTCCG TGTGTCTGAG ATTCCCTTCT CGGCCCCATT TTTTCCGAAG
4261 GTCCCAGTCA ACCCAGATTG CAGGGTTGTG GTAGATTCGG ACACTTTTGT GGCTGCGGTC
4321 CGCTGCGGTT ATTCGACAGC ACAACTGGTC CTTGGTCGGG GCAACTTTGC CAAGCTAAAT
4381 CAGACCCCCC TCAGGAACTC TGTCCCCACC AAAACAACTG GTGGGGCCTC ATACACCCTT
4441 GCCGTGGCCC AGGTATCTGT GTGGACTCTT GTTCATTTCA TCCTCGGCCT TTGGTTAACG
4501 TCACCTCAAG TGTGTGGTCG AGGGACCTCT GACCCGTGGT GTTCGAACCC TTTTTCGTAT
4561 CCTACTTATG GCCCCGGAGT TGTGTGTTCC TCTCGACTCT GCGTGTCTGC CGACGGAGTT
4621 ACCCTGCCAT TGTTCTCAGC CGTTGCCCAT CTTTCCGGTA GAGAGGTGGG GATTTTTATT
4681 TTGGTGCTTG CCTCCTTGGG CGCTTTAGCC CACCGCTTGG CTCTTAAGGC AGACATGTCA
4741 ATGGTCTTTT TGGCGTTTTG TGCTTACGCC TGGCCCATGA GCTCCTGGTT AATTTGCTTC
4801 TTTCCTATGC TCTTGAGGTG GGTAACCCTT CATCCTCTCA CTATGCTTTG GGTGCACTCA
4861 TTTTTGGTGT TTTGCCTACC AGCTGCCGGC GTTCTCTCGC TGGGAATAAC CGGTCTTCTT
4921 TGGGCAGTTG GCCGTTTCAC CCAGGTTGCC GGAATTATCA CACCTTATGA CATCCACCAG
4981 TATACCTCCG GACCACGTGG TGCAGCTGCT GTAGCAACGG CTCCAGAAGG TACTTACATG
5041 GCGGCCGTTC GGAGAGCCGC TTTGACTGGA CGGACTTTGA TCTTCACACC ATCTGCAGTC
5101 GGATCCCTTC TTGAAGGTGC TTTCAGAACT CAAAAGCCCT GCCTTAACAC CGTGAATGTC
5161 GTAGGCTCTT CCCTTGGTTC TGGAGGAGTT TTCACCATTG ATGGCAGAAG AGTCATCGTC
5221 ACTGCCACCC ATGTGTTGAA TGGTAACACA GCCAGGGTCA CTGGTGATTC CTACAACCGC
5281 ATGCACACGT TCAATACTAA TGGTGATTAT GCCTGGTCCC ATGCTGATGA CTGGCAAGGC
5341 GTTGCCCCTA TGGTTAAGAT CGCTAAGGGG TATCGCGGTC GTGCCTACTG GCAAACGTCA
5401 ACCGGAGTCG AACCTGGCAT CATGGGGGAA GGATTCGCCT TCTGTTTCAC TAACTGTGGC
5461 GACTCAGGGT CACCTGTCAT TTCAGAAGCT GGTGACCTTA TTGGAGTCCA TACCGGTTCA
5521 AACAAACTCG GTTCTGGTCT TGTGACAACC CCTGAAGGGG AGACCTGCTC CATCAAGGAA
5581 ACTAGGCTCT CTGACCTTTC TAGACATTTT GCAGGTCCAA GCGTCCCTCT TGGGGACATT
5641 AAGTTGAGCC CAGCCATCAT CCCTGATGTG ACAACTATTC CGAGTGACTT GGCATCGCTC
5701 CTTGCTTCTG TCCCCGTGAT GGAAGGTGGC CTCTCAACTG TCCAGCTTTT GTGCGTCTTT
5761 TTCCTTCTCT GGCGCATGAT GGGCCATGCC TGGACACCCA TTGTTGCCGT AGGCTTCTTT
5821 TTGCTGAATG AAATTCTCCC AGCAGTCTTG GTCCGAGCTG TGTTCTCTTT TGCACTCTTT
5881 GTACTTGCAT GGGCCACCCC CTGGTCGGCA CAAGTGTTGA TGATTAGACT CCTCACGGCG
5941 GCTCTCAACC GCAACAGGTT GTCCCTGGCG TTCTACGCAC TCGGAGGTGT CGTTGGCCTG
6001 GCCACAGAAA TCGGGACTTT TGCTGGTGGA TGGCCTGAAC TGTCCCAAGC CCTCTCGACA
6061 TACTGCTTCC TGCCCAGGTT CCTTGCTGTG ACTAGTTATG TCCCCACCAT CATCATCGGT
6121 GGGCTCCATG CCCTCGGCGT AATTTTGTGG TTATTCAAAT ACCGATGCCT CCACAACATG
6181 CTGGTTGGTG ATGGGAGTTT CTCAAGCGCT TTCTTCCTAC GGTATTTTGC TGAGGGTAAT
6241 CTTAGGAAAG GCGTGTCGCA GTCCTGTGGC ATGAATAACG AATCCCTGAC AGCTGCTTTG
6301 GCTTGCAAGT TGTCGCAAGC TGACCTTGAT TTTTTGTCCA GTTTAACGAA CTTCAAGTGC

6361 TTTGTGTCCG CTTCAAACAT GAAAAATGCA GCTGGCCAAT ACATCGAGGC GGCGTATGCT
6421 AGAGCTCTGC GTCAGGAGCT GGCCTCCTTG GTTCAGGTTG ACAAGATGAA AGGAGTATTG
6481 GCCAAGCTCG AGGCTTTCGC TGAGACGGCC ACTCCGTCAC TTGACACAGG TGACGTGATT
6541 GTTCTGCTTG GGCAACACCC CCATGGATCC ATCCTCGACA TTAATGTGGG GGGTGAAAGG
6601 AAAACTGTGT CTGTGCAAGA AACACGATGC CTGGGTGGTT CCAAATTCAG TGTCTGCACT
6661 GTCGTGTCCA ACACGCCCGT GGATACCTTG ACCGGCATCC CACTTCAGAC GCCAACCCCA
6721 CTTTTTGAAA ATGGCCCGCG CCATCGCAGC GAGGACGACG ACCTTAAAGT TGAGAGAATG
6781 AAAAAACACT GTGTATCCCT CGGCTTCCAC AAAATCAATG GTAAAGTTTA CTGCAAAATT
6841 TGGGACAAGT CTAACGGCGA CACCTTTTAC ACGGATGATT CCCGATACAC TCAAGACCAT
6901 GCTTTTCAGG ACAGGTCAAC CGACTATAGA GACAGGGATT ATGAAGGTGT ACAGACCGCC
6961 CCCCAACAGG GATTCGATCC AAAGTCCGAA GCCCCTGTTG GCACTGTTGT AATCGGTGGC
7021 ATTACGTATA ACAGGCATCT GGTCAAAGGT AAGGAGGTCC TAGTTCCCAA ACCTGACAAC
7081 TGCCTTGAAG CTGCCAGACT GTCCCTTGAG CAAGCTCTTG CTGGGATGGG CCAAACTTGT
7141 GACCTTACAG CTACCGAAGT GGAGAAACTA AAGCGCATCA TTAGTCAACT CCAAGGTCTG
7201 ACCACTGAAC AGGCTTTAAA CTGCTAGCCG CCAGCGGCTT GACCCGCTGT GGCCGCGGCG
7261 GCCTAGTTGT AACTGAAACG GCGGTAAAAA TCGTAAAATA CCACAGCAGA ACTTTCACCT
7321 TAGGCTCTTT AGACCTAAAA GTCACCTCCG AGGTGGAGGT GAAGAAATCA ACTGAGCAGG
7381 GGCACGCTGT CGTGGCGAAC TTATGTTCCG GTGTCGTCTT GATGAGGCCT CACCCACCGT
7441 CCCTTGTTGA CGTTCTCCTC AAACCCGGAC TTGACACAAC ACCCGGCATT CAACCAGGGC
7501 ATGGGGCCGG GAATATGGGC GTGAACGGTT CTATTTGGGA TTTTGAAACT GCACCCACAA
7561 AGGTAGAACT AGAGTTGTCC AAGCAAATAA TCCAAGCATG TGAAGTCAGG CGCGGGGACG
7621 CCCCTAACCT CCAACTCCCC TACAAGCTTT ATCCTGTCAG GGGGGACCCC GAGCGGCGTA
7681 AAGGTCGCCT TGTCAACACT AGGTTTGGAG ATTTACCTTA CAAAACTCCC CAAGACACCA
7741 AGTCCGCAAT TCATGCGGCT TGTTGCCTGC ATCCCAATGG GGTCCTCGTG TCTGATGGTA
7801 AATCCACGCT GGGTACCACT CTTCAACATG GTTTCGAGCT TTATGTCCCC ACTGTACCTT
7861 ATAGTGTCAT GGAATACCTT GATTCACGCC CTGACACCCC TTTTATGTGT ACTAAACATG
7921 GCACTTCCAA GGCTGCTGCA GAGGACCTCC AAAAATATGA CCTATCCACT CAAGGGTTTG
7981 TCTTGCCTGG GGTCCTACGC CTAGTGCGCA GGTTCATCTT TAGCCATGTT GGTAAGGCGC
8041 CACCACTGTT CCTTCCATCA ACCTACCCTG CCAAGAACTC CATGGCAGGG GTCAATGGCC
8101 AGAGGTTCCC AACAAAGGAT GTCCAGAGCA TACCTGAAAT TGATGAAATG TGCGCCCGTG
8161 CCGTCAAGGA AAATTGGCAG ACTGTGACAC CTTGCACCCT CAAAAAACAG TACTGTTCCA
8221 AACCTAAAAC TAGAACCATC CTAGGTACCA ACAACTTCAT AGCCTTGGCT CACAGGTCAG
8281 CACTCAGTGG TGTCACCCAG GCGTTCATGA AGAAGGCCTG GAAGTCCCCA ATTGCCTTGG
8341 GGAAAAACAA GTTTAAGGAA TTGCATTGCA CTGTCGCCGG CAGATGCCTT GAGGCTGACC
8401 TGGCTTCCTG CGATCGCAGC ACCCCCGCCA TTGTGAGGTG GTTTGTTGCC AACCTCCTGT
8461 ATGAACTTGC AGGATGTGAA GAGTACTTGC CTAGCTACGT GCTCAACTGT TGCCATGACC
8521 TTGTGGCAAC GCAGGATGGC GCTTTCACAA AACGCGGTGG CCTGTCGTCC GGGGACCCCG

8581 TCACCAGTGT GTCCAACACC GTCTACTCAC TGATAATTTA CGCCCAGCAC ATGGTGCTTT
8641 CGGCCTTGAA GATGGGTCAT GAAATTGGTC TCAAGTTCCT TGAGGAACAG CTCAAATTTG
8701 AGGACCTTCT TGAAATCCAG CCCATGTTAG TGTATTCTGA TGACCTCGTC TTGTATGCGG
8761 AAAGACCCAC TTTTCCCAAC TACCATTGGT GGGTCGAGCA TCTTGACCTG ATGTTGGGCT
8821 TTAAAACGGA CCCAAAGAAA ACTGTCATAA CTGATAAACC CAGTTTTCTC GGCTGCAGAA
8881 TTGAAGCAGG ACGGCAGTTA GTCCCCAATC GCGACCGTAT TCTGGCTGCT CTTGCATATC
8941 ATATGAAGGC GCAGAACGCC TCAGAGTATT ATGCGTCCGC TGCCGCAATT CTGATGGATT
9001 CGTGTGCTTG CATTGACCAT GACCCCGAGT GGTATGAGGA CCTTATCTGC GGCATCGCCC
9061 GGTGTGCTCG CCAGGACGGT TACCGTTTTC CAGGCCCGGC ATTTTTCATG TCCATGTGGG
9121 AGAAGCTGAA AAGTCATAAC GAAGGGAAGA AATGCCGTCA CTGCGGCATC TGCGACGCCA
9181 AAGCCGACTA TGCGTCCGCC TGTGGACTTG ATTTGTGTTT GTTCCATTCA CACTTTCATC
9241 AACACTGCCC AGTCACTCTG AGCTGTGGCC ACCATGCCGG TTCAAAGGAA TGTTCGCAGT
9301 GTCAGTCACC TGTCGGGGCT GGCAAATCCC CCCTTGACGC TGTGCTGAAA CAAATCCCGT
9361 ACAAACCTCC TCGTACCATT ATCATGAAGG TGGACAACAA AACAACGACC CTTGACCCGG
9421 GAAGATATCA GTCCCGTCGA GGTCTTGTTG CAGTCAAAAG AGGTATTGCA GGTAATGAGG
9481 TTGATCTTTC TGATGGAGAC TACCAAGTGG TGCCTCTTTT GCCGACTTGC AAAGACATAA
9541 ACATGGTGAA GGTGGCTTGC AACGTACTAC TCAGCAAGTT TATAGTAGGG CCGCCAGGTT
9601 CCGGAAAAAC CACCTGGCTA CTGAACCAAG TCCAGGACGA TGATGTCATT TACACACCTA
9661 CTCATCAGAC AATGTTTGAC ATAGTCAGTG CTCTTAAAGT TTGCAGGTAT TCCATCCCAG
9721 GAGCCTCAGG ACTCCCTTTT CCACCACCTG CCAGGTCCGG GCCGTGGGTT AGGCTCATCG
9781 CCAGCGGACA TGTCCCTGGC CGAGTGTCAT ATCTCGATGA GGCAGGATAT TGCAATCATC
9841 TAGACATTCT AAGGCTGCTT TCCAAAACAC CCCTTGTGTG TTTGGGTGAC CTTCAGCAAC
9901 TTCACCCGGT CGGCTTTGAT TCCTATTGTT ATGTGTTCGA TCAGATGCCT CAGAAGCAGC
9961 TGACCACCAT TTATAGATTT GGCCCTAACA TCTGTGCAGC CATCCAGCCT TGTTACAGGG
10021 AGAAACTTGA ATCCAAGGCC AGGAACACCA GAGTGGTTTT CACCACCCGG CCTGTGGCCT
10081 TTGGTCAGGT CCTGACACCG TACCACAAAG ATCGTACCGG CTCTGCAATA ACTATAGATT
10141 CATCCCAGGG GGCGACCTTC GACATTGTGA CATTGCATCT ACCATCGCCA AAGTCCCTAA
10201 ACAAATCCCG AGCACTTGTA GCCATCACTC GGGCAAGACA TGGGTTGTTC ATTTATGACC
10261 CTCATGACCA ACTCCAGGAG TTTTTCAACT TAACCCCCGA GCGCACTGAT TGTAACCTTG
10321 CGTTCAGCCG TGGGGATGAG CTGGTTGTTT TGAATGTGGA TAATGCGGTC ACAACTGTAG
10381 CGAAGGCCCT AGAGACAGGT TCACCCCGAT TTCGAGTATC GGACCCGAGG TGCAAGTCTC
10441 TCTTAGCCGC TTGTTCGGCC AGTCTAGAAG GGAGCTGCAT GCCACTACCA CAAGTAGCAC
10501 ATAACCTGGG GTTTTACTTT TCCCCGGACA GCCCAGCTTT TGCACCCCTG CCAAAAGAGC
10561 TGGCGCCACA TTGGCCAGTG GTCACCCACC AGAATAATCG AGCGTGGCCT GATCGACTTG
10621 TCGCTAGTAT GCGCCCAATT GATGCCCGCT ACAGCAAGCC AATGGTCGGT GCAGGGTATG
10681 TGGTCGGGCC ATCCATTTTT CTTGGCACTC CTGGTGTGGT GTCATACTAT CTCACATTAT
10741 ACATCGGGGG CGAGCCTCAG GCCCTGCCAG AAACACTCGT TTCAACAGGA CGTATAGCCA

10801 CAGATTGTCG GGAATATCTC GACGCGGCTG AGGAAGAGGC AGCGAGAGAA CTTCCCCACG
10861 CATTTATTGG CGATGTCAAA GGCACTACGG TCGGGGGGTG TCACCACATT ACATCGAAAT
10921 ACCTACCTAG GTCCCTGCCT AAAGACTCTG TTGCTGTGGT TGGGGTGAGT TCGCCCGGTA
10981 GGGCTGCTAA AGCCGTGTGC ACTCTCACCG ATGTGTACCT CCCCGAACTC CGACCATATT
11041 TGCAACCGGA GACGGCATCA AAATGCTGGA AACTTAAACT GGATTTCAGG GATGTTCGAC
11101 TGATGGTCTG GAAAGGCGCC ACAGCCTATT TCCAGTTGGA AGGGCTGACA TGGTCAGCGC
11161 TGCCCGATTA TGCTAGGTTC ATTCAGCTAC CCAAGGATGC CGTTGTGTAC ATCGATCCGT
11221 GTATAGGGCC GGCAACAGCC AATCGCAAGG TTGTGCGAAC CACAGACTGG CGGGCCGACC
11281 TGGCAGTGAC ACCGTATGAT TACGGTGCTC AGGTCATTTT GACAACAGCC TGGTTCGAGG
11341 ACCTTGGGCC GCAGTGGAAG ATTTTGGGGT TGCAGCCTTT CAGACGAACA TTTGGCTTTG
11401 AGAACACTGA AGATTGGGCA ATTCTCGCAC GCCGTATGAA TGACGGCAAA GATTACACTG
11461 ACTATAATTG GCATTGTGTA CGAGAACGCC CACACGCAAT TTACGGGCGC GCCCGTGACC
11521 ATACGTATCA TTTTGCCCTT GGCACTGAAC TGCAAGTAGA GCTGGGCAGA CCCCGGCTGC
11581 CTCCTGAGCA AGTGCCGTGA ACGCGGAGTG ATGCAATGGG TTCACTGTGG AGTAAAATCA
11641 GTCAGTTGTT CGTGGATGCC TTCACTGAGT TCCTTGTTAG TGTGGTTGAC ATTGTCATCT
11701 TTCTCGCCAT ATTGTTTGGG TTCACTGTTG CAGGCTGGTT ATTGGTCTTC CTTCTCAGAG
11761 TGGTTTGCTC CGCGTTTCTC CGTTCGCGCT CTGCCATTCA CTCTCCCGAA CTATCGAAGG
11821 TCCTATGAGG GCTTGCTACC CAACTGCAGA CCGGATGTCC CACAATTCGC AGTTAAGCAC
11881 CCGTTGGGTA TACTTTGGCA TATGCGAGTC TCCCACCTAA TTGACGAAAT GGTCTCTCGC
11941 CGCATTTACC GGACCATGGA ACATTCGGGT CAAGCGGCCT GGAAGCAGGT TGTTAGTGAA
12001 GCCACTCTCA CAAAACTGTC AAGGCTTGAC GTAGTCACTC ATTTCCAACA CCTGGCCGCA
12061 GTGGAGGCTG ATTCTTGCCG CTTCCTTAGC TCACGACTCG CGATGCTGAA AAACCTTGCC
12121 GTTGGCAATG TGAGCCTGGA GTACAACACT ACTTTGGACC GCGTTGAGCT CATCTTTCCC
12181 ACACCAGGTA CGAGGCCCAA GTTGACCGAT TTTAGGCAAT GGCTTATCAG CGTGCACGCT
12241 TCCATCTTCT CCTCTGTGGC TTCGTCTGTT ACCTTGTTCA CAGTGCTTTG GCTTCGAATT
12301 CCAGCTCTAC GCTATGTTTT TGGTTTCCAT TGGCCCACGG CAACACATCA TTCGAACTAA
12361 CTATCAATTA CACTATATGT AAGCCATGCC CTACCAGTCA AGCTGCCCAA CAAAGACTCG
12421 AGCCTGGCCG TAACGTGTGG TGCAAAATAG GGCACGACAG GTGTGAGGAA CGTGACCATG
12481 ATGAGTTGTC AATGTCCATT CCGTCCGGGT ACGACAACCT CAAACTTGAG GGTTATTATG
12541 CTTGGCTGGC TTTTTTGTCC TTTTCCTACG CGGCCCAATT CCATCCGGAG CTGTTCGGAA
12601 TAGGAAACGT GTCGCGCGTC TTTGTGGATA AGCGACACCA GTTCATTTGC GCCGAGCATG
12661 ATGGACAAAA TTCAACCATA TCTGCCAGAC ACAACATCTC CGCGTCGTAT GCGGTGTATT
12721 ACCATCATCA AATAGACGGG GGCAATTGGT TTCATTTGGA ATGGCTGCGA CCATTCTTTT
12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT
12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCCT
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT
12961 CAGGAGGTCG TCCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAACGGC

13021 TAATGTGACC GATGAATCGT ATTTGTACAA CGCGGACTTG CTGATGCTTT CCGCGTGCCT
13081 TTTCTACGCC TCGGAAATGA GCGAGAAAGG CTTCAAAGTC ATCTTTGGGA ATATTTCTGG
13141 CGTTGTTTCC GCTTGTGTTA ATTTCACAGA TTATGTGGCC CATGTGACCC AACACACTCA
13201 GCAGCACCAT TTGGTAATTG ATCACATTCG GTTACTACAC TTCTTGACAC CGTCTACGAT
13261 GAGGTGGGCT ACAACCATTG CTTGTTTGTT TGCCATTCTT TTGGCGGTAT GAAATGTTCT
13321 TGCAAGTTGG GGCATTTCTT GACTCCTCAC TCTTGCTTCT GGTGGCTTTT TTTGCTGTGT
13381 ACCGGCTTGT CTTGGTCCTT TGTCGATGGC AACGACAACA GCTCGACATC CCAATACATA
13441 TATAATTTGA CGATATGCGA GCTGAATGGG ACCGAATGGT TGTCCGGTCA TTTTGATTGG
13501 GCAGTCGAAA CCTTTGTGCT TTACCCAGTT GCCACTCATA TCATTTCACT GGGTTTTCTC
13561 ACAACAAGCC ATTTCCTTGA TGCGCTCGGT CTCGGCGCTG TGTCCGCCAC AGGATTCATT
13621 GGCGAGCGGT ATGTACTTAG CAGCATGTAC GGCGTTTGCG CCTTCGCGGC GCTCGTATGT
13681 TTTGTCATCC GTGCTGCTAA AAATTGCATG GCTTGCCGCT ATGCCCGCAC CCGGTTTACC
13741 AACTTCATCG TGGACGACCG GGGAAGAATC CATCGATGGA AGTCTTCAAT AGTGGTGGAG
13801 AAATTGGGCA AAGCTGAAGT CGGTGGTGAC CTTGTCAACA TTAAGCATGT TGTCCTCGAA
13861 GGGGTTAAAG CTCAACCCTT GACGAGGACT TCGGCTGAGC AATGGGAAGC CTAGACGACT
13921 TTTGCAACGA TCCCACCGCC GCACAAAAAC TCGTGCTGGC CTTTAGCATC ACATATACAC
13981 CCATAATGAT ATACGCCCTT AAGGTGTCAC GCGGCCGACT CCTGGGGCTG TTGCACATCT
14041 TGATATTTCT GAATTGTTCC TTTACTTTTG GGTACATGAC ATATGTGCAT TTTCAATCCA
14101 CCAACCGTGT CGCACTCACT CTGGGGGCTG TAGTCGCCCT TTTGTGGGGT GTTTACAGCC
14161 TCACAGAGTC ATGGAAGTTC ATCACTTCCA GATGCAGATT GTGTTGCCTA GGCCGGCGAT
14221 ACATTCTGGC CCCTGCCCAT CACGTAGAAA GTGCTGCAGG CCTCCATTCA ATCCCAGCGT
14281 CTGGTAACCG AGCATACGCT GTGAGAAAGC CCGGACTAAC ATCAGTGAAC GGCACTCTAG
14341 TACCTGGGCT TCGGAGCCTC GTGCTGGGCG GCAAACGAGC TGTTAAACGA GGAGTGGTTA
14401 ACCTCGTCAA GTATGGCCGG TAAGAACCAG AGCCAGAAGA AAAGAAGAAA TGCAGCTCCG
14461 ATGGGGAAAG GCCAGCCAGT CAATCAACTG TGCCAGTTGC TGGGTACAAT GATAAAGTCC
14521 CAGCGCCAGC AATCTAGGGG AGGACAGGCC AAAAAGAAGA AGCCTGAGAA GCCACATTTT
14581 CCCCTAGCTG CTGAAGATGA CATTCGGCAC CATCTCACCC AGGCCGAACG TTCCCTCTGC
14641 TTGCAATCGA TCCAGACGGC TTTCAATCAA GGCGCAGGAA CTGCGTCGCT TTCATCCAGC
14701 GGGAAGGTCA GTTTCCAGGT TGAGTTCATG CTGCCGGTTG CTCATACAGT GCGCCTGATT
14761 CGCGTGACTT CTACATCCGC CAGTCAGGGT GCAAATTAAT TTGACAGTCA GGTGAATGGC
14821 CGCGATTGAC GTGTGGCCTC TAA

SEC ID Nº:11 ORF 1a DE LA CEPA DEL PRRSV PARENTAL 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEC ID Nº:10 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 178...7227

MSGMFSRCMCTPAARVFWNAGQVYCTRCLSARSLLSPELQDTDLGAVGLFHKPKDKLHWKVPIGI

PQVECSPSGCCWLSTIFPLARMTSGNHNFLQRLVKVADVLYRDGCLTPRHLRELQVYERGCNWY
PITGPVPGMAVYANSMHVSDQPFPGATHVLTNSPLPQRACRQPFCPFEEAHSSIYRWEKFVIFMD
SSSDGRSRMMWTPESDDSTALEVLPPELEHQVKVLVRSFPAHHLVDLADWELTESPENGFSFSTS
HPCGYLVRDPAVSEGKCWLSCFLSQSAEVLSREAHLATAYGYQTKWGVPGKYIQRRLQVHGLRA
VVDPDGPIHVEALSCPQSWIRHLTLNDDVTPGFVRLMSLRIVPNTEPTTHRIFRFGVHKWYGAAGK
RARGKRAAKSEKDSASTLKVARPTSTSGIVTYSPPADGSCGWHALAAILNRMINNDFTSPLPRYNR
PEDDWASDGDLAQAIQCLQLPAAIARNRACPNAKYLVKLNGVHWEVEVRPGMAPRSLSRECVVG
VCSEGCVASPYPEDGLPKRALEALASAYRLPSDCVCDGIIDFLANPPPQEFWTLDKMLTSPSPEQS
GFSSLYKLLLEVLPQKCGSTEGEFIYTVERMLKDCPSSKQAMALLAKIKVPSSKAPSVTLNECFPTD
VPVNSELISWEEPKDPGAAVVLCPSDAKESKETAPEEAQARNRKVLHPVVLTEELSEQQVQVVEG
DQDMPLDLTWPTLTATATPVRGPVPDNLSSGIGAQPATVQELILARPAPRLVERCGTESNGSSSFL
DLPDVQTSDQPLDLSLAAWPVRATASDPGWIHGRREPVFVKPRGVFSDGESALQFGELSEASSVV
DDRTKEAPVVDAPIDLTTSNETLSGSDPFEFAKFRRPRFSAQALIDRGGPLADVHAKIKSRVYEQCL
QACEPGSRATPATKKWLDKMWDRVDMKTWRCTSQFQAGHILESLKFLPDMIQDTPPPVPRKNRA
GDSAGLKQLVAQWDRKLSVTPPTKPVGPVLDQTVPLPMDIQQEDAISADKPPHSQNPSSQVDVGG
GWKSFMLSGTRFAGSVSQRLTTWVFEVLSHLPAFMLTLFSPRGSMAPGDWLFAGAVLLALLLCRS
YPILGCLPLLGVFSGSVRCVRLGVFGSWMAFAVFLFSTPPDPVGSSCDHDSPECHAELLALEQRQL
WEPVRSLVVGPSGLLCVILGKLLGGSRCLWFVLLRICMLADLAISLIYVVSQGRCHKCWGKCIRTAP
AEVTLNVFPFSRATRSSLVSLCDRFQAPKGVDPVHLATGWRGCWCGESPIHQSHQKPIAYANLDE
KKISAQTVIAVPYDPSQAIKCLKVLQAGGAIVDQPTPEVVRVSEIPFSAPFFPKVPVNPDCRVVVDSD
TFVAAVRCGYSTAQLVLGRGNFAKLNQTPLRNSVPTKTTGGASYTLAVAQVSVWTLVHFILGLWLT
SPQVCGRGTSDPWCSNPFSYPTYGPGVVCSSRLCVSADGVTLPLFSAVAHLSGREVGIFILVLASL
GALAHRLALKADMSMVFLAFCAYAWPMSSWLICFFPMLLRWVTLHPLTMLWVHSFLVFCLPAAGV
LSLGITGLLWAVGRFTQVAGIITPYDIHQYTSGPRGAAAVATAPEGTYMAAVRRAALTGRTLIFTPSA
VGSLLEGAFRTQKPCLNTVNVVGSSLGSGGVFTIDGRRVIVTATHVLNGNTARVTGDSYNRMHTF
NTNGDYAWSHADDWQGVAPMVKIAKGYRGRAYWQTSTGVEPGIMGEGFAFCFTNCGDSGSPVI
SEAGDLIGVHTGSNKLGSGLVTTPEGETCSIKETRLSDLSRHFAGPSVPLGDIKLSPAIIPDVTTIPSD
LASLLASVPVMEGGLSTVQLLCVFFLLWRMMGHAWTPIVAVGFFLLNEILPAVLVRAVFSFALFVLA
WATPWSAQVLMIRLLTAALNRNRLSLAFYALGGVVGLATEIGTFAGGWPELSQALSTYCFLPRFLA
VTSYVPTIIIGGLHALGVILWLFKYRCLHNMLVGDGSFSSAFFLRYFAEGNLRKGVSQSCGMNNESL
TAALACKLSQADLDFLSSLTNFKCFVSASNMKNAAGQYIEAAYARALRQELASLVQVDKMKGVLAK
LEAFAETATPSLDTGDVIVLLGQHPHGSILDINVGGERKTVSVQETRCLGGSKFSVCTVVSNTPVDT
LTGIPLQTPTPLFENGPRHRSEDDDLKVERMKKHCVSLGFHKINGKVYCKIWDKSNGDTFYTDDSR
YTQDHAFQDRSTDYRDRDYEGVQTAPQQGFDPKSEAPVGTVVIGGITYNRHLVKGKEVLVPKPDN
CLEAARLSLEQALAGMGQTCDLTATEVEKLKRIISQLQGLTTEQALNC

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

TGFKLLAASGLTRCGRGGLVVTETAVKIVKYHSRTFTLGSLDLKVTSEVEVKKSTEQGHAVVANLC
SGVVLMRPHPPSLVDVLLKPGLDTTPGIQPGHGAGNMGVNGSIWDFETAPTKVELELSKQIIQACE
VRRGDAPNLQLPYKLYPVRGDPERRKGRLVNTRFGDLPYKTPQDTKSAIHAACCLHPNGVLVSDG
KSTLGTTLQHGFELYVPTVPYSVMEYLDSRPDTPFMCTKHGTSKAAAEDLQKYDLSTQGFVLPGVL
RLVRRFIFSHVGKAPPLFLPSTYPAKNSMAGVNGQRFPTKDVQSIPEIDEMCARAVKENWQTVTPC
TLKKQYCSKPKTRTILGTNNFIALAHRSALSGVTQAFMKKAWKSPIALGKNKFKELHCTVAGRCLEA
DLASCDRSTPAIVRWFVANLLYELAGCEEYLPSYVLNCCHDLVATQDGAFTKRGGLSSGDPVTSVS
NTVYSLIIYAQHMVLSALKMGHEIGLKFLEEQLKFEDLLEIQPMLVYSDDLVLYAERPTFPNYHWWV
EHLDLMLGFKTDPKKTVITDKPSFLGCRIEAGRQLVPNRDRILAALAYHMKAQNASEYYASAAAILM
DSCACIDHDPEWYEDLICGIARCARQDGYRFPGPAFFMSMWEKLKSHNEGKKCRHCGICDAKADY
ASACGLDLCLFHSHFHQHCPVTLSCGHHAGSKECSQCQSPVGAGKSPLDAVLKQIPYKPPRTIIMK
VDNKTTTLDPGRYQSRRGLVAVKRGIAGNEVDLSDGDYQVVPLLPTCKDINMVKVACNVLLSKFIV
GPPGSGKTTWLLNQVQDDDVIYTPTHQTMFDIVSALKVCRYSIPGASGLPFPPPARSGPWVRLIAS
GHVPGRVSYLDEAGYCNHLDILRLLSKTPLVCLGDLQQLHPVGFDSYCYVFDQMPQKQLTTIYRFG
PNICAAIQPCYREKLESKARNTRVVFTTRPVAFGQVLTPYHKDRTGSAITIDSSQGATFDIVTLHLPS
PKSLNKSRALVAITRARHGLFIYDPHDQLQEFFNLTPERTDCNLAFSRGDELVVLNVDNAVTTVAKA
LETGSPRFRVSDPRCKSLLAACSASLEGSCMPLPQVAHNLGFYFSPDSPAFAPLPKELAPHWPVV
THQNNRAWPDRLVASMRPIDARYSKPMVGAGYVVGPSIFLGTPGVVSYYLTLYIGGEPQALPETLV
STGRIATDCREYLDAAEEEAARELPHAFIGDVKGTTVGGCHHITSKYLPRSLPKDSVAVVGVSSPG
RAAKAVCTLTDVYLPELRPYLQPETASKCWKLKLDFRDVRLMVWKGATAYFQLEGLTWSALPDYA
RFIQLPKDAVVYIDPCIGPATANRKVVRTTDWRADLAVTPYDYGAQVILTTAWFEDLGPQWKILGLQ
PFRRTFGFENTEDWAILARRMNDGKDYTDYNWHCVRERPHAIYGRARDHTYHFALGTELQVELG
RPRLPPEQVP

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

MQWVHCGVKSVSCSWMPSLSSLLVWLTLSSFSPYCLGSLLQAGYWSSFSEWFAPRFSVRALPFT
LPNYRRSYEGLLPNCRPDVPQFAVKHPLGILWHMRVSHLIDEMVSRRIYRTMEHSGQAAWKQVVS
EATLTKLSRLDVVTHFQHLAAVEADSCRFLSSRLAMLKNLAVGNVSLEYNTTLDRVELIFPTPGTRP
KLTDFRQWLISVHASIFSSVASSVTLFTVLWLRIPALRYVFGFHWPTATHHSN

SEC ID Nº:14 ORF 3 DE LA CEPA DEL PRRSV PARENTAL 94881 CODIFICADO POR LA

SECUENCIA DE SEC ID Nº:10 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 12219...13016

MAYQRARFHLLLCGFVCYLVHSALASNSSSTLCFWFPLAHGNTSFELTINYTICKPCPTSQAAQQR
LEPGRNVWCKIGHDRCEERDHDELSMSIPSGYDNLKLEGYYAWLAFLSFSYAAQFHPELFGIGNVS
RVFVDKRHQFICAEHDGQNSTISARHNISASYAVYYHHQIDGGNWFHLEWLRPFFSSWLVLNISWF
LRRSPASPASRRIYQILRPTRPRLPVSWSFRTSIVSNLTGPQQRKVPLPSGGRPNVVKPSAFPSTS
R

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

MAATILFLLAGAQHLMVSEAFACKPCFSTHLSDIKTNTTAAAGFMVLQNINCFQSHRASTAQGTTPL
RRSSQCREAVGIPQYITITANVTDESYLYNADLLMLSACLFYASEMSEKGFKVIFGNISGVVSACVNF
TDYVAHVTQHTQQHHLVIDHIRLLHFLTPSTMRWATTIACLFAILLAV

SEC ID Nº:16 ORF 5 DE LA CEPA DEL PRRSV PARENTAL 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEC ID Nº:10 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 13309…13914

MKCSCKLGHFLTPHSCFWWLFLLCTGLSWSFVDGNDNSSTSQYIYNLTICELNGTEWLSGHFDWA
VETFVLYPVATHIISLGFLTTSHFLDALGLGAVSATGFIGERYVLSSMYGVCAFAALVCFVIRAAKNC
MACRYARTRFTNFIVDDRGRIHRWKSSIVVEKLGKAEVGGDLVNIKHVVLEGVKAQPLTRTSAEQW
EA

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

MGSLDDFCNDPTAAQKLVLAFSITYTPIMIYALKVSRGRLLGLLHILIFLNCSFTFGYMTYVHFQSTNR
VALTLGAVVALLWGVYSLTESWKFITSRCRLCCLGRRYILAPAHHVESAAGLHSIPASGNRAYAVRK
PGLTSVNGTLVPGLRSLVLGGKRAVKRGVVNLVKYGR

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

MAGKNQSQKKRRNAAPMGKGQPVNQLCQLLGTMIKSQRQQSRGGQAKKKKPEKPHFPLAAEDDI
RHHLTQAERSLCLQSIQTAFNQGAGTASLSSSGKVSFQVEFMLPVAHTVRLIRVTSTSASQGAN

SEC ID Nº:19 Nucleótido que codifica ORF1A del PRRSV atenuado 94881

178 ATG
181 TCTGGGATGT TCTCCCGGTG CATGTGCACC CCGGCTGCCC GGGTATTTTG GAACGCCGGC
241 CAAGTCTATT GCACACGGTG TCTCAGTGCA CGGTCTCTTC TCTCTCCAGA ACTTCAGGAC
301 ACGGACCTCG GTGCAGTTGG CTTGTTTCAC AAGCCTAAAG ACAAGCTCCA TTGGAAAGTT
361 CCCATTGGTA TCCCCCAGGT GGAATGTTCT CCATCTGGGT GTTGCTGGCT GTCAACCATT
421 TTTCCTTTAG CGCGCATGAC CTCCGGCAAT CACAACTTCC TTCAACGACT CGTGAAGGTT
481 GCTGATGTAT TGTACCGTGA CGGTTGCTTA ACCCCTAGAC ACCTCCGTGA ACTCCAAGTT
541 TACGAGCGTG GTTGCAATTG GTATCCGATT ACGGGGCCTG TGCCTGGGAT GGCTGTGTAC
601 GCGAACTCCA TGCACGTGTC CGACCAACCG TTCCCTGGTG CCACTCATGT GTTAACAAAT
661 TCCCCTTTGC CTCAACGGGC TTGTCGGCAG CCGTTCTGTC CGTTCGAAGA GGCCCATTCT
721 AGCATATACA GGTGGGAAAA ATTTGTAATT TTTATGGATT CCTCCTCCGA CGGTCGATCT
781 CGCATGATGT GGACTCCGGA ATCCGATGAC TCCACGGCTT TGGAAGTTCT GCCGCCCGAG
841 CTAGAACACC AGGTCAAGGT CCTTGTTCGG AGCTTTCCCG CCCATCACCT TGTCGACCTT
901 GCCGATTGGG AGCTCACTGA GTCCCCTGAT AACGGTTTTT CCTTCAGCAC GTCACATCCT
961 TGCGGCTACC TTGTTCGGGA CCCGGCTGTA TCCGAAGGCA AGTGTTGGCT TTCCTGCTTT
1021 TTGAGCCAGT CAGCCGAAGT GCTCAGTCGC GAGGCGCATC TGGCTACCGC CTATGGTTAC
1081 CAAACCAAGT GGGGTGTGCC TGGCAAGTAC ATCCAGCGCA GACTTCAAGT TCACGGTCTC
1141 CGTGCTGTGG TCGACCCTGA TGGTCCCATT CACGTTGAAG CATTGTCTTG CCCCCAGTCT
1201 TGGATCAGGC ACTTGACCCT GAATGATGAT GTCACCCCGG GATTCGTTCG CCTAATGTCT
1261 CTTCGCATTG TGCCGAACAC AGAGCCTACC ACACACCGGA TCTTTCGTTT TGGAGTGCAC
1321 AAGTGGTATG GTGCCGCCGG CAAACGGGCC CGTGGCAAGC GTGCCGCCAA AAGTGAGAAA
1381 GACTCGGCTT CCACCCTCAA GGTTGCCCGA CCGACTTCCA CCAGTGGAAT CGTCACCTAC
1441 TCCCCACCTG CGGACGGGTC TTGTGGTTGG CATGCCCTTG CCGCCATACT GAACCGGATG
1501 ATTAATAATG ACTTCACGTC CCCTCTGCCT CGGTACAACA GGCCGGAGGA CGATTGGGCT
1561 TCTGATGGTG ACCTTGCTCA GGCCATTCAA TGTTTGCAAC TACCTGCCGC CATAGCTCGG
1621 AACCGCGCCT GCCCTAACGC CAAATACCTC ATAAAACTCA ACGGAGTTCA TTGGGAGGTA
1681 GAGGTGAGGC CTGGAATGGC TCCTCGCTCC CTCTCTCGTG AGTGCGTTGT TGGCGTCTGC
1741 TCTGAAGGCT GTGTCGCGTC GCCTTACCCG GAGGACGGGT TGCCTAAACG TGCACTTGAG
1801 GCCCTGGCGT CTGCTTATAG ACTGCCTTCA GACTGTGTTT GTGATGGTAT TATTGACTTC
1861 CTTGCCAATC CACCTCCCCA GGAGTTCTGG ACTCTTGACA AAATGTTGAC TTCCCCGTCA
1921 CCGGAGCAGT CCGGCTTCTC TAGTCTGTAT AAATTGTTGT TAGAGATCTT GCCGCAGAAA
1981 TGCGGATCCA CAGAAGGGGA ATTCATCTAT ACTGTTGAGA GGATGTTGAA GGATTGTCCG
2041 AGCTCCAAAC AGGCCATGGC CCTCCTTGCA AAAATTAAGG TCCCATCCTC AAAGGCCCCA
2101 TCCGTGACTC TGAACGAGTG CTTCCCCACG GATGTTCCAG TCAACTCTGA GTTAATATCT
2161 TGGGAAGAGC CCAAAGACCC TGGCGCTGCT GTTGTCCTAT GTCCATCGGA TGCAAAAGAA

2221 TCTAAGGAAA CAGCCCCTGA AGAAGCTCAA GCGAGAAACC GTAAGGTCCT TCACCCTGTG
2281 GTCCTTACCG AGGAACTTAG CGAGCAACAG GTGCAGGTGG TTGAGGGTGA TCAGGATATG
2341 CCACTGGATT TGACTTGGCC AACCTTAACC GCTACGGCGA CCCCTGTTAG AGGGCCGGTA
2401 CCGGACAATT TGAGCTCTGG CATTGGTGCC CAGCCCGCTA CCGTTCAAGA ACTCATTCTG
2461 GCGAGGCCTG CACCCCGTCT TGTTGAGCGC TGTGGCACGG AGTCGAACGG CAGCAGTTCA
2521 TTTCTGGATT TGCCTGACGT GCAGACCTCG GACCAGCCTT TAGACCTGTC CCTGGCCGCG
2581 TGGCCTGTAA GGGCTACCGC GTCTGACCCC GGTTGGATCC ACGGTAGGCG TGAGCCTGTC
2641 TTTGTGAAGC CTCGAGGTGT TTTCTCTGAT GGCGAGTCGG CCCTTCAGTT CGGAGAGCTT
2701 TCCGAAGCCA GTTCTGTCGT CGATGACCGG ACAAAAGAAG CTCCGGTGGT TGACGCCCCC
2761 ATCGATTTGA CAACTTCGAA CGAGACGCTC TCTGGGTCTG ACCCCTTTGA ATTCGCCAAA
2821 TTCAGGCGCC CGCGTTTCTC CGCGCAAGCT TTAATCGACC GAGGTGGTCC GCTTGCCGAT
2881 GTTCATGCAA AGATAAAGAG TCGGGTATAT GAACAATGCC TTCAAGCTTG TGAACCTGGT
2941 AGTCGTGCGA CCCCAGCCAC CAAGAAGTGG CTCGACAAAA TGTGGGACAG GGTGGACATG
3001 AAAACTTGGC GCTGCACCTC GCAGTTCCAA GCTGGTCACA TTCTTGAGTC CCTCAAATTC
3061 CTCCCTGACA TGATTCAAGA CACACCGCCT CCTGTTCCCA GGAAGAACCG AGCTGGTGAC
3121 AGTGCCGGCC TGAAGCAACT GGTGGCGCAG TGGGATAGGA AATCGAGTGT GACACCCCCC
3181 ACAAAACCGG TTGGACCGGT GCTTGACCAG GCCGTCCCTC TGCCTATGGA CATCCAGCAA
3241 GGAGATGCCA TCTCCGCTGA CAAGCCACCC CATTCGCAAA ACCCTTCTAG TCAAGTAGAT
3301 GTGGGTGGAG GTTGGAAAAG TTTTATGCTC TCCGGCACCC GTTTCGCGGG GTCCGTTAGT
3361 CAGCGCCTTA CGACATGGGT TTTTGAGGTT CTCTCCCATC TCCCAGCTTT TATGCTCACA
3421 CTTTTCTCGC CACGGGGCTC TATGGCTCCA GGTGATTGGC TGTTTGCAGG TGCTGTTCTA
3481 CTTGCTCTCC TGCTCTGCCG TTCTTACCCA ATACTCGGAT GCCTTCCCTT ATTGGGTGTC
3541 TTTTCTGGTT CTGTGCGGTG TGTTCGTTTG GGTGTTTTTG GTTCTTGGAT GGCTTTTGCT
3601 GTATTTTTAT TCTCGACTCC ACCCGACCCA GTCGGTTCTT CTTGTGACCA CGATTCGCCG
3661 GAGTGTCATG CTGAGCTTTT GGCTCTTGAG CAGCGCCAAC TTTGGGAACC TGTGCGCAGC
3721 CTTGTGGTCG GGCCATCGGG CCTCTTATGC GTCATTCTTG GCAAGTTACT CGGTGGGTCA
3781 CGTTGTCTCT GGTTTGTTCT CCTACGTATA TGCATGCTCG CAGATTTGGC AATTTCTCTT
3841 ATTTATGTGG TGTCCCAAGG GCGTTGTCAC AAGTGTTGGG GAAAGTGTAT AAGGACGGCT
3901 CCTGCAGAAG TGGCCCTTAA TGTGTTTCCT TTTTCGCGCG CCACCCGCTC ATCTCTTGTG
3961 TCCTTGTGTG ATCGGTTCCA AGCGCCAAAA GGAGTTGACC CCGTGCACTT GGCGACAGGC
4021 TGGCGCGGGT GCTGGTGTGG TGAGAGCCCT ATTCATCAAT CACACCAAAA ACCGATAGCT
4081 TATGCCAACT TGGATGAAAA GAAGATATCC GCCCAGACGG TGATTGCTGT CCCGTATGAT
4141 CCTAGTCAGG CCATTAAATG CCTGAAAGTT TTGCAGGCAG GAGGGGCTAT TGTGGACCAG
4201 CCTACGCCCG AGGTCGTCCG TGTGTCTGAG ATTCCCTTCT CGGCCCCATT TTTTCCGAAG
4261 GTCCCAGTCA ACCCAGACTG CAGGGTTGTG GTAGATTCGG ACACTTTTGT GGCTGCGGTC
4321 CGCTGCGGTT ATTCGACAGC ACAACTGGTC CTTGGTCGGG GCAACTTTGC CAAGCTAAAT
4381 CAGACCCCCC TCAGGAACTC TGTCCCCACC AAAACAACTG GTGGGGCCTC ATACACCCTT

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

6661 GTCGTGTCCA ACACGCCCGT GGATACCTTG ACCGGTATCC CACTTCAGAC GCCAACCCCA
6721 CTTTTTGAAA ATGGCCCGCG CCATCGCAGC GAGGACGACG ACCTCAAAGT TGAGAGAATG
6781 AAAAAACACT GTGTATCCCT CGGCTTCCAC AAAATCAATG GTAAAGTTTA CTGCAAAATT
6841 TGGGACAAGT CTAACGGCGA CACCTTTTAC ACGGATGATT CCCGATACAC TCAAGACCAT
6901 GCTTTTCAGG ACAGGTCAAC CGACTATAGA GACAGGGATT ATGAAGGTGT ACAGACCGCC
6961 CCCCAACAGG GATTCGATCC AAAGTCCGAA GCCCCTGTTG GCACTGTTGT AATCGGTGGC
7021 ATTACGTATA ACAGGCATCT GGTCAAAGGT AAGGAGGTCC TAGTTCCCAA ACCTGACAAC
7081 TGCCTTGAAG CTGCCAGACT GTCCCTTGAG CAAGCTCTTG CTGGGATGGG CCAAACTTGT
7141 GACCTTACAG CTACCGAAGT GGAGAAACTA AAGCGCATCA TTAGTCAACT CCAAGGTCTG
7201 ACCACTGAAC AGGCTTTAAA CTGCTAG

SEC ID Nº:20 Nucleótido que codifica ORF1B del PRRSV atenuado 94881

7209 AC AGGCTTTAAA CTGCTAGCCG CCAGCGGCTT GACCCGCTGT GGCCGCGGCG
7261 GCCTAGTTGT AACTGAAACG GCGGTAAAAA TCGTAAAATA CCACAGCAGA ACTTTCACCT
7321 TAGGCTCTTT AGACCTAAAA GTCACCTCCG AGGTGGAGGT GAAGAAATCA ACTGAGCAGG
7381 GGCACGCTGT CGTGGCGAAC TTATGTTCCG GTGTCGTCTT GATGAGGCCT CACCCACCGT
7441 CCCTTGTTGA CGTTCTCCTC AAACCCGGAC TTGACACAAC ACCCGGCATT CAACCAGGGC
7501 ATGGGGCCGG GAATATGGGC GTGAACGGTT CTATTTGGGA TTTTGAAACT GCACCCACAA
7561 AGGTAGAACT AGAGTTGTCC AAGCAAATAA TCCAAGCATG TGAAGTCAGG CGCGGGGACG
7621 CCCCTAACCT CCAACTCCCC TACAAGCTTT ATCCTGTCAG GGGGGACCCC GAGCGGCGTA
7681 AAGGTCGCCT TGTCAACACT AGGTTTGGAG ATTTACCTTA CAAAACTCCC CAAGACACCA
7741 AGTCCGCAAT TCATGCGGCT TGTTGCCTGC ATCCCAATGG GGTCCTCGTG TCTGATGGCA
7801 AATCCACGCT GGGTACCACT CTTCAACATG GTTTCGAGCT TTATGTCCCC ACTGTACCTT
7861 ATAGTGTCAT GGAATACCTT GATTCACGCC CTGACACCCC TTTTATGTGT ACTAAACATG
7921 GCACTTCCAA GGCTGCTGCA GAGGACCTCC AAAAATATGA CCTATCCACT CAAGGGTTTG
7981 TCTTGCCTGG GGTCCTACGC CTAGTGCGCA GGTTCATCTT TAGCCATGTT GGTAAGGCGC
8041 CACCACTGTT CCTTCCATCA ACCTACCCTG CCAAGAACTC CATGGCAGGG GTCAATGGCC
8101 AGAGGTTCCC AACAAAGGAT GTCCAGAGCA TACCTGAAAT TGATGAAATG TGCGCCCGTG
8161 CCGTCAAGGA AAATTGGCAG ACTGTGACAC CTTGCACCCT CAAAAAACAG TACTGTTCCA
8221 AACCTAAAAC TAGAACCATC CTAGGTACCA ACAACTTCAT AGCCTTGGCT CACAGGTCAG
8281 CACTCAGTGG TGTCACCCAG GCGTTCATGA AGAAGGCCTG GAAGTCCCCA ATTGCCTTGG
8341 GGAAAAACAA GTTTAAGGAA TTGCATTGCA CTGTCGCCGG CAGATGCCTT GAGGCTGACC
8401 TGGCTTCCTG CGATCGCAGC ACCCCCGCCA TTGTGAGGTG GTTTGTTGCC AACCTCCTGT
8461 ATGAACTTGC AGGATGTGAA GAGTACTTGC CTAGCTACGT GCTCAACTGT TGCCATGACC
8521 TTGTGGCAAC GCAGGATGGC GCTTTCACAA AACGCGGTGG CCTGTCGTCC GGGGACCCCG

8581 TCACCAGTGT GTCCAACACC GTCTACTCAC TGATAATTTA CGCCCAGCAC ATGGTGCTTT
8641 CGGCCTTGAA GATGGGTCAT GAAATTGGTC TCAAGTTCCT TGAGGAACAG CTCAAATTTG
8701 AGGACCTTCT TGAAATCCAG CCCATGTTAG TGTATTCTGA TGACCTCGTC TTGTATGCGG
8761 AAAGACCCAC TTTTCCCAAC TACCATTGGT GGGTCGAGCA TCTTGACCTG ATGTTGGGCT
8821 TTAAAACGGA CCCAAAGAAA ACTGTCATAA CTGATAAACC CAGTTTTCTC GGCTGCAGAA
8881 TTGAAGCAGG ACGGCAGTTA GTCCCCAATC GCGACCGTAT TCTGGCTGCT CTTGCATATC
8941 ATATGAAGGC GCAGAACGCC TCAGAGTATT ATGCGTCCGC TGCCGCAATT CTGATGGATT
9001 CGTGTGCTTG CATTGACCAT GACCCCGAGT GGTATGAGGA TCTTATCTGC GGCATCGCCC
9061 GGTGTGCTCG CCAGGACGGT TACCGTTTTC CAGGCCCGGC ATTTTTCATG TCCATGTGGG
9121 AGAAGCTGAA AAGTCATAAT GAAGGGAAGA AATGCCGTCA CTGCGGCATC TGCGACGCCA
9181 AAGCCGACTA TGCGTCCGCC TGTGGACTTG ATTTGTGTTT GTTCCATTCA CACTTTCATC
9241 AACACTGCCC AGTCACTCTG AGCTGTGGCC ACCATGCCGG TTCAAAGGAA TGTTCGCAGT
9301 GTCAGTCACC TGTCGGGGCT GGCAAATCCC CCCTTGACGC TGTGCTGAAA CAAATCCCGT
9361 ACAAACCTCC TCGTACCATT ATCATGAAGG TGGACAACAA AACAACGACC CTTGACCCGG
9421 GAAGATATCA GTCCCGTCGA GGTCTTGTTG CAGTCAAAAG AGGTATTGCA GGTAATGAGG
9481 TTGATCTTTC TGATGGAGAC TACCAAGTGG TGCCTCTTTT GCCGACTTGC AAAGACATAA
9541 ACATGGTGAA GGTGGCTTGC AACGTACTAC TCAGCAAGTT TATAGTAGGG CCGCCAGGTT
9601 CCGGAAAAAC CACCTGGCTA CTGAACCAAG TCCAGGACGA TGATGTCATT TACACACCTA
9661 CTCATCAGAC AATGTTTGAC ATAGTCAGTG CTCTTAAAGT TTGCAGGTAT TCCATCCCAG
9721 GAGCCTCAGG ACTCCCTTTT CCACCACCTG CCAGGTCCGG GCCGTGGGTT AGGCTCATCG
9781 CCAGCGGACA TGTCCCTGGC CGAGTGTCAT ATCTCGATGA GGCAGGATAT TGCAATCATC
9841 TAGACATTCT AAGGCTGCTT TCCAAAACAC CCCTTGTGTG TTTGGGTGAC CTTCAGCAAC
9901 TTCACCCGGT CGGCTTTGAT TCCTATTGTT ATGTGTTCGA TCAGATGCCT CAGAAGCAGC
9961 TGACCACCAT TTATAGATTT GGCCCTAACA TCTGTGCAGC CATCCAGCCT TGTTACAGGG
10021 AGAAACTTGA ATCCAAGGCC AGGAACACCA GAGTGGTTTT CACCACCCGG CCTGTGGCCT
10081 TTGGTCAGGT CCTGACACCG TACCACAAAG ATCGTACCGG CTCTGCAATA ACTATAGATT
10141 CATCCCAGGG GGCGACCTTC GACATTGTGA CATTGCATCT ACCATCGCCA AAGTCCCTAA
10201 ACAAATCCCG AGCACTTGTA GCCATCACTC GGGCAAGACA TGGGTTGTTC ATTTATGACC
10261 CTCATGACCA ACTCCAGGAG TTTTTCAACT TAACCCCCGA GCGCACTGAT TGTAACCTTG
10321 CGTTCAGCCG TGGGGATGAG CTGGTTGTTT TGAATGTGGA TAATGCGGTC ACAACTGTAG
10381 CGAAGGCCCT AGAGACAGGT TCACCCCGAT TTCGAGTATC GGACCCGAGG TGCAAGTCTC
10441 TCTTAGCCGC TTGTTCGGCC AGTCTAGAAG GGAGCTGCAT GCCACTACCA CAAGTAGCAC
10501 ATAACCTGGG GTTTTACTTT TCCCCGGACA GCCCAGCTTT TGCACCCCTG CCAAAAGAGC
10561 TGGCGCCACA TTGGCCAGTG GTCACCCACC AGAATAATCG AGCGTGGCCT GATCGACTTG
10621 TCGCTAGTAT GCGCCCAATT GATGCCCGCT ACAGCAAGCC AATGGTCGGT GCAGGGTATG
10681 TGGTCGGGCC ATCCATTTTT CTTGGCACTC CTGGTGTGGT GTCATACTAT CTCACATTAT
10741 ACATCGGGGG CGAGCCTCAG GCCCTGCCAG AAACACTCGT TTCAACAGGA CGTATAGCCA

10801 CAGATTGTCG GGAATATCTC GACGCGGCTG AGGAAGAGGC AGCGAGAGAA CTTCCCCACG
10861 CATTTATTGG CGATGTCAAA GGCACTACGA TCGGGGGGTG TCACCACATT ACATCGAAAT
10921 ACCTACCTAG GTCCCTGCCT AAAGACTCTG TTGCTGTGGT TGGGGTGAGT TCGCCCGGTA
10981 GGGCTGCTAA AGCCGTGTGC ACTCTCACCG ATGTGTACCT CCCCGAACTC CGACCATATT
11041 TGCAACCGGA GACGGCATCA AAATGCTGGA AACTTAAACT GGATTTCAGG GATGTTCGAC
11101 TGATGGTCTG GAAAGGCGCC ACAGCCTATT TCCAGTTGGA AGGGCTGACA TGGTCAGCGC
11161 TGCCCGATTA TGCTAGGTTC ATTCAGCTAC CCAAGGATGC CGTTGTGTAC ATCGATCCGT
11221 GTATAGGGCC GGCAACAGCC AATCGCAAGG TTGTGCGAAC CACAGACTGG CGGGCCGACC
11281 TGGCAGTGAC ACCGTATGAT TACGGTGCTC AGGTCATTTT GACAACAGCC TGGTTCGAGG
11341 ACCTTGGGCC GCAGTGGAAG ATTTTGGGGT TGCAGCCTTT CAGACGAACA TTTGGCTTTG
11401 AGAACACTGA AGATTGGGCA ATTCTCGCAC GCCGTATGAA TGACGGCAAA GATTACACTG
11461 ACTATAATTG GCATTGTGTA CGAGAACGCC CACACGCAAT TTACGGGCGC GCCCGTGACC
11521 ATACGTATCA TTTTGCCCTT GGCACTGAAC TGCAAGTAGA GCTGGGCAGA CCCCGGCTGC
11581 CTCCTGAGCA AGTGCCGTGA

SEC ID Nº:21 Nucleótido que codifica ORF2 del PRRSV atenuado 94881

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

SEC ID Nº:22 Nucleótido que codifica ORF3 del PRRSV atenuado 94881

12219 AT GGCTTATCAG CGTGCACGCT
12241 TCCATCTTCT CCTCTGTGGC TTCGTCTGTT ACCTTGTTCA CAGTGCTTTG GCTTCGAATT
12301 CCAGCTCTAC GCTATGTTTT TGGTTTCCAT TGGCCCACGG CAACACATCA TTCGAACTAA

12361 CTATCAATTA CACTATATGT AAGCCATGCC CTACCAGTCA AGCTGCCCAA CAAAGACTCG
12421 AGCCTGGCCG TAACGTGTGG TGCAAAATAG GGCACGACAG GTGTGAGGAA CGTGACCATG
12481 ATGAGTTGTC AATGTCCATT CCGTCCGGGT ACGACAACCT CAAACTTGAG GGTTATTATG
12541 CTTGGCTGGC TTTTTTGTCC TTTTCCTACG CGGCCCAATT CCATCCGGAG CTGTTCGGAA
12601 TAGGAAACGT GTCGCGCGTC TTTGTGGATA AGCGACACCA GTTCATTTGC GCCGAGCATG
12661 ATGGACAAAA TTCAACCATA TCTGCCAGAC ACAACATCTC CGCGTCGTAT GCGGTGTATT
12721 ACCATCATCA AATAGACGGG GGCAATTGGT TTCATTTGGA ATGGCTGCGA CCATTCTTTT
12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT
12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCCT
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT
12961 CAGGAGGTCG TCCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAA

SEC ID Nº:23 Nucleótido que codifica ORF4 del PRRSV atenuado 94881

12761 ATGGCTGCGA CCATTCTTTT
12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT
12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCCT
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT
12961 CAGGAGGTCG TCCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAACGGC
13021 TAATGTGACC GATGAATCGT ATTTGTACAA CGCGGACTTG CTGATGCTTT CCGCGTGCCT
13081 TTTCTACGCC TCGGAAATGA GCGAGAAAGG CTTCAAAGTC ATCTTTGGGA ATATTTCTGG
13141 CGTTGTTTCC GCTTGTGTTA ATTTCACAGA TTATGTGGCC CATGTGACCC AACACACTCA
13201 GCAGCACCAT TTGGTAATTG ATCACATTCG GTTACTACAC TTCTTGACAC CGTCTACGAT
13261 GAGGTGGGCT ACAACCATTG CTTGTTTGCT TGCCATTCTT TTGGCGGTAT GA

SEC ID Nº:24 Nucleótido que codifica ORF5 del PRRSV atenuado 94881

13309 AT GAAATGTTCT
13321 TGCAAGTTGG GGCATTTCTT GACTCCTCAC TCTTGCTTCT GGTGGCTTTT TTTGCTGTGT
13381 ACCGGCTTGT CTTGGTCCTT TGTCGATGGC AACGACGACA GCTCGACATC CCAATACATA
13441 TATAATTTGA CGATATGCGA GCTGAATGGG ACCGAATGGT TGTCCGGTCA TTTTGATTGG
13501 GCAGTCGAAA CCTTTGTGCT TTACCCAGTT GCCACTCATA TCATTTCACT GGGTTTTCTC
13561 ACAACAAGCC ATTTCCTTGA TGCGCTCGGT CTCGGCGCTG TGTCCGCCAC AGGATTCATT
13621 GGCGAGCGGT ATGTACTTAG CAGCATGTAC GGCGTTTGCG CCTTCGCGGC GTTCGTATGT
13681 TTTGTCATCC GTGCTGCTAA AAATTGCATG GCTTGCCGCT ATGCCCGCAC CCGGTTTACC
13741 AACTTCATCG TGGACGACCG GGGAAGAATC CATCGATGGA AGTCTTCAAT AGTGGTGGAG

13801 AAATTGGGCA AAGCTGAAGT CGGTGGTGAC CTTGTCAACA TTAAGCATGT TGTCCTCGAA
13861 GGGGTTAAAG CTCAACCTTT GACGAGGACT TCGGCTGAGC AATGGGAAGC CTAG

SEC ID Nº:25 Nucleótido que codifica ORF6 del PRRSV atenuado 94881

13902 ATGGGAAGC CTAGACGACT
13921 TTTGCAACGA TCCCACCGCC GCACAAAAAC TCGTGCTGGC CTTTAGCATC ACATATACAC
13981 CCATAATGAT ATACGCCCTT AAGGTGTCAC GCGGCCGACT CCTGGGGCTG TTGCACATCT
14041 TGATATTTCT GAATTGTTCC TTTACTTTTG GGTACATGAC ATATGTGCAT TTTCAATCCA
14101 CCAACCGTGT CGCATTCACT CTGGGGGCTG TAGTCGCCCT TTTGTGGGGT GTTTACAGCC
14161 TCACAGAGTC ATGGAAGTTC ATCACTTCCA GATGCAGATT GTGTTGCCTA GGCCGGCGAT
14221 ACATTCTGGC CCCTGCCCAT CACGTAGAAA GTGCTGCAGG CCTCCATTCA ATCCCAGCGT
14281 CTGGTAACCG AGCATACGCT GTGAGAAAGC CCGGACTAAC ATCAGTGAAC GGCACTCTAG
14341 TACCTGGGCT TCGGAGCCTC GTGCTGGGCG GCAAACGAGC TGTTAAACGA GGAGTGGTTA
14401 ACCTCGTCAA GTATGGCCGG TAA

SEC ID Nº:26 Nucleótido que codifica ORF7 del PRRSV atenuado 94881

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

SEC ID Nº:27 Nucleótido que codifica ORF1a del PRRSV atenuado 94881

178 ATG
181 TCTGGGATGT TCTCCCGGTG CATGTGCACC CCGGCTGCCC GGGTATTTTG GAACGCCGGC
241 CAAGTCTATT GCACACGGTG TCTCAGTGCA CGGTCTCTTC TCTCTCCAGA ACTTCAGGAC
301 ACGGACCTCG GTGCAGTTGG CTTGTTTCAC AAGCCTAAAG ACAAGCTCCA TTGGAAAGTT
361 CCCATTGGTA TCCCCCAGGT GGAATGTTCT CCATCTGGGT GTTGCTGGCT GTCAACCATT
421 TTTCCTTTAG CGCGCATGAC CTCCGGCAAT CACAACTTCC TTCAACGACT CGTGAAGGTT
481 GCTGACGTAT TGTACCGTGA CGGTTGCTTA ACCCCTAGAC ACCTCCGTGA ACTCCAAGTT

541 TACGAGCGTG GTTGCAATTG GTATCCGATT ACGGGGCCTG TGCCTGGGAT GGCTGTGTAC
601 GCGAACTCCA TGCACGTGTC CGACCAACCG TTCCCTGGTG CCACTCATGT GTTAACAAAT
661 TCCCCTTTGC CTCAACGGGC TTGTCGGCAG CCGTTCTGTC CGTTCGAAGA GGCCCATTCT
721 AGCATATACA GGTGGGAAAA ATTTGTAATT TTTATGGATT CCTCCTCCGA CGGTCGATCT
781 CGCATGATGT GGACTCCGGA ATCCGATGAC TCCACGGCTT TGGAAGTTCT GCCGCCCGAG
841 CTAGAACACC AGGTCAAGGT CCTTGTTCGG AGCTTTCCCG CCCATCACCT TGTCGACCTT
901 GCCGATTGGG AGCTCACTGA GTCCCCTGAG AACGGTTTTT CCTTCAGCAC GTCACATCCT
961 TGCGGCTACC TTGTTCGGGA CCCGGCTGTA TCCGAAGGCA AGTGTTGGCT TTCCTGCTTT
1021 TTGAGCCAGT CAGCCGAAGT GCTCAGTCGC GAGGCGCATC TGGCTACCGC CTATGGTTAC
1081 CAAACCAAGT GGGGTGTGCC TGGCAAGTAC ATCCAGCGCA GACTTCAAGT TCACGGTCTC
1141 CGTGCTGTGG TCGACCCTGA TGGTCCCATT CACGTTGAAG CATTGTCTTG CCCCCAGTCT
1201 TGGATCAGGC ACTTGACCCT GAATGATGAT GTCACCCCGG GATTCGTTCG CCTAATGTCT
1261 CTTCGCATTG TGCCGAACAC AGAGCCTACC ACACACCGGA TCTTTCGTTT TGGAGTGCAC
1321 AAGTGGTATG GTGCCGCCGG CAAACGGGCC CGTGGCAAGC GTGCCGCCAA AAGTGAGAAA
1381 GACTCGGCTT CCACCCTCAA GGTTGCCCGA CCGACTTCCA CCAGTGGAAT CGTCACCTAC
1441 TCCCCACCTG CGGACGGGTC TTGTGGTTGG CATGCCCTTG CCGCCATACT GAACCGGATG
1501 ATTAATAATG ACTTCACGTC CCCTCTGCCT CGGTACAACA GGCCGGAGGA CGATTGGGCT
1561 TCTGATGGTG ACCTTGCTCA GGCCATTCAA TGTTTGCAAC TACCTGCCGC CATAGCTCGG
1621 AACCGCGCCT GCCCTAACGC CAAATACCTC GTAAAACTCA ACGGAGTTCA TTGGGAGGTA
1681 GAGGTGAGGC CTGGAATGGC TCCTCGCTCC CTCTCTCGTG AGTGCGTTGT TGGCGTCTGC
1741 TCTGAAGGCT GTGTCGCGTC GCCTTACCCG GAGGACGGGT TGCCTAAACG TGCACTTGAG
1801 GCCCTGGCGT CTGCTTATAG ACTGCCTTCA GACTGTGTTT GTGATGGTAT TATTGACTTC
1861 CTTGCCAATC CACCTCCCCA GGAGTTCTGG ACTCTTGACA AAATGTTGAC TTCCCCGTCA
1921 CCGGAGCAGT CCGGCTTCTC TAGTCTGTAT AAATTGTTGT TAGAGGTCTT GCCGCAGAAA
1981 TGCGGATCCA CAGAAGGGGA ATTCATCTAT ACTGTTGAGA GGATGTTGAA GGATTGTCCG
2041 AGCTCCAAAC AGGCCATGGC CCTCCTTGCA AAAATTAAGG TCCCATCCTC AAAGGCCCCA
2101 TCCGTGACTC TGAACGAGTG CTTCCCCACG GATGTTCCAG TCAACTCTGA GTTAATATCT
2161 TGGGAAGAGC CCAAAGACCC TGGCGCTGCT GTTGTCCTAT GTCCATCGGA TGCAAAAGAA
2221 TCTAAGGAAA CAGCCCCTGA AGAAGCTCAA GCGAGAAACC GTAAGGTCCT CCACCCTGTG
2281 GTCCTTACCG AGGAACTTAG CGAGCAACAG GTGCAGGTGG TTGAGGGTGA TCAGGATATG
2341 CCACTGGATT TGACTTGGCC AACCTTAACC GCTACGGCGA CCCCTGTTAG AGGGCCGGTA
2401 CCGGACAATT TGAGCTCTGG CATTGGTGCC CAGCCCGCTA CCGTTCAAGA ACTCATTCTG
2461 GCGAGGCCTG CACCCCGTCT TGTTGAGCGC TGTGGCACGG AGTCGAACGG CAGCAGTTCA
2521 TTTCTGGATT TGCCTGACGT GCAGACCTCG GACCAGCCTT TAGACCTGTC CCTGGCCGCG
2581 TGGCCTGTAA GGGCTACCGC GTCTGACCCC GGTTGGATCC ACGGTAGGCG TGAGCCTGTC
2641 TTTGTGAAGC CTCGAGGTGT TTTCTCTGAT GGCGAGTCGG CCCTTCAGTT CGGAGAGCTT
2701 TCCGAAGCCA GTTCTGTCGT CGATGACCGG ACAAAAGAAG CTCCGGTGGT TGACGCCCCC

2761 ATCGATTTGA CAACTTCGAA CGAGACGCTC TCTGGGTCTG ACCCCTTTGA ATTCGCCAAA
2821 TTCAGGCGCC CGCGTTTCTC CGCGCAAGCT TTAATCGACC GAGGTGGTCC GCTTGCCGAT
2881 GTTCATGCAA AGATAAAGAG TCGGGTATAT GAACAATGCC TTCAAGCTTG TGAACCTGGT
2941 AGTCGTGCGA CCCCAGCCAC CAAGAAGTGG CTCGACAAAA TGTGGGACAG GGTGGACATG
3001 AAAACTTGGC GCTGCACCTC GCAGTTCCAA GCTGGTCACA TTCTTGAGTC CCTCAAATTC
3061 CTCCCTGACA TGATTCAAGA CACACCGCCT CCTGTTCCCA GGAAGAACCG AGCTGGTGAC
3121 AGTGCCGGCC TGAAGCAACT GGTGGCGCAG TGGGATAGGA AATTGAGTGT GACACCCCCC
3181 ACAAAACCGG TTGGACCGGT GCTTGACCAG ACCGTCCCTC TGCCTATGGA CATCCAGCAA
3241 GAAGATGCCA TCTCCGCTGA CAAGCCACCC CATTCGCAAA ACCCTTCTAG TCAAGTAGAT
3301 GTGGGTGGAG GTTGGAAAAG TTTTATGCTC TCCGGCACCC GTTTCGCGGG GTCCGTTAGT
3361 CAGCGCCTTA CGACATGGGT TTTTGAGGTT CTCTCCCATC TCCCAGCTTT TATGCTCACA
3421 CTTTTCTCGC CACGGGGCTC TATGGCTCCA GGTGATTGGC TGTTTGCAGG TGCTGTTCTA
3481 CTTGCTCTCC TGCTCTGCCG TTCTTACCCA ATACTCGGAT GCCTTCCCTT ATTGGGTGTC
3541 TTTTCTGGTT CTGTGCGGTG TGTTCGTTTG GGTGTTTTTG GTTCTTGGAT GGCTTTTGCT
3601 GTATTTTTAT TCTCGACTCC ACCCGACCCA GTCGGTTCTT CTTGTGACCA CGATTCGCCG
3661 GAGTGTCATG CTGAGCTTTT GGCTCTTGAG CAGCGCCAAC TTTGGGAACC TGTGCGCAGC
3721 CTTGTGGTCG GGCCATCGGG CCTCTTATGC GTCATTCTTG GCAAGTTACT CGGTGGGTCA
3781 CGTTGTCTCT GGTTTGTTCT CCTACGTATA TGCATGCTCG CAGATTTGGC AATTTCTCTT
3841 ATTTATGTGG TGTCCCAAGG GCGTTGTCAC AAGTGTTGGG GAAAGTGTAT AAGGACGGCT
3901 CCTGCAGAAG TGACCCTTAA TGTGTTTCCT TTTTCGCGCG CCACCCGCTC ATCTCTTGTG
3961 TCCTTGTGTG ATCGGTTCCA AGCGCCAAAA GGAGTTGACC CCGTGCACTT GGCGACAGGC
4021 TGGCGCGGGT GCTGGTGTGG TGAGAGCCCT ATTCATCAAT CACACCAAAA ACCGATAGCT
4081 TATGCCAACT TGGATGAAAA GAAGATATCC GCCCAGACGG TGATTGCTGT CCCGTATGAT
4141 CCCAGTCAGG CCATTAAATG CCTGAAAGTT TTGCAGGCAG GAGGGGCTAT TGTGGACCAG
4201 CCTACGCCCG AGGTCGTCCG TGTGTCTGAG ATTCCCTTCT CGGCCCCATT TTTTCCGAAG
4261 GTCCCAGTCA ACCCAGATTG CAGGGTTGTG GTAGATTCGG ACACTTTTGT GGCTGCGGTC
4321 CGCTGCGGTT ATTCGACAGC ACAACTGGTC CTTGGTCGGG GCAACTTTGC CAAGCTAAAT
4381 CAGACCCCCC TCAGGAACTC TGTCCCCACC AAAACAACTG GTGGGGCCTC ATACACCCTT
4441 GCCGTGGCCC AGGTATCTGT GTGGACTCTT GTTCATTTCA TCCTCGGCCT TTGGTTAACG
4501 TCACCTCAAG TGTGTGGTCG AGGGACCTCT GACCCGTGGT GTTCGAACCC TTTTTCGTAT
4561 CCTACTTATG GCCCCGGAGT TGTGTGTTCC TCTCGACTCT GCGTGTCTGC CGACGGAGTT
4621 ACCCTGCCAT TGTTCTCAGC CGTTGCCCAT CTTTCCGGTA GAGAGGTGGG GATTTTTATT
4681 TTGGTGCTTG CCTCCTTGGG CGCTTTAGCC CACCGCTTGG CTCTTAAGGC AGACATGTCA
4741 ATGGTCTTTT TGGCGTTTTG TGCTTACGCC TGGCCCATGA GCTCCTGGTT AATTTGCTTC
4801 TTTCCTATGC TCTTGAGGTG GGTAACCCTT CATCCTCTCA CTATGCTTTG GGTGCACTCA
4861 TTTTTGGTGT TTTGCCTACC AGCTGCCGGC GTTCTCTCGC TGGGAATAAC CGGTCTTCTT
4921 TGGGCAGTTG GCCGTTTCAC CCAGGTTGCC GGAATTATCA CACCTTATGA CATCCACCAG

4981 TATACCTCCG GACCACGTGG TGCAGCTGCT GTAGCAACGG CTCCAGAAGG TACTTACATG
5041 GCGGCCGTTC GGAGAGCCGC TTTGACTGGA CGGACTTTGA TCTTCACACC ATCTGCAGTC
5101 GGATCCCTTC TTGAAGGTGC TTTCAGAACT CAAAAGCCCT GCCTTAACAC CGTGAATGTC
5161 GTAGGCTCTT CCCTTGGTTC TGGAGGAGTT TTCACCATTG ATGGCAGAAG AGTCATCGTC
5221 ACTGCCACCC ATGTGTTGAA TGGTAACACA GCCAGGGTCA CTGGTGATTC CTACAACCGC
5281 ATGCACACGT TCAATACTAA TGGTGATTAT GCCTGGTCCC ATGCTGATGA CTGGCAAGGC
5341 GTTGCCCCTA TGGTTAAGAT CGCTAAGGGG TATCGCGGTC GTGCCTACTG GCAAACGTCA
5401 ACCGGAGTCG AACCTGGCAT CATGGGGGAA GGATTCGCCT TCTGTTTCAC TAACTGTGGC
5461 GACTCAGGGT CACCTGTCAT TTCAGAAGCT GGTGACCTTA TTGGAGTCCA TACCGGTTCA
5521 AACAAACTCG GTTCTGGTCT TGTGACAACC CCTGAAGGGG AGACCTGCTC CATCAAGGAA
5581 ACTAGGCTCT CTGACCTTTC TAGACATTTT GCAGGTCCAA GCGTCCCTCT TGGGGACATT
5641 AAGTTGAGCC CAGCCATCAT CCCTGATGTG ACAACTATTC CGAGTGACTT GGCATCGCTC
5701 CTTGCTTCTG TCCCCGTGAT GGAAGGTGGC CTCTCAACTG TCCAGCTTTT GTGCGTCTTT
5761 TTCCTTCTCT GGCGCATGAT GGGCCATGCC TGGACACCCA TTGTTGCCGT AGGCTTCTTT
5821 TTGCTGAATG AAATTCTCCC AGCAGTCTTG GTCCGAGCTG TGTTCTCTTT TGCACTCTTT
5881 GTACTTGCAT GGGCCACCCC CTGGTCGGCA CAAGTGTTGA TGATTAGACT CCTCACGGCG
5941 GCTCTCAACC GCAACAGGTT GTCCCTGGCG TTCTACGCAC TCGGAGGTGT CGTTGGCCTG
6001 GCCACAGAAA TCGGGACTTT TGCTGGTGGA TGGCCTGAAC TGTCCCAAGC CCTCTCGACA
6061 TACTGCTTCC TGCCCAGGTT CCTTGCTGTG ACTAGTTATG TCCCCACCAT CATCATCGGT
6121 GGGCTCCATG CCCTCGGCGT AATTTTGTGG TTATTCAAAT ACCGATGCCT CCACAACATG
6181 CTGGTTGGTG ATGGGAGTTT CTCAAGCGCT TTCTTCCTAC GGTATTTTGC TGAGGGTAAT
6241 CTTAGGAAAG GCGTGTCGCA GTCCTGTGGC ATGAATAACG AATCCCTGAC AGCTGCTTTG
6301 GCTTGCAAGT TGTCGCAAGC TGACCTTGAT TTTTTGTCCA GTTTAACGAA CTTCAAGTGC
6361 TTTGTGTCCG CTTCAAACAT GAAAAATGCA GCTGGCCAAT ACATCGAGGC GGCGTATGCT
6421 AGAGCTCTGC GTCAGGAGCT GGCCTCCTTG GTTCAGGTTG ACAAGATGAA AGGAGTATTG
6481 GCCAAGCTCG AGGCTTTCGC TGAGACGGCC ACTCCGTCAC TTGACACAGG TGACGTGATT
6541 GTTCTGCTTG GGCAACACCC CCATGGATCC ATCCTCGACA TTAATGTGGG GGGTGAAAGG
6601 AAAACTGTGT CTGTGCAAGA AACACGATGC CTGGGTGGTT CCAAATTCAG TGTCTGCACT
6661 GTCGTGTCCA ACACGCCCGT GGATACCTTG ACCGGCATCC CACTTCAGAC GCCAACCCCA
6721 CTTTTTGAAA ATGGCCCGCG CCATCGCAGC GAGGACGACG ACCTTAAAGT TGAGAGAATG
6781 AAAAAACACT GTGTATCCCT CGGCTTCCAC AAAATCAATG GTAAAGTTTA CTGCAAAATT
6841 TGGGACAAGT CTAACGGCGA CACCTTTTAC ACGGATGATT CCCGATACAC TCAAGACCAT
6901 GCTTTTCAGG ACAGGTCAAC CGACTATAGA GACAGGGATT ATGAAGGTGT ACAGACCGCC
6961 CCCCAACAGG GATTCGATCC AAAGTCCGAA GCCCCTGTTG GCACTGTTGT AATCGGTGGC
7021 ATTACGTATA ACAGGCATCT GGTCAAAGGT AAGGAGGTCC TAGTTCCCAA ACCTGACAAC
7081 TGCCTTGAAG CTGCCAGACT GTCCCTTGAG CAAGCTCTTG CTGGGATGGG CCAAACTTGT
7141 GACCTTACAG CTACCGAAGT GGAGAAACTA AAGCGCATCA TTAGTCAACT CCAAGGTCTG

7201 ACCACTGAAC AGGCTTTAAA CTGCTAGCCG CCAGCGGCTT GACCCGCTGT GGCCGCGGCG

SEC ID Nº:28 Nucleótido que codifica ORF1b del PRRSV atenuado 94881

7209 AC AGGCTTTAAA CTGCTAGCCG CCAGCGGCTT GACCCGCTGT GGCCGCGGCG
7261 GCCTAGTTGT AACTGAAACG GCGGTAAAAA TCGTAAAATA CCACAGCAGA ACTTTCACCT
7321 TAGGCTCTTT AGACCTAAAA GTCACCTCCG AGGTGGAGGT GAAGAAATCA ACTGAGCAGG
7381 GGCACGCTGT CGTGGCGAAC TTATGTTCCG GTGTCGTCTT GATGAGGCCT CACCCACCGT
7441 CCCTTGTTGA CGTTCTCCTC AAACCCGGAC TTGACACAAC ACCCGGCATT CAACCAGGGC
7501 ATGGGGCCGG GAATATGGGC GTGAACGGTT CTATTTGGGA TTTTGAAACT GCACCCACAA
7561 AGGTAGAACT AGAGTTGTCC AAGCAAATAA TCCAAGCATG TGAAGTCAGG CGCGGGGACG
7621 CCCCTAACCT CCAACTCCCC TACAAGCTTT ATCCTGTCAG GGGGGACCCC GAGCGGCGTA
7681 AAGGTCGCCT TGTCAACACT AGGTTTGGAG ATTTACCTTA CAAAACTCCC CAAGACACCA
7741 AGTCCGCAAT TCATGCGGCT TGTTGCCTGC ATCCCAATGG GGTCCTCGTG TCTGATGGTA
7801 AATCCACGCT GGGTACCACT CTTCAACATG GTTTCGAGCT TTATGTCCCC ACTGTACCTT
7861 ATAGTGTCAT GGAATACCTT GATTCACGCC CTGACACCCC TTTTATGTGT ACTAAACATG
7921 GCACTTCCAA GGCTGCTGCA GAGGACCTCC AAAAATATGA CCTATCCACT CAAGGGTTTG
7981 TCTTGCCTGG GGTCCTACGC CTAGTGCGCA GGTTCATCTT TAGCCATGTT GGTAAGGCGC
8041 CACCACTGTT CCTTCCATCA ACCTACCCTG CCAAGAACTC CATGGCAGGG GTCAATGGCC
8101 AGAGGTTCCC AACAAAGGAT GTCCAGAGCA TACCTGAAAT TGATGAAATG TGCGCCCGTG
8161 CCGTCAAGGA AAATTGGCAG ACTGTGACAC CTTGCACCCT CAAAAAACAG TACTGTTCCA
8221 AACCTAAAAC TAGAACCATC CTAGGTACCA ACAACTTCAT AGCCTTGGCT CACAGGTCAG
8281 CACTCAGTGG TGTCACCCAG GCGTTCATGA AGAAGGCCTG GAAGTCCCCA ATTGCCTTGG
8341 GGAAAAACAA GTTTAAGGAA TTGCATTGCA CTGTCGCCGG CAGATGCCTT GAGGCTGACC
8401 TGGCTTCCTG CGATCGCAGC ACCCCCGCCA TTGTGAGGTG GTTTGTTGCC AACCTCCTGT
8461 ATGAACTTGC AGGATGTGAA GAGTACTTGC CTAGCTACGT GCTCAACTGT TGCCATGACC
8521 TTGTGGCAAC GCAGGATGGC GCTTTCACAA AACGCGGTGG CCTGTCGTCC GGGGACCCCG
8581 TCACCAGTGT GTCCAACACC GTCTACTCAC TGATAATTTA CGCCCAGCAC ATGGTGCTTT
8641 CGGCCTTGAA GATGGGTCAT GAAATTGGTC TCAAGTTCCT TGAGGAACAG CTCAAATTTG
8701 AGGACCTTCT TGAAATCCAG CCCATGTTAG TGTATTCTGA TGACCTCGTC TTGTATGCGG
8761 AAAGACCCAC TTTTCCCAAC TACCATTGGT GGGTCGAGCA TCTTGACCTG ATGTTGGGCT
8821 TTAAAACGGA CCCAAAGAAA ACTGTCATAA CTGATAAACC CAGTTTTCTC GGCTGCAGAA
8881 TTGAAGCAGG ACGGCAGTTA GTCCCCAATC GCGACCGTAT TCTGGCTGCT CTTGCATATC
8941 ATATGAAGGC GCAGAACGCC TCAGAGTATT ATGCGTCCGC TGCCGCAATT CTGATGGATT
9001 CGTGTGCTTG CATTGACCAT GACCCCGAGT GGTATGAGGA CCTTATCTGC GGCATCGCCC
9061 GGTGTGCTCG CCAGGACGGT TACCGTTTTC CAGGCCCGGC ATTTTTCATG TCCATGTGGG
9121 AGAAGCTGAA AAGTCATAAC GAAGGGAAGA AATGCCGTCA CTGCGGCATC TGCGACGCCA

```
 9181 AAGCCGACTA TGCGTCCGCC TGTGGACTTG ATTTGTGTTT GTTCCATTCA CACTTTCATC
 9241 AACACTGCCC AGTCACTCTG AGCTGTGGCC ACCATGCCGG TTCAAAGGAA TGTTCGCAGT
 9301 GTCAGTCACC TGTCGGGGCT GGCAAATCCC CCCTTGACGC TGTGCTGAAA CAAATCCCGT
 9361 ACAAACCTCC TCGTACCATT ATCATGAAGG TGGACAACAA AACAACGACC CTTGACCCGG
 9421 GAAGATATCA GTCCCGTCGA GGTCTTGTTG CAGTCAAAAG AGGTATTGCA GGTAATGAGG
 9481 TTGATCTTTC TGATGGAGAC TACCAAGTGG TGCCTCTTTT GCCGACTTGC AAAGACATAA
 9541 ACATGGTGAA GGTGGCTTGC AACGTACTAC TCAGCAAGTT TATAGTAGGG CCGCCAGGTT
 9601 CCGGAAAAAC CACCTGGCTA CTGAACCAAG TCCAGGACGA TGATGTCATT TACACACCTA
 9661 CTCATCAGAC AATGTTTGAC ATAGTCAGTG CTCTTAAAGT TTGCAGGTAT TCCATCCCAG
 9721 GAGCCTCAGG ACTCCCTTTT CCACCACCTG CCAGGTCCGG GCCGTGGGTT AGGCTCATCG
 9781 CCAGCGGACA TGTCCCTGGC CGAGTGTCAT ATCTCGATGA GGCAGGATAT TGCAATCATC
 9841 TAGACATTCT AAGGCTGCTT TCCAAAACAC CCCTTGTGTG TTTGGGTGAC CTTCAGCAAC
 9901 TTCACCCGGT CGGCTTTGAT TCCTATTGTT ATGTGTTCGA TCAGATGCCT CAGAAGCAGC
 9961 TGACCACCAT TTATAGATTT GGCCCTAACA TCTGTGCAGC CATCCAGCCT TGTTACAGGG
10021 AGAAACTTGA ATCCAAGGCC AGGAACACCA GAGTGGTTTT CACCACCCGG CCTGTGGCCT
10081 TTGGTCAGGT CCTGACACCG TACCACAAAG ATCGTACCGG CTCTGCAATA ACTATAGATT
10141 CATCCCAGGG GGCGACCTTC GACATTGTGA CATTGCATCT ACCATCGCCA AAGTCCCTAA
10201 ACAAATCCCG AGCACTTGTA GCCATCACTC GGGCAAGACA TGGGTTGTTC ATTTATGACC
10261 CTCATGACCA ACTCCAGGAG TTTTTCAACT TAACCCCCGA GCGCACTGAT TGTAACCTTG
10321 CGTTCAGCCG TGGGGATGAG CTGGTTGTTT TGAATGTGGA TAATGCGGTC ACAACTGTAG
10381 CGAAGGCCCT AGAGACAGGT TCACCCCGAT TTCGAGTATC GGACCCGAGG TGCAAGTCTC
10441 TCTTAGCCGC TTGTTCGGCC AGTCTAGAAG GGAGCTGCAT GCCACTACCA CAAGTAGCAC
10501 ATAACCTGGG GTTTTACTTT TCCCCGGACA GCCCAGCTTT TGCACCCCTG CCAAAAGAGC
10561 TGGCGCCACA TTGGCCAGTG GTCACCCACC AGAATAATCG AGCGTGGCCT GATCGACTTG
10621 TCGCTAGTAT GCGCCCAATT GATGCCCGCT ACAGCAAGCC AATGGTCGGT GCAGGGTATG
10681 TGGTCGGGCC ATCCATTTTT CTTGGCACTC CTGGTGTGGT GTCATACTAT CTCACATTAT
10741 ACATCGGGGG CGAGCCTCAG GCCCTGCCAG AAACACTCGT TTCAACAGGA CGTATAGCCA
10801 CAGATTGTCG GGAATATCTC GACGCGGCTG AGGAAGAGGC AGCGAGAGAA CTTCCCCACG
10861 CATTTATTGG CGATGTCAAA GGCACTACGG TCGGGGGGTG TCACCACATT ACATCGAAAT
10921 ACCTACCTAG GTCCCTGCCT AAAGACTCTG TTGCTGTGGT TGGGGTGAGT TCGCCCGGTA
10981 GGGCTGCTAA AGCCGTGTGC ACTCTCACCG ATGTGTACCT CCCCGAACTC CGACCATATT
11041 TGCAACCGGA GACGGCATCA AAATGCTGGA AACTTAAACT GGATTTCAGG GATGTTCGAC
11101 TGATGGTCTG GAAAGGCGCC ACAGCCTATT TCCAGTTGGA AGGGCTGACA TGGTCAGCGC
11161 TGCCCGATTA TGCTAGGTTC ATTCAGCTAC CCAAGGATGC CGTTGTGTAC ATCGATCCGT
11221 GTATAGGGCC GGCAACAGCC AATCGCAAGG TTGTGCGAAC CACAGACTGG CGGGCCGACC
11281 TGGCAGTGAC ACCGTATGAT TACGGTGCTC AGGTCATTTT GACAACAGCC TGGTTCGAGG
11341 ACCTTGGGCC GCAGTGGAAG ATTTTGGGGT TGCAGCCTTT CAGACGAACA TTTGGCTTTG
```

11401 AGAACACTGA AGATTGGGCA ATTCTCGCAC GCCGTATGAA TGACGGCAAA GATTACACTG
11461 ACTATAATTG GCATTGTGTA CGAGAACGCC CACACGCAAT TTACGGGCGC GCCCGTGACC
11521 ATACGTATCA TTTTGCCCTT GGCACTGAAC TGCAAGTAGA GCTGGGCAGA CCCCGGCTGC
11581 CTCCTGAGCA AGTGCCGTGA

SEC ID Nº:29 Nucleótido que codifica ORF2 del PRRSV atenuado 94881

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

SEC ID Nº:30 Nucleótido que codifica ORF3 del PRRSV atenuado 94881

12219 AT GGCTTATCAG CGTGCACGCT
12241 TCCATCTTCT CCTCTGTGGC TTCGTCTGTT ACCTTGTTCA CAGTGCTTTG GCTTCGAATT
12301 CCAGCTCTAC GCTATGTTTT TGGTTTCCAT TGGCCCACGG CAACACATCA TTCGAACTAA
12361 CTATCAATTA CACTATATGT AAGCCATGCC CTACCAGTCA AGCTGCCCAA CAAAGACTCG
12421 AGCCTGGCCG TAACGTGTGG TGCAAAATAG GGCACGACAG GTGTGAGGAA CGTGACCATG
12481 ATGAGTTGTC AATGTCCATT CCGTCCGGGT ACGACAACCT CAAACTTGAG GGTTATTATG
12541 CTTGGCTGGC TTTTTTGTCC TTTTCCTACG CGGCCCAATT CCATCCGGAG CTGTTCGGAA
12601 TAGGAAACGT GTCGCGCGTC TTTGTGGATA AGCGACACCA GTTCATTTGC GCCGAGCATG
12661 ATGGACAAAA TTCAACCATA TCTGCCAGAC ACAACATCTC CGCGTCGTAT GCGGTGTATT
12721 ACCATCATCA AATAGACGGG GGCAATTGGT TTCATTTGGA ATGGCTGCGA CCATTCTTTT
12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT
12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCCT
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT

12961 CAGGAGGTCG TCCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAA

SEC ID Nº:31 Nucleótido que codifica ORF4 del PRRSV atenuado 94881

12761 ATGGCTGCGA CCATTCTTTT
12781 CCTCCTGGCT GGTGCTCAAC ATCTCATGGT TTCTGAGGCG TTCGCCTGCA AGCCCTGCTT
12841 CTCGACGCAT CTATCAGATA TTAAGACCAA CACGACCGCG GCTGCCGGTT TCATGGTCCT
12901 TCAGAACATC AATTGTTTCC AATCTCACAG GGCCTCAACA GCGCAAGGTA CCACTCCCCT
12961 CAGGAGGTCG TCCCAATGTC GTGAAGCCGT CGGCATTCCC CAGTACATCA CGATAACGGC
13021 TAATGTGACC GATGAATCGT ATTTGTACAA CGCGGACTTG CTGATGCTTT CCGCGTGCCT
13081 TTTCTACGCC TCGGAAATGA GCGAGAAAGG CTTCAAAGTC ATCTTTGGGA ATATTTCTGG
13141 CGTTGTTTCC GCTTGTGTTA ATTTCACAGA TTATGTGGCC CATGTGACCC AACACACTCA
13201 GCAGCACCAT TTGGTAATTG ATCACATTCG GTTACTACAC TTCTTGACAC CGTCTACGAT
13261 GAGGTGGGCT ACAACCATTG CTTGTTTGTT TGCCATTCTT TTGGCGGTAT GA

SEC ID Nº:32 Nucleótido que codifica ORF5 del PRRSV atenuado 94881

13309 AT GAAATGTTCT
13321 TGCAAGTTGG GGCATTTCTT GACTCCTCAC TCTTGCTTCT GGTGGCTTTT TTTGCTGTGT
13381 ACCGGCTTGT CTTGGTCCTT TGTCGATGGC AACGACAACA GCTCGACATC CCAATACATA
13441 TATAATTTGA CGATATGCGA GCTGAATGGG ACCGAATGGT TGTCCGGTCA TTTTGATTGG
13501 GCAGTCGAAA CCTTTGTGCT TTACCCAGTT GCCACTCATA TCATTTCACT GGGTTTTCTC
13561 ACAACAAGCC ATTTCCTTGA TGCGCTCGGT CTCGGCGCTG TGTCCGCCAC AGGATTCATT
13621 GGCGAGCGGT ATGTACTTAG CAGCATGTAC GGCGTTTGCG CCTTCGCGGC GCTCGTATGT
13681 TTTGTCATCC GTGCTGCTAA AAATTGCATG GCTTGCCGCT ATGCCCGCAC CCGGTTTACC
13741 AACTTCATCG TGGACGACCG GGGAAGAATC CATCGATGGA AGTCTTCAAT AGTGGTGGAG
13801 AAATTGGGCA AAGCTGAAGT CGGTGGTGAC CTTGTCAACA TTAAGCATGT TGTCCTCGAA
13861 GGGGTTAAAG CTCAACCCTT GACGAGGACT TCGGCTGAGC AATGGGAAGC CTAG

SEC ID Nº:33 Nucleótido que codifica ORF6 del PRRSV atenuado 94881

13902 ATGGGAAGC CTAGACGACT
13921 TTTGCAACGA TCCCACCGCC GCACAAAAAC TCGTGCTGGC CTTTAGCATC ACATATACAC
13981 CCATAATGAT ATACGCCCTT AAGGTGTCAC GCGGCCGACT CCTGGGGCTG TTGCACATCT
14041 TGATATTTCT GAATTGTTCC TTTACTTTTG GGTACATGAC ATATGTGCAT TTTCAATCCA
14101 CCAACCGTGT CGCACTCACT CTGGGGGCTG TAGTCGCCCT TTTGTGGGGT GTTTACAGCC

14161 TCACAGAGTC ATGGAAGTTC ATCACTTCCA GATGCAGATT GTGTTGCCTA GGCCGGCGAT
14221 ACATTCTGGC CCCTGCCCAT CACGTAGAAA GTGCTGCAGG CCTCCATTCA ATCCCAGCGT
14281 CTGGTAACCG AGCATACGCT GTGAGAAAGC CCGGACTAAC ATCAGTGAAC GGCACTCTAG
14341 TACCTGGGCT TCGGAGCCTC GTGCTGGGCG GCAAACGAGC TGTTAAACGA GGAGTGGTTA
14401 ACCTCGTCAA GTATGGCCGG TAA

SEC ID Nº:34 Nucleótido que codifica ORF7 del PRRSV atenuado 94881

14413 ATGGCCGG TAAGAACCAG AGCCAGAAGA AAAGAAGAAA TGCAGCTCCG
14461 ATGGGGAAAG GCCAGCCAGT CAATCAACTG TGCCAGTTGC TGGGTACAAT GATAAAGTCC
14521 CAGCGCCAGC AATCTAGGGG AGGACAGGCC AAAAAGAAGA AGCCTGAGAA GCCACATTTT
14581 CCCCTAGCTG CTGAAGATGA CATTCGGCAC CATCTCACCC AGGCCGAACG TTCCCTCTGC
14641 TTGCAATCGA TCCAGACGGC TTTCAATCAA GGCGCAGGAA CTGCGTCGCT TTCATCCAGC
14701 GGGAAGGTCA GTTTCCAGGT TGAGTTCATG CTGCCGGTTG CTCATACAGT GCGCCTGATT
14761 CGCGTGACTT CTACATCCGC CAGTCAGGGT GCAAATTAA

REIVINDICACIONES

1. Un virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) de un tipo europeo, que es de la cepa depositada en la Colección europea de cultivos celulares (ECACC) con el número de acceso ECACC 11012501 o el número de acceso ECACC 11012502.

2. El PRRSV de la reivindicación 1, en el que dicho virus se atenúa pasándolo al menos 36 veces por cultivo celular de forma que cuando el virus modificado se administre a un cerdo u otro mamífero propenso al PRRSV fracase en producir signos clínicos de enfermedad por PRRSV, pero pueda inducir una respuesta inmunitaria que inmunice al mamífero contra formas patógenas de PRRSV.

3. Un procedimiento para la preparación del PRRSV atenuado vivo según la reivindicación 1 que comprende adaptar un PRRSV cultivado en MA 104 de un tipo europeo a células de mamífero no MA 104.

4. Una vacuna para la protección de cerdos contra la infección por PRRSV que comprende el PRRSV atenuado vivo según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. La vacuna según la reivindicación 4 que comprende además uno o más patógenos atenuados o inactivados no PRRSV o material antigénico de los mismos.

6. La vacuna según la reivindicación 5, en la que dichos patógenos no PRRSV se seleccionan del virus de la seudorrabia, virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible, *Escherichia coli*, *Erysipelas rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

7. La vacuna según la reivindicación 4 que comprende además una o más cepas del PRRSV europeo adicionales seleccionadas del grupo que consiste en una cepa del PRRSV depositada con los números de acceso la cepa del virus de Lelystad (agente de Lelystad (CDI-NL-2.91), u otras cepas tales como aquellas depositadas con los números de acceso ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, nº de acceso de CNCM I-1140, nº de acceso de CNCM I-1387, nº de acceso de CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 y VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, o ECACC V93070108 o una cepa US tal como el virus del PRRS norteamericano, pT7P129A; depósito de ATCC VR-

2332, depósito de ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 y ATCC VR 2402.

8. La vacuna según la reivindicación 4 que comprende un vehículo que es adecuado para administración intradérmica o intramuscular.

9. La vacuna según la reivindicación 4 que está en forma liofilizada.

10. La vacuna de la reivindicación 4, en la que dicha vacuna comprende al menos aproximadamente 10^7 partículas víricas.

11. Un procedimiento para la preparación de una vacuna atenuada viva para combatir PRRS que comprende mezclar un PRRSV atenuado vivo según la reivindicación 1 con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que el PRRSV atenuado vivo comprende además una o más cepas del PRRSV europeo adicionales seleccionadas del grupo que consiste en una cepa del PRRSV depositada con los números de acceso ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, nº de acceso de CNCM I-1140, nº de acceso de CNCM I-1387 y nº de acceso de CNCM I-1388.

13. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que el PRRSV atenuado vivo comprende además un adyuvante.

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

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dichos cerdos no presentan lesiones pulmonares después de la vacunación.

16. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dichos cerdos presentan menos lesiones pulmonares después de la vacunación con respecto a la vacunación con la vacuna Porcilis.

17. Un virus del PRRS que tienen una secuencia de nucleótidos que es homóloga al menos 95% a la secuencia expuesta tanto en SEC ID Nº:1 como en SEC ID Nº:10.

18. Un virus del PRRS que comprende al menos un ORF que codifica una proteína que es idéntica al menos 98% a cualquiera de las secuencias expuestas en SEC ID Nº: 2 a 9 o SEC ID Nº:11 a SEC ID Nº:18.

19. Un virus del PRRS que tiene una secuencia de nucleótidos de SEC ID Nº:1 o SEC ID Nº:10 o un fragmento de tanto SEC ID Nº:1 como SEC ID Nº:2 en el que dicho fragmento codifica un ORF seleccionado del grupo que consiste en SEC ID Nº:2, SEC ID Nº:3, SEC ID Nº:4, SEC ID Nº:5, SEC ID Nº:6, SEC ID Nº:7, SEC ID Nº:8, SEC ID Nº:9, SEC ID Nº:11, SEC ID Nº:12, SEC ID Nº:13, SEC ID Nº:14, SEC ID Nº:15, SEC ID Nº:16, SEC ID Nº:17 y SEC ID Nº:18.

20. Una vacuna de subunidad para la vacunación de un animal porcino en la que dicha vacuna comprende uno o más nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en un nucleótido que codifica un ORF seleccionado del grupo que consiste en SEC ID Nº:2, SEC ID Nº:3, SEC ID Nº:4, SEC ID Nº:5, SEC ID Nº:6, SEC ID Nº:7, SEC ID Nº:8, SEC ID Nº:9, SEC ID Nº:11, SEC ID Nº:12, SEC ID Nº:13, SEC ID Nº:14, SEC ID Nº:15, SEC ID Nº:16, SEC ID Nº:17 y SEC ID Nº:18.

21. Una vacuna de subunidad para la vacunación de un animal porcino en la que dicha vacuna comprende uno o más nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en SEC ID Nº:19; SEC ID Nº:20; SEC ID Nº:21; SEC ID Nº:22; SEC ID Nº:23; SEC ID Nº:24; SEC ID Nº:25; SEC ID Nº:26; SEC ID Nº:27; SEC ID Nº:28; SEC ID Nº:29; SEC ID Nº:30; SEC ID Nº:31; SEC ID Nº:32; SEC ID Nº:33 y SEC ID Nº:34.

22. Una composición que comprende una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en una proteína que tiene la secuencia SEC ID Nº:2, SEC ID Nº:3, SEC ID Nº:4, SEC ID Nº:5, SEC ID Nº:6, SEC ID Nº:7, SEC ID Nº:8, SEC ID Nº:9, SEC ID Nº:11, SEC ID Nº:12, SEC ID Nº:13, SEC ID Nº:14, SEC ID Nº:15, SEC ID Nº:16, SEC ID Nº:17 y SEC ID Nº:18.

23. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº:19; SEC ID Nº:20; SEC ID Nº:21; SEC ID Nº:22; SEC ID Nº:23; SEC ID

Nº:24; SEC ID Nº:25; SEC ID Nº:26; SEC ID Nº:27; SEC ID Nº:28; SEC ID Nº:29; SEC ID Nº:30; SEC ID Nº:31; SEC ID Nº:32; SEC ID Nº:33 y SEC ID Nº:34.

24. Un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno o más ORF del PRRSV seleccionados del grupo que consiste en SEC ID Nº:2, SEC ID Nº:3, SEC ID Nº:4, SEC ID Nº:5, SEC ID Nº:6, SEC ID Nº:7, SEC ID Nº:8, SEC ID Nº:9, SEC ID Nº:11, SEC ID Nº:12, SEC ID Nº:13, SEC ID Nº:14, SEC ID Nº:15, SEC ID Nº:16, SEC ID Nº:17 y SEC ID Nº:18 operativamente ligados a un promotor.

25. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 24 en el que dicho ácido nucleico que codifica dichos ORF se selecciona del grupo que consiste en SEC ID Nº:19; SEC ID Nº:20; SEC ID Nº:21; SEC ID Nº:22; SEC ID Nº:23; SEC ID Nº:24; SEC ID Nº:25; SEC ID Nº:26; SEC ID Nº:27; SEC ID Nº:28; SEC ID Nº:29; SEC ID Nº:30; SEC ID Nº:31; SEC ID Nº:32; SEC ID Nº:33 y SEC ID Nº:34.

26. Una vacuna que comprende un vector de expresión recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 24 ó 25.

130822 11 - Secuencias PCT
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> KROLL, Jeremy
VAUGHN, Eric
BURGARD, Kim
ORVEILLON, Francois-Xavier
LAYTON, Sarah
UTLEY, Phil
PESCH, Stefan
OHLINGER, Volker
ROOF, Mike
PIONTKOWSKI, Mike
<120> UNA NUEVA CEPA DEL PRRSV EUROPEA

<130> 10-0137

<140> US 13/396.298
<141> 14-02-2012

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 14843
<212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor Respiratorio Porcino

<400> 1
tttgtgtacc ttggaggcgt gggtacagcc ctgccccacc ctttggtccc tgttctagcc 60

cgacaagtac ccttctctct cggggcgagc gcgccgcctg ctgctccctt gcggcgggaa 120

ggacctcccg agtatttccg gagagcacct gctttacggg atctccgccc tttaaccatg 180

tctgggatgt tctcccggtg catgtgcacc ccggctgccc gggtattttg gaacgccggc 240

caagtctatt gcacacggtg tctcagtgca cggtctcttc tctctccaga acttcaggac 300

acggacctcg gtgcagttgg cttgtttcac aagcctaaag acaagctcca ttggaaagtt 360

cccattggta tcccccaggt ggaatgttct ccatctgggt gttgctggct gtcaaccatt 420

tttcctttag cgcgcatgac ctccggcaat cacaacttcc ttcaacgact cgtgaaggtt 480

gctgatgtat tgtaccgtga cggttgctta acccctagac acctccgtga actccaagtt 540

tacgagcgtg gttgcaattg gtatccgatt acggggcctg tgcctgggat ggctgtgtac 600

gcgaactcca tgcacgtgtc cgaccaaccg ttccctggtg ccactcatgt gttaacaaat 660

tccccctttgc ctcaacgggc ttgtcggcag ccgttctgtc cgttcgaaga ggcccattct 720

agcatataca ggtgggaaaa atttgtaatt tttatggatt cctcctccga cggtcgatct 780

cgcatgatgt ggactccgga atccgatgac tccacggctt tggaagttct gccgcccgag 840

ctagaacacc aggtcaaggt ccttgttcgg agctttcccg cccatcacct tgtcgacctt 900

gccgattggg agctcactga gtcccctgat aacggttttt ccttcagcac gtcacatcct 960

tgcggctacc ttgttcggga cccggctgta tccgaaggca agtgttggct ttcctgcttt 1020

ttgagccagt cagccgaagt gctcagtcgc gaggcgcatc tggctaccgc ctatggttac 1080

caaaccaagt ggggtgtgcc tggcaagtac atccagcgca gacttcaagt tcacggtctc 1140

cgtgctgtgg tcgaccctga tggtcccatt cacgttgaag cattgtcttg cccccagtct 1200

tggatcaggc acttgaccct gaatgatgat gtcaccccgg gattcgttcg cctaatgtct 1260

cttcgcattg tgccgaacac agagcctacc acacaccgga tctttcgttt tggagtgcac 1320

aagtggtatg gtgccgccgg caaacgggcc cgtggcaagc gtgccgccaa aagtgagaaa 1380

gactcggctt ccaccctcaa ggttgcccga ccgacttcca ccagtggaat cgtcacctac 1440

tccccacctg cggacgggtc ttgtggttgg catgcccttg ccgccatact gaaccggatg 1500

attaataatg acttcacgtc ccctctgcct cggtacaaca ggccggagga cgattgggct 1560

tctgatggtg accttgctca ggccattcaa tgtttgcaac tacctgccgc catagctcgg 1620

aaccgcgcct gccctaacgc caaatacctc ataaaactca acggagttca ttgggaggta 1680

gaggtgaggc ctggaatggc tcctcgctcc ctctctcgtg agtgcgttgt tggcgtctgc 1740

tctgaaggct gtgtcgcgtc gccttacccg gaggacgggt tgcctaaacg tgcacttgag 1800

gccctggcgt ctgcttatag actgccttca gactgtgttt gtgatggtat tattgacttc 1860

cttgccaatc cacctcccca ggagttctgg actcttgaca aaatgttgac ttccccgtca 1920

ccggagcagt ccggcttctc tagtctgtat aaattgttgt tagagatctt gccgcagaaa 1980

tgcggatcca cagaagggga attcatctat actgttgaga ggatgttgaa ggattgtccg 2040

agctccaaac aggccatggc cctccttgca aaaattaagg tcccatcctc aaaggcccca 2100

tccgtgactc tgaacgagtg cttccccacg gatgttccag tcaactctga gttaatatct 2160

tgggaagagc ccaaagaccc tggcgctgct gttgtcctat gtccatcgga tgcaaaagaa 2220

tctaaggaaa cagcccctga agaagctcaa gcgagaaacc gtaaggtcct tcaccctgtg 2280

gtccttaccg aggaacttag cgagcaacag gtgcaggtgg ttgagggtga tcaggatatg 2340

ccactggatt tgacttggcc aaccttaacc gctacggcga cccctgttag agggccggta 2400

ccggacaatt tgagctctgg cattggtgcc cagcccgcta ccgttcaaga actcattctg 2460

gcgaggcctg caccccgtct tgttgagcgc tgtggcacgg agtcgaacgg cagcagttca 2520

tttctggatt tgcctgacgt gcagacctcg gaccagcctt tagacctgtc cctggccgcg 2580

tggcctgtaa gggctaccgc gtctgacccc ggttggatcc acggtaggcg tgagcctgtc 2640

tttgtgaagc ctcgaggtgt tttctctgat ggcgagtcgg cccttcagtt cggagagctt 2700

tccgaagcca gttctgtcgt cgatgaccgg acaaaagaag ctccggtggt tgacgccccc 2760

atcgatttga caacttcgaa cgagacgctc tctgggtctg acccctttga attcgccaaa 2820

ttcaggcgcc cgcgtttctc cgcgcaagct ttaatcgacc gaggtggtcc gcttgccgat 2880

gttcatgcaa agataaagag tcgggtatat gaacaatgcc ttcaagcttg tgaacctggt 2940

agtcgtgcga ccccagccac caagaagtgg ctcgacaaaa tgtgggacag ggtggacatg 3000

aaaacttggc gctgcacctc gcagttccaa gctggtcaca ttcttgagtc cctcaaattc 3060

ctccctgaca tgattcaaga cacaccgcct cctgttccca ggaagaaccg agctggtgac 3120

agtgccggcc tgaagcaact ggtggcgcag tgggatagga aatcgagtgt gacacccccc 3180

acaaaaccgg ttggaccggt gcttgaccag gccgtccctc tgcctatgga catccagcaa 3240

ggagatgcca tctccgctga caagccaccc cattcgcaaa acccttctag tcaagtagat 3300

gtgggtggag gttggaaaag ttttatgctc tccggcaccc gtttcgcggg gtccgttagt 3360

cagcgcctta cgacatgggt ttttgaggtt ctctcccatc tcccagcttt tatgctcaca 3420

cttttctcgc cacggggctc tatggctcca ggtgattggc tgtttgcagg tgctgttcta 3480

cttgctctcc tgctctgccg ttcttaccca atactcggat gccttccctt attgggtgtc 3540

ttttctggtt ctgtgcggtg tgttcgtttg ggtgtttttg gttcttggat ggcttttgct 3600

gtatttttat tctcgactcc acccgaccca gtcggttctt cttgtgacca cgattcgccg 3660

gagtgtcatg ctgagctttt ggctcttgag cagcgccaac tttgggaacc tgtgcgcagc 3720

cttgtggtcg ggccatcggg cctcttatgc gtcattcttg gcaagttact cggtgggtca 3780

cgttgtctct ggtttgttct cctacgtata tgcatgctcg cagatttggc aatttctctt 3840

atttatgtgg tgtcccaagg gcgttgtcac aagtgttggg gaaagtgtat aaggacggct 3900

cctgcagaag tggcccttaa tgtgtttcct ttttcgcgcg ccacccgctc atctcttgtg 3960

tccttgtgtg atcggttcca agcgccaaaa ggagttgacc ccgtgcactt ggcgacaggc 4020

tggcgcgggt gctggtgtgg tgagagccct attcatcaat cacaccaaaa accgatagct 4080

tatgccaact tggatgaaaa gaagatatcc gcccagacgg tgattgctgt cccgtatgat 4140

cctagtcagg ccattaaatg cctgaaagtt ttgcaggcag gaggggctat tgtggaccag 4200

cctacgcccg aggtcgtccg tgtgtctgag attcccttct cggccccatt ttttccgaag 4260

gtcccagtca acccagactg cagggttgtg gtagattcgg acacttttgt ggctgcggtc 4320

cgctgcggtt attcgacagc acaactggtc cttggtcggg gcaactttgc caagctaaat 4380

cagacccccc tcaggaactc tgtccccacc aaaacaactg gtggggcctc atacaccctt 4440

gccgtggccc aggtatctgt gtggactctt gttcatttca tcctcggcct ttggttaacg 4500

tcacctcaag tgtgtggtcg agggacctct gacccgtggt gttcgaaccc tttttcgtat 4560

cctacttatg gccccggagt tgtgtgttcc tctcgactct gcgtgtctgc cgacggagtt 4620

accctgccat tgttctcagc cgttgcccat ctttccggta gagaggtggg gatttttatt 4680

ttggtgcttg cctccttggg cgctttagcc caccgcttgg ctcttaaggc agacatgtca 4740

atggtctttt tggcgttttg tgcttacgcc tggcccatga gctcctggtt aatttgcttc 4800

tttcctatgc tcttgaggtg ggtaaccctt catcctctca ctatgctttg ggtgcactca 4860

tttttggtgt tttgcctacc agctgccggc gttctctcgc tgggaataac cggtcttctt 4920

tgggcagttg gccgtttcac ccaggttgcc ggaattatca caccttatga catccaccag 4980

tatacctccg gaccacgtgg tgcagctgct gtagcaacgg ctccagaagg tacttacatg 5040

gcggccgttc ggagagccgc tttgactgga cggactttga tcttcacacc atctgcagtc 5100

ggatcccttc ttgaaggtgc tttcagaact caaaagccct gccttaacac cgtgaatgtc 5160

gtaggctctt cccttggttc tggaggagtt ttcaccattg atggcagaag agtcatcgtc 5220

actgccaccc atgtgttgaa tggtaacaca gccagggtca ctggtgattc ctacaaccgc 5280

atgcacacgt tcaatactaa tggtgattat gcctggtccc atgctgatga ctggcaaggc 5340

gttgccccta tggttaagat cgctaagggg tatcgcggtc gtgcctactg gcaaacgtca 5400

accggagtcg aacctggcat catgggggaa ggattcgcct tctgtttcac taactgtggc 5460

gactcagggt cacctgtcat ttcagaagct ggtgacctta ttggagtcca taccggttca 5520

aacaaactcg gttctggtct tgtgacaacc cctgaagggg agacctgctc catcaaggaa 5580

actaggctct ctgacctttc tagacatttt gcaggtccaa gcgtccctct tggggacatt 5640

aagttgagcc cagccatcat ccctgatgtg acaactattc cgagtgactt ggcatcgctc 5700

cttgcttctg tccccgtgat ggaaggtggc ctctcaactg tccagctttt gtgcgtcttt 5760

ttccttctct ggcgcatgat gggccatgcc tggacaccca ttgttgccgt aggcttcttt 5820

ttgctgaatg aaattctccc agcagtcttg gtccgagctg tgttctcttt tgcactcttt 5880

gtacttgcat gggccacccc ctggtcggca caagtgttga tgattagact cctcacggcg 5940

gctctcaacc gcaacaggtt gtccctggcg ttctacgcat tcggaggtgt cgttggcctg 6000

gccacagaaa tcgggacttt tgctggtgga tggcctgaac tgtcccaagc cctctcgaca 6060

tactgcttcc tgcccaggtt ccttgctgtg actagttatg tccccaccat catcatcggt 6120

gggctccatg ccctcggcgt aattttgtgg ttattcaaat accgatgcct ccacaacatg 6180

ctggttggtg atgggagttt ctcaagcgct ttcttcctac ggtattttgc tgagggtaat 6240

cttaggaaag gcgtgtcgca gtcctgtggc atgaataacg aatccctgac agctgctttg 6300

gcttgcaagt tgtcgcaagc tgaccttgat tttttgtcca gtttaacgaa cttcaagtgc 6360

tttgtgtccg cttcaaacat gaaaaatgca gctggccaat acatcgaggc ggcgtatgct 6420

agagctctgc gtcaggagct ggcctccttg gttcaggttg acaagatgaa aggagtattg 6480

gccaagctcg aggctttcgc tgagacggcc actccgtcac ttgacacagg ggacgtgatt 6540

gttctgcttg ggcaacaccc ccatggatcc atcctcgaca ttaatgtggg gggtgaaagg 6600

aaaactgtgt ctgtgcaaga aacacgatgc ctgggtggtt ccaaattcag tgtctgcact 6660

gtcgtgtcca acacgcccgt ggataccttg accggtatcc cacttcagac gccaacccca 6720

cttttttgaaa atggcccgcg ccatcgcagc gaggacgacg acctcaaagt tgagagaatg 6780

aaaaaacact gtgtatccct cggcttccac aaaatcaatg gtaaagttta ctgcaaaatt 6840

tgggacaagt ctaacggcga cacctttttac acggatgatt cccgatacac tcaagaccat 6900

gcttttcagg acaggtcaac cgactataga gacagggatt atgaaggtgt acagaccgcc 6960

ccccaacagg gattcgatcc aaagtccgaa gcccctgttg gcactgttgt aatcggtggc 7020

attacgtata acaggcatct ggtcaaaggt aaggaggtcc tagttcccaa acctgacaac 7080

tgccttgaag ctgccagact gtcccttgag caagctcttg ctgggatggg ccaaacttgt 7140

gaccttacag ctaccgaagt ggagaaacta aagcgcatca ttagtcaact ccaaggtctg 7200

accactgaac aggctttaaa ctgctagccg ccagcggctt gacccgctgt ggccgcggcg 7260

gcctagttgt aactgaaacg gcggtaaaaa tcgtaaaata ccacagcaga actttcacct 7320

taggctcttt agacctaaaa gtcacctccg aggtggaggt gaagaaatca actgagcagg 7380

ggcacgctgt cgtggcgaac ttatgttccg gtgtcgtctt gatgaggcct cacccaccgt 7440

cccttgttga cgttctcctc aaacccggac ttgacacaac acccggcatt caaccagggc 7500

atggggccgg gaatatgggc gtgaacggtt ctatttggga ttttgaaact gcacccacaa 7560

aggtagaact agagttgtcc aagcaaataa tccaagcatg tgaagtcagg cgcggggacg 7620

cccctaacct ccaactcccc tacaagcttt atcctgtcag gggggacccc gagcggcgta 7680

aaggtcgcct tgtcaacact aggtttggag atttacctta caaaactccc caagacacca 7740

agtccgcaat tcatgcggct tgttgcctgc atcccaatgg ggtcctcgtg tctgatggca 7800

aatccacgct gggtaccact cttcaacatg gtttcgagct ttatgtcccc actgtacctt 7860

atagtgtcat ggaatacctt gattcacgcc ctgacacccc ttttatgtgt actaaacatg 7920

gcacttccaa ggctgctgca gaggacctcc aaaaatatga cctatccact caagggtttg 7980

tcttgcctgg ggtcctacgc ctagtgcgca ggttcatctt tagccatgtt ggtaaggcgc 8040

caccactgtt ccttccatca acctaccctg ccaagaactc catggcaggg gtcaatggcc 8100

agaggttccc aacaaaggat gtccagagca tacctgaaat tgatgaaatg tgcgcccgtg 8160

ccgtcaagga aaattggcag actgtgacac cttgcaccct caaaaaacag tactgttcca 8220

aacctaaaac tagaaccatc ctaggtacca acaacttcat agccttggct cacaggtcag 8280

cactcagtgg tgtcacccag gcgttcatga agaaggcctg gaagtcccca attgccttgg 8340

ggaaaaacaa gtttaaggaa ttgcattgca ctgtcgccgg cagatgcctt gaggctgacc 8400

tggcttcctg cgatcgcagc acccccgcca ttgtgaggtg gtttgttgcc aacctcctgt 8460

atgaacttgc aggatgtgaa gagtacttgc ctagctacgt gctcaactgt tgccatgacc 8520

ttgtggcaac gcaggatggc gctttcacaa aacgcggtgg cctgtcgtcc ggggaccccg 8580

tcaccagtgt gtccaacacc gtctactcac tgataattta cgcccagcac atggtgcttt 8640

cggccttgaa gatgggtcat gaaattggtc tcaagttcct tgaggaacag ctcaaatttg 8700

aggaccttct tgaaatccag cccatgttag tgtattctga tgacctcgtc ttgtatgcgg 8760

aaagacccac ttttcccaac taccattggt gggtcgagca tcttgacctg atgttgggct 8820

ttaaaacgga cccaaagaaa actgtcataa ctgataaacc cagttttctc ggctgcagaa 8880

ttgaagcagg acggcagtta gtccccaatc gcgaccgtat tctggctgct cttgcatatc 8940

atatgaaggc gcagaacgcc tcagagtatt atgcgtccgc tgccgcaatt ctgatggatt 9000

cgtgtgcttg cattgaccat gaccccgagt ggtatgagga tcttatctgc ggcatcgccc 9060

ggtgtgctcg ccaggacggt taccgttttc caggcccggc atttttcatg tccatgtggg 9120

agaagctgaa aagtcataat gaagggaaga aatgccgtca ctgcggcatc tgcgacgcca 9180

aagccgacta tgcgtccgcc tgtggacttg atttgtgttt gttccattca cactttcatc 9240

aacactgccc agtcactctg agctgtggcc accatgccgg ttcaaaggaa tgttcgcagt 9300

gtcagtcacc tgtcggggct ggcaaatccc cccttgacgc tgtgctgaaa caaatcccgt 9360

acaaacctcc tcgtaccatt atcatgaagg tggacaacaa aacaacgacc cttgacccgg 9420

gaagatatca gtcccgtcga ggtcttgttg cagtcaaaag aggtattgca ggtaatgagg 9480

ttgatctttc tgatggagac taccaagtgg tgcctctttt gccgacttgc aaagacataa 9540

acatggtgaa ggtggcttgc aacgtactac tcagcaagtt tatagtaggg ccgccaggtt 9600

ccggaaaaac cacctggcta ctgaaccaag tccaggacga tgatgtcatt tacacaccta 9660

ctcatcagac aatgtttgac atagtcagtg ctcttaaagt ttgcaggtat tccatcccag 9720

gagcctcagg actccctttt ccaccacctg ccaggtccgg gccgtgggtt aggctcatcg 9780

ccagcggaca tgtccctggc cgagtgtcat atctcgatga ggcaggatat tgcaatcatc 9840

tagacattct aaggctgctt tccaaaacac cccttgtgtg tttgggtgac cttcagcaac 9900

ttcacccggt cggctttgat tcctattgtt atgtgttcga tcagatgcct cagaagcagc 9960

tgaccaccat ttatagattt ggccctaaca tctgtgcagc catccagcct tgttacaggg 10020

agaaacttga atccaaggcc aggaacacca gagtggtttt caccacccgg cctgtggcct 10080

ttggtcaggt cctgacaccg taccacaaag atcgtaccgg ctctgcaata actatagatt 10140

catcccaggg ggcgaccttc gacattgtga cattgcatct accatcgcca aagtccctaa 10200

acaaatcccg agcacttgta gccatcactc gggcaagaca tgggttgttc atttatgacc 10260

ctcatgacca actccaggag tttttcaact taacccccga gcgcactgat tgtaaccttg 10320

cgttcagccg tggggatgag ctggttgttt tgaatgtgga taatgcggtc acaactgtag 10380

cgaaggccct agagacaggt tcaccccgat ttcgagtatc ggacccgagg tgcaagtctc 10440

tcttagccgc ttgttcggcc agtctagaag ggagctgcat gccactacca caagtagcac 10500

ataacctggg gttttacttt tccccggaca gcccagcttt tgcacccctg ccaaaagagc 10560

tggcgccaca ttggccagtg gtcacccacc agaataatcg agcgtggcct gatcgacttg 10620

tcgctagtat gcgcccaatt gatgcccgct acagcaagcc aatggtcggt gcagggtatg 10680

tggtcgggcc atccattttt cttggcactc ctggtgtggt gtcatactat ctcacattat 10740

acatcggggg cgagcctcag gccctgccag aaacactcgt ttcaacagga cgtatagcca 10800

cagattgtcg ggaatatctc gacgcggctg aggaagaggc agcgagagaa cttccccacg 10860

catttattgg cgatgtcaaa ggcactacga tcgggggggtg tcaccacatt acatcgaaat 10920

acctacctag gtccctgcct aaagactctg ttgctgtggt tggggtgagt tcgcccggta 10980

gggctgctaa agccgtgtgc actctcaccg atgtgtacct ccccgaactc cgaccatatt 11040

tgcaaccgga gacggcatca aaatgctgga aacttaaact ggatttcagg gatgttcgac 11100

tgatggtctg gaaaggcgcc acagcctatt tccagttgga agggctgaca tggtcagcgc 11160

tgcccgatta tgctaggttc attcagctac ccaaggatgc cgttgtgtac atcgatccgt 11220

gtatagggcc ggcaacagcc aatcgcaagg ttgtgcgaac cacagactgg cgggccgacc 11280

tggcagtgac accgtatgat tacggtgctc aggtcatttt gacaacagcc tggttcgagg 11340

accttgggcc gcagtggaag attttggggt tgcagccttt cagacgaaca tttggctttg 11400

agaacactga agattgggca attctcgcac gccgtatgaa tgacggcaaa gattacactg 11460

actataattg gcattgtgta cgagaacgcc cacacgcaat ttacgggcgc gcccgtgacc 11520

atacgtatca ttttgccctt ggcactgaac tgcaagtaga gctgggcaga ccccggctgc 11580

ctcctgagca agtgccgtga acgcggagtg atgcaatggg tttactgtgg agtaaaatca 11640

gtcagttgtt cgtggatgcc ttcactgagt tccttgttag tgtggttgac attgtcatct 11700

ttctcgccat attgtttggg ttcactgttg caggctggtt attggtcttc cttctcagag 11760

tggtttgctc cgcgtttctc cgttcgcgct ctgccattca ctcttccgaa ctatcgaagg 11820

tcctatgagg gcttgctacc caactgcaga ccggatgtcc cacaattcgc agttaagcac 11880

ccgttgggta tactttggca tatgcgagtc tcccacctaa ttgacgaaat ggtctctcgc 11940

cgcatttacc ggaccatgga acattcgggt caagcggcct ggaagcaggt tgttagtgaa 12000

gccactctca caaaactgtc aaggcttgac gtagtcactc atttccaaca cctggccgca 12060

gtggaggctg attcttgccg cttccttagc tcacgactcg cgatgctgaa aaaccttgcc 12120

gttggcaatg tgagcctgga gtacaacact actttggacc gcgttgagct catctttccc 12180

acaccaggta cgaggcccaa gttgaccgat tttaggcaat ggcttatcag cgtgcacgct 12240

tccatcttct cctctgtggc ttcgtctgtt accttgttca cagtgctttg gcttcgaatt 12300

ccagctctac gctatgtttt tggtttccat tggcccacgg caacacatca ttcgaactaa 12360

ctatcaatta cactatatgt aagccatgcc ctaccagtca agctgcccaa caaagactcg 12420

agcctggccg taacgtgtgg tgcaaaatag ggcacgacag gtgtgaggaa cgtgaccatg 12480

atgagttgtc aatgtccatt ccgtccgggt acgacaacct caaacttgag ggttattatg 12540

cttggctggc ttttttgtcc ttttcctacg cggcccaatt ccatccggag ctgttcggaa 12600

taggaaacgt gtcgcgcgtc tttgtggata agcgacacca gttcatttgc gccgagcatg 12660

atggacaaaa ttcaaccata tctgccagac acaacatctc cgcgtcgtat gcggtgtatt 12720

accatcatca aatagacggg ggcaattggt ttcatttgga atggctgcga ccattctttt 12780

cctcctggct ggtgctcaac atctcatggt ttctgaggcg ttcgcctgca agccctgctt 12840

ctcgacgcat ctatcagata ttaagaccaa cacgaccgcg gctgccggtt tcatggtcct 12900

tcagaacatc aattgtttcc aatctcacag ggcctcaaca gcgcaaggta ccactcccct 12960

caggaggtcg tcccaatgtc gtgaagccgt cggcattccc cagtacatca cgataacggc 13020

taatgtgacc gatgaatcgt atttgtacaa cgcggacttg ctgatgcttt ccgcgtgcct 13080

tttctacgcc tcggaaatga gcgagaaagg cttcaaagtc atctttggga atatttctgg 13140

cgttgtttcc gcttgtgtta atttcacaga ttatgtggcc catgtgaccc aacacactca 13200

gcagcaccat ttggtaattg atcacattcg gttactacac ttcttgacac cgtctacgat 13260

gaggtgggct acaaccattg cttgtttgct tgccattctt ttggcggtat gaaatgttct 13320

tgcaagttgg ggcatttctt gactcctcac tcttgcttct ggtggctttt tttgctgtgt 13380

accggcttgt cttggtcctt tgtcgatggc aacgacgaca gctcgacatc ccaatacata 13440

tataatttga cgatatgcga gctgaatggg accgaatggt tgtccggtca ttttgattgg 13500

gcagtcgaaa cctttgtgct ttacccagtt gccactcata tcatttcact gggttttctc 13560

acaacaagcc atttccttga tgcgctcggt ctcggcgctg tgtccgccac aggattcatt 13620

ggcgagcggt atgtacttag cagcatgtac ggcgtttgcg ccttcgcggc gttcgtatgt 13680

tttgtcatcc gtgctgctaa aaattgcatg gcttgccgct atgcccgcac ccggtttacc 13740

aacttcatcg tggacgaccg gggaagaatc catcgatgga agtcttcaat agtggtggag 13800

aaattgggca aagctgaagt cggtggtgac cttgtcaaca ttaagcatgt tgtcctcgaa 13860

ggggttaaag ctcaaccttt gacgaggact tcggctgagc aatgggaagc ctagacgact 13920

tttgcaacga tcccaccgcc gcacaaaaac tcgtgctggc ctttagcatc acatatacac 13980

ccataatgat atacgccctt aaggtgtcac gcggccgact cctggggctg ttgcacatct 14040

tgatatttct gaattgttcc tttacttttg ggtacatgac atatgtgcat tttcaatcca 14100

ccaaccgtgt cgcattcact ctgggggctg tagtcgccct tttgtggggt gtttacagcc 14160

tcacagagtc atggaagttc atcacttcca gatgcagatt gtgttgccta ggccggcgat 14220

acattctggc ccctgcccat cacgtagaaa gtgctgcagg cctccattca atcccagcgt 14280

ctggtaaccg agcatacgct gtgagaaagc ccggactaac atcagtgaac ggcactctag 14340

tacctgggct tcggagcctc gtgctgggcg gcaaacgagc tgttaaacga ggagtggtta 14400

acctcgtcaa gtatggccgg taagaaccag agccagaaga aaagaagaaa tgcagctccg 14460

atggggaaag gccagccagt caatcaactg tgccagttgc tgggtacaat gataaagtcc 14520

cagcgccagc aatctagggg aggacaggcc aaaaagaaga agcctgagaa gccacatttt 14580

cccctagctg ctgaagatga cattcggcac catctcaccc aggccgaacg ttccctctgc 14640

ttgcaatcga tccagacggc tttcaatcaa ggcgcaggaa ctgcgtcgct ttcatccagc 14700

gggaaggtca gtttccaggt tgagttcatg ctgccggttg ctcatacagt gcgcctgatt 14760

cgcgtgactt ctacatccgc cagtcagggt gcaaattaat ttgacagtca ggtgaatggc 14820

cgcgattgac gtgtggcctc taa 14843

<210> 2
<211> 2349
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ORF 1a DE 94881 MSV

<400> 2

Met Ser Gly Met Phe Ser Arg Cys Met Cys Thr Pro Ala Ala Arg Val 1 5
10 15

Phe Trp Asn Ala Gly Gln Val Tyr Cys Thr Arg Cys Leu Ser Ala Arg 20
25 30

Ser Leu Leu Ser Pro Glu Leu Gln Asp Thr Asp Leu Gly Ala Val Gly 35
40 45

Leu Phe His Lys Pro Lys Asp Lys Leu His Trp Lys Val Pro Ile Gly 50
55 60

Ile Pro Gln Val Glu Cys Ser Pro Ser Gly Cys Cys Trp Leu Ser Thr 65
70 75 80

Ile Phe Pro Leu Ala Arg Met Thr Ser Gly Asn His Asn Phe Leu Gln 85
90 95

Arg Leu Val Lys Val Ala Asp Val Leu Tyr Arg Asp Gly Cys Leu Thr 100

105 110

Pro Arg His Leu Arg Glu Leu Gln Val Tyr Glu Arg Gly Cys Asn Trp 115
120 125

Tyr Pro Ile Thr Gly Pro Val Pro Gly Met Ala Val Tyr Ala Asn Ser 130
135 140

Met His Val Ser Asp Gln Pro Phe Pro Gly Ala Thr His Val Leu Thr 145
150 155 160

Asn Ser Pro Leu Pro Gln Arg Ala Cys Arg Gln Pro Phe Cys Pro Phe 165
170 175

Glu Glu Ala His Ser Ser Ile Tyr Arg Trp Glu Lys Phe Val Ile Phe 180
185 190

Met Asp Ser Ser Ser Asp Gly Arg Ser Arg Met Met Trp Thr Pro Glu 195
200 205

Ser Asp Asp Ser Thr Ala Leu Glu Val Leu Pro Pro Glu Leu Glu His 210
215 220

Gln Val Lys Val Leu Val Arg Ser Phe Pro Ala His His Leu Val Asp 225
230 235 240

Leu Ala Asp Trp Glu Leu Thr Glu Ser Pro Asp Asn Gly Phe Ser Phe 245
250 255

Ser Thr Ser His Pro Cys Gly Tyr Leu Val Arg Asp Pro Ala Val Ser 260
265 270

Glu Gly Lys Cys Trp Leu Ser Cys Phe Leu Ser Gln Ser Ala Glu Val 275
280 285

Leu Ser Arg Glu Ala His Leu Ala Thr Ala Tyr Gly Tyr Gln Thr Lys 290
295 300

Trp Gly Val Pro Gly Lys Tyr Ile Gln Arg Arg Leu Gln Val His Gly 305
310 315 320

Leu Arg Ala Val Val Asp Pro Asp Gly Pro Ile His Val Glu Ala Leu
325
330 335

Ser Cys Pro Gln Ser Trp Ile Arg His Leu Thr Leu Asn Asp Asp Val
340
345 350

Thr Pro Gly Phe Val Arg Leu Met Ser Leu Arg Ile Val Pro Asn Thr
355
360 365

Glu Pro Thr Thr His Arg Ile Phe Arg Phe Gly Val His Lys Trp Tyr
370
375 380

Gly Ala Ala Gly Lys Arg Ala Arg Gly Lys Arg Ala Ala Lys Ser Glu 385
390 395 400

Lys Asp Ser Ala Ser Thr Leu Lys Val Ala Arg Pro Thr Ser Thr Ser
405
410 415

Gly Ile Val Thr Tyr Ser Pro Pro Ala Asp Gly Ser Cys Gly Trp His
420
425 430

Ala Leu Ala Ala Ile Leu Asn Arg Met Ile Asn Asn Asp Phe Thr Ser
435
440 445

Pro Leu Pro Arg Tyr Asn Arg Pro Glu Asp Asp Trp Ala Ser Asp Gly
450
455 460

Asp Leu Ala Gln Ala Ile Gln Cys Leu Gln Leu Pro Ala Ala Ile Ala 465
470 475 480

Arg Asn Arg Ala Cys Pro Asn Ala Lys Tyr Leu Ile Lys Leu Asn Gly
485
490 495

Val His Trp Glu Val Glu Val Arg Pro Gly Met Ala Pro Arg Ser Leu
500
505 510

Ser Arg Glu Cys Val Val Gly Val Cys Ser Glu Gly Cys Val Ala Ser
520 525 515

Pro Tyr Pro Glu Asp Gly Leu Pro Lys Arg Ala Leu Glu Ala Leu Ala
535 540 530

Ser Ala Tyr Arg Leu Pro Ser Asp Cys Val Cys Asp Gly Ile Ile Asp
550 555 560 545

Phe Leu Ala Asn Pro Pro Pro Gln Glu Phe Trp Thr Leu Asp Lys Met
570 575 565

Leu Thr Ser Pro Ser Pro Glu Gln Ser Gly Phe Ser Ser Leu Tyr Lys
585 590 580

Leu Leu Leu Glu Ile Leu Pro Gln Lys Cys Gly Ser Thr Glu Gly Glu
600 605 595

Phe Ile Tyr Thr Val Glu Arg Met Leu Lys Asp Cys Pro Ser Ser Lys
615 620 610

Gln Ala Met Ala Leu Leu Ala Lys Ile Lys Val Pro Ser Ser Lys Ala
630 635 640 625

Pro Ser Val Thr Leu Asn Glu Cys Phe Pro Thr Asp Val Pro Val Asn
650 655 645

Ser Glu Leu Ile Ser Trp Glu Glu Pro Lys Asp Pro Gly Ala Ala Val
665 670 660

Val Leu Cys Pro Ser Asp Ala Lys Glu Ser Lys Glu Thr Ala Pro Glu
680 685 675

Glu Ala Gln Ala Arg Asn Arg Lys Val Leu His Pro Val Val Leu Thr
695 700 690

Glu Glu Leu Ser Glu Gln Gln Val Gln Val Val Glu Gly Asp Gln Asp 705
710 715 720

Met Pro Leu Asp Leu Thr Trp Pro Thr Leu Thr Ala Thr Ala Thr Pro
725 730 735

Val Arg Gly Pro Val Pro Asp Asn Leu Ser Ser Gly Ile Gly Ala Gln
740 745 750

Pro Ala Thr Val Gln Glu Leu Ile Leu Ala Arg Pro Ala Pro Arg Leu
755 760 765

Val Glu Arg Cys Gly Thr Glu Ser Asn Gly Ser Ser Ser Phe Leu Asp
770 775 780

Leu Pro Asp Val Gln Thr Ser Asp Gln Pro Leu Asp Leu Ser Leu Ala 785
790 795 800

Ala Trp Pro Val Arg Ala Thr Ala Ser Asp Pro Gly Trp Ile His Gly
805 810 815

Arg Arg Glu Pro Val Phe Val Lys Pro Arg Gly Val Phe Ser Asp Gly
820 825 830

Glu Ser Ala Leu Gln Phe Gly Glu Leu Ser Glu Ala Ser Ser Val Val
835 840 845

Asp Asp Arg Thr Lys Glu Ala Pro Val Val Asp Ala Pro Ile Asp Leu
850 855 860

Thr Thr Ser Asn Glu Thr Leu Ser Gly Ser Asp Pro Phe Glu Phe Ala 865
870 875 880

Lys Phe Arg Arg Pro Arg Phe Ser Ala Gln Ala Leu Ile Asp Arg Gly
885 890 895

Gly Pro Leu Ala Asp Val His Ala Lys Ile Lys Ser Arg Val Tyr Glu
900 905 910

Gln Cys Leu Gln Ala Cys Glu Pro Gly Ser Arg Ala Thr Pro Ala Thr 915
920 925

Lys Lys Trp Leu Asp Lys Met Trp Asp Arg Val Asp Met Lys Thr Trp 930
935 940

Arg Cys Thr Ser Gln Phe Gln Ala Gly His Ile Leu Glu Ser Leu Lys 945
950 955 960

Phe Leu Pro Asp Met Ile Gln Asp Thr Pro Pro Pro Val Pro Arg Lys 965
970 975

Asn Arg Ala Gly Asp Ser Ala Gly Leu Lys Gln Leu Val Ala Gln Trp 980
985 990

Asp Arg Lys Ser Ser Val Thr Pro Pro Thr Lys Pro Val Gly Pro Val 995
1000 1005

Leu Asp Gln Ala Val Pro Leu Pro Met Asp Ile Gln Gln Gly Asp 1010
1015 1020

Ala Ile Ser Ala Asp Lys Pro Pro His Ser Gln Asn Pro Ser Ser 1025
1030 1035

Gln Val Asp Val Gly Gly Gly Trp Lys Ser Phe Met Leu Ser Gly 1040
1045 1050

Thr Arg Phe Ala Gly Ser Val Ser Gln Arg Leu Thr Thr Trp Val 1055
1060 1065

Phe Glu Val Leu Ser His Leu Pro Ala Phe Met Leu Thr Leu Phe 1070
1075 1080

Ser Pro Arg Gly Ser Met Ala Pro Gly Asp Trp Leu Phe Ala Gly 1085
1090 1095

Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Leu Cys Arg Ser Tyr Pro Ile Leu 1100

1105 1110

Gly Cys Leu Pro Leu Leu Gly Val Phe Ser Gly Ser Val Arg Cys 1115
1120 1125

Val Arg Leu Gly Val Phe Gly Ser Trp Met Ala Phe Ala Val Phe 1130
1135 1140

Leu Phe Ser Thr Pro Pro Asp Pro Val Gly Ser Ser Cys Asp His 1145
1150 1155

Asp Ser Pro Glu Cys His Ala Glu Leu Leu Ala Leu Glu Gln Arg 1160
1165 1170

Gln Leu Trp Glu Pro Val Arg Ser Leu Val Val Gly Pro Ser Gly 1175
1180 1185

Leu Leu Cys Val Ile Leu Gly Lys Leu Leu Gly Gly Ser Arg Cys 1190
1195 1200

Leu Trp Phe Val Leu Leu Arg Ile Cys Met Leu Ala Asp Leu Ala 1205
1210 1215

Ile Ser Leu Ile Tyr Val Val Ser Gln Gly Arg Cys His Lys Cys 1220
1225 1230

Trp Gly Lys Cys Ile Arg Thr Ala Pro Ala Glu Val Ala Leu Asn 1235
1240 1245

Val Phe Pro Phe Ser Arg Ala Thr Arg Ser Ser Leu Val Ser Leu 1250
1255 1260

Cys Asp Arg Phe Gln Ala Pro Lys Gly Val Asp Pro Val His Leu 1265
1270 1275

Ala Thr Gly Trp Arg Gly Cys Trp Cys Gly Glu Ser Pro Ile His 1280
1285 1290

Gln Ser His Gln Lys Pro Ile Ala Tyr Ala Asn Leu Asp Glu Lys 1295
1300 1305

Lys Ile Ser Ala Gln Thr Val Ile Ala Val Pro Tyr Asp Pro Ser 1310
1315 1320

Gln Ala Ile Lys Cys Leu Lys Val Leu Gln Ala Gly Gly Ala Ile 1325
1330 1335

Val Asp Gln Pro Thr Pro Glu Val Val Arg Val Ser Glu Ile Pro 1340
1345 1350

Phe Ser Ala Pro Phe Phe Pro Lys Val Pro Val Asn Pro Asp Cys 1355
1360 1365

Arg Val Val Val Asp Ser Asp Thr Phe Val Ala Ala Val Arg Cys 1370
1375 1380

Gly Tyr Ser Thr Ala Gln Leu Val Leu Gly Arg Gly Asn Phe Ala 1385
1390 1395

Lys Leu Asn Gln Thr Pro Leu Arg Asn Ser Val Pro Thr Lys Thr 1400
1405 1410

Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Thr Leu Ala Val Ala Gln Val Ser Val 1415
1420 1425

Trp Thr Leu Val His Phe Ile Leu Gly Leu Trp Leu Thr Ser Pro 1430
1435 1440

Gln Val Cys Gly Arg Gly Thr Ser Asp Pro Trp Cys Ser Asn Pro 1445
1450 1455

Phe Ser Tyr Pro Thr Tyr Gly Pro Gly Val Val Cys Ser Ser Arg 1460
1465 1470

Leu Cys Val Ser Ala Asp Gly Val Thr Leu Pro Leu Phe Ser Ala 1475
1480 1485

Val Ala His Leu Ser Gly Arg Glu Val Gly Ile Phe Ile Leu Val 1490
1495 1500

Leu Ala Ser Leu Gly Ala Leu Ala His Arg Leu Ala Leu Lys Ala 1505
1510 1515

Asp Met Ser Met Val Phe Leu Ala Phe Cys Ala Tyr Ala Trp Pro 1520
1525 1530

Met Ser Ser Trp Leu Ile Cys Phe Phe Pro Met Leu Leu Arg Trp 1535
1540 1545

Val Thr Leu His Pro Leu Thr Met Leu Trp Val His Ser Phe Leu 1550
1555 1560

Val Phe Cys Leu Pro Ala Ala Gly Val Leu Ser Leu Gly Ile Thr 1565
1570 1575

Gly Leu Leu Trp Ala Val Gly Arg Phe Thr Gln Val Ala Gly Ile 1580
1585 1590

Ile Thr Pro Tyr Asp Ile His Gln Tyr Thr Ser Gly Pro Arg Gly 1595
1600 1605

Ala Ala Ala Val Ala Thr Ala Pro Glu Gly Thr Tyr Met Ala Ala 1610
1615 1620

Val Arg Arg Ala Ala Leu Thr Gly Arg Thr Leu Ile Phe Thr Pro 1625
1630 1635

Ser Ala Val Gly Ser Leu Leu Glu Gly Ala Phe Arg Thr Gln Lys 1640
1645 1650

Pro Cys Leu Asn Thr Val Asn Val Val Gly Ser Ser Leu Gly Ser 1655
1660 1665

Gly Gly Val Phe Thr Ile Asp Gly Arg Arg Val Ile Val Thr Ala 1670
1675 1680

Thr His Val Leu Asn Gly Asn Thr Ala Arg Val Thr Gly Asp Ser 1685
1690 1695

Tyr Asn Arg Met His Thr Phe Asn Thr Asn Gly Asp Tyr Ala Trp 1700
1705 1710

Ser His Ala Asp Asp Trp Gln Gly Val Ala Pro Met Val Lys Ile 1715
1720 1725

Ala Lys Gly Tyr Arg Gly Arg Ala Tyr Trp Gln Thr Ser Thr Gly 1730
1735 1740

Val Glu Pro Gly Ile Met Gly Glu Gly Phe Ala Phe Cys Phe Thr 1745
1750 1755

Asn Cys Gly Asp Ser Gly Ser Pro Val Ile Ser Glu Ala Gly Asp 1760
1765 1770

Leu Ile Gly Val His Thr Gly Ser Asn Lys Leu Gly Ser Gly Leu 1775
1780 1785

Val Thr Thr Pro Glu Gly Glu Thr Cys Ser Ile Lys Glu Thr Arg 1790
1795 1800

Leu Ser Asp Leu Ser Arg His Phe Ala Gly Pro Ser Val Pro Leu 1805
1810 1815

Gly Asp Ile Lys Leu Ser Pro Ala Ile Ile Pro Asp Val Thr Thr 1820
1825 1830

Ile Pro Ser Asp Leu Ala Ser Leu Leu Ala Ser Val Pro Val Met 1835
1840 1845

Glu Gly Gly Leu Ser Thr Val Gln Leu Leu Cys Val Phe Phe Leu 1850
1855 1860

Leu Trp Arg Met Met Gly His Ala Trp Thr Pro Ile Val Ala Val 1865
1870 1875

Gly Phe Phe Leu Leu Asn Glu Ile Leu Pro Ala Val Leu Val Arg 1880
1885 1890

Ala Val Phe Ser Phe Ala Leu Phe Val Leu Ala Trp Ala Thr Pro 1895
1900 1905

Trp Ser Ala Gln Val Leu Met Ile Arg Leu Leu Thr Ala Ala Leu 1910
1915 1920

Asn Arg Asn Arg Leu Ser Leu Ala Phe Tyr Ala Phe Gly Gly Val 1925
1930 1935

Val Gly Leu Ala Thr Glu Ile Gly Thr Phe Ala Gly Gly Trp Pro 1940
1945 1950

Glu Leu Ser Gln Ala Leu Ser Thr Tyr Cys Phe Leu Pro Arg Phe 1955
1960 1965

Leu Ala Val Thr Ser Tyr Val Pro Thr Ile Ile Ile Gly Gly Leu 1970
1975 1980

His Ala Leu Gly Val Ile Leu Trp Leu Phe Lys Tyr Arg Cys Leu 1985
1990 1995

His Asn Met Leu Val Gly Asp Gly Ser Phe Ser Ser Ala Phe Phe 2000
2005 2010

Leu Arg Tyr Phe Ala Glu Gly Asn Leu Arg Lys Gly Val Ser Gln 2015
2020 2025

Ser Cys Gly Met Asn Asn Glu Ser Leu Thr Ala Ala Leu Ala Cys 2030
2035 2040

Lys Leu Ser Gln Ala Asp Leu Asp Phe Leu Ser Ser Leu Thr Asn 2045

2050 2055

Phe Lys Cys Phe Val Ser Ala Ser Asn Met Lys Asn Ala Ala Gly 2060
2065 2070

Gln Tyr Ile Glu Ala Ala Tyr Ala Arg Ala Leu Arg Gln Glu Leu 2075
2080 2085

Ala Ser Leu Val Gln Val Asp Lys Met Lys Gly Val Leu Ala Lys 2090
2095 2100

Leu Glu Ala Phe Ala Glu Thr Ala Thr Pro Ser Leu Asp Thr Gly 2105
2110 2115

Asp Val Ile Val Leu Leu Gly Gln His Pro His Gly Ser Ile Leu 2120
2125 2130

Asp Ile Asn Val Gly Gly Glu Arg Lys Thr Val Ser Val Gln Glu 2135
2140 2145

Thr Arg Cys Leu Gly Gly Ser Lys Phe Ser Val Cys Thr Val Val 2150
2155 2160

Ser Asn Thr Pro Val Asp Thr Leu Thr Gly Ile Pro Leu Gln Thr 2165
2170 2175

Pro Thr Pro Leu Phe Glu Asn Gly Pro Arg His Arg Ser Glu Asp 2180
2185 2190

Asp Asp Leu Lys Val Glu Arg Met Lys Lys His Cys Val Ser Leu 2195
2200 2205

Gly Phe His Lys Ile Asn Gly Lys Val Tyr Cys Lys Ile Trp Asp 2210
2215 2220

Lys Ser Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Thr Asp Asp Ser Arg Tyr Thr 2225
2230 2235

Gln Asp His Ala Phe Gln Asp Arg Ser Thr Asp Tyr Arg Asp Arg 2240
2245 2250

Asp Tyr Glu Gly Val Gln Thr Ala Pro Gln Gln Gly Phe Asp Pro 2255
2260 2265

Lys Ser Glu Ala Pro Val Gly Thr Val Val Ile Gly Gly Ile Thr 2270
2275 2280

Tyr Asn Arg His Leu Val Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Pro Lys 2285
2290 2295

Pro Asp Asn Cys Leu Glu Ala Ala Arg Leu Ser Leu Glu Gln Ala 2300
2305 2310

Leu Ala Gly Met Gly Gln Thr Cys Asp Leu Thr Ala Thr Glu Val 2315
2320 2325

Glu Lys Leu Lys Arg Ile Ile Ser Gln Leu Gln Gly Leu Thr Thr 2330
2335 2340

Glu Gln Ala Leu Asn Cys 2345

<210> 3
<211> 1463
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ORF 1B DE 94881 MSV CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 7209...11600

<400> 3

Thr Gly Phe Lys Leu Leu Ala Ala Ser Gly Leu Thr Arg Cys Gly Arg 1 5
10 15

Gly Gly Leu Val Val Thr Glu Thr Ala Val Lys Ile Val Lys Tyr His 20
25 30

Ser Arg Thr Phe Thr Leu Gly Ser Leu Asp Leu Lys Val Thr Ser Glu 35
40 45

Val Glu Val Lys Lys Ser Thr Glu Gln Gly His Ala Val Val Ala Asn
55 60

Leu Cys Ser Gly Val Val Leu Met Arg Pro His Pro Pro Ser Leu Val
70 75 80

Asp Val Leu Leu Lys Pro Gly Leu Asp Thr Thr Pro Gly Ile Gln Pro
90 95

Gly His Gly Ala Gly Asn Met Gly Val Asn Gly Ser Ile Trp Asp Phe
105 110

Glu Thr Ala Pro Thr Lys Val Glu Leu Glu Leu Ser Lys Gln Ile Ile
120 125

Gln Ala Cys Glu Val Arg Arg Gly Asp Ala Pro Asn Leu Gln Leu Pro
135 140

Tyr Lys Leu Tyr Pro Val Arg Gly Asp Pro Glu Arg Arg Lys Gly Arg
150 155 160

Leu Val Asn Thr Arg Phe Gly Asp Leu Pro Tyr Lys Thr Pro Gln Asp
170 175

Thr Lys Ser Ala Ile His Ala Ala Cys Cys Leu His Pro Asn Gly Val
185 190

Leu Val Ser Asp Gly Lys Ser Thr Leu Gly Thr Thr Leu Gln His Gly
200 205

Phe Glu Leu Tyr Val Pro Thr Val Pro Tyr Ser Val Met Glu Tyr Leu
215 220

Asp Ser Arg Pro Asp Thr Pro Phe Met Cys Thr Lys His Gly Thr Ser
230 235 240

Lys Ala Ala Ala Glu Asp Leu Gln Lys Tyr Asp Leu Ser Thr Gln Gly
250 255 245

Phe Val Leu Pro Gly Val Leu Arg Leu Val Arg Arg Phe Ile Phe Ser
265 270 260

His Val Gly Lys Ala Pro Pro Leu Phe Leu Pro Ser Thr Tyr Pro Ala
280 285 275

Lys Asn Ser Met Ala Gly Val Asn Gly Gln Arg Phe Pro Thr Lys Asp
295 300 290

Val Gln Ser Ile Pro Glu Ile Asp Glu Met Cys Ala Arg Ala Val Lys
310 315 320 305

Glu Asn Trp Gln Thr Val Thr Pro Cys Thr Leu Lys Lys Gln Tyr Cys
330 335 325

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

Leu Ala His Arg Ser Ala Leu Ser Gly Val Thr Gln Ala Phe Met Lys
360 365 355

Lys Ala Trp Lys Ser Pro Ile Ala Leu Gly Lys Asn Lys Phe Lys Glu
375 380 370

Leu His Cys Thr Val Ala Gly Arg Cys Leu Glu Ala Asp Leu Ala Ser
390 395 400 385

Cys Asp Arg Ser Thr Pro Ala Ile Val Arg Trp Phe Val Ala Asn Leu
410 415 405

Leu Tyr Glu Leu Ala Gly Cys Glu Glu Tyr Leu Pro Ser Tyr Val Leu
425 430 420

Asn Cys Cys His Asp Leu Val Ala Thr Gln Asp Gly Ala Phe Thr Lys
440 445 435

Arg Gly Gly Leu Ser Ser Gly Asp Pro Val Thr Ser Val Ser Asn Thr
455 460

Val Tyr Ser Leu Ile Ile Tyr Ala Gln His Met Val Leu Ser Ala Leu
465 470 475 480

Lys Met Gly His Glu Ile Gly Leu Lys Phe Leu Glu Glu Gln Leu Lys
485 490 495

Phe Glu Asp Leu Leu Glu Ile Gln Pro Met Leu Val Tyr Ser Asp Asp
500 505 510

Leu Val Leu Tyr Ala Glu Arg Pro Thr Phe Pro Asn Tyr His Trp Trp
515 520 525

Val Glu His Leu Asp Leu Met Leu Gly Phe Lys Thr Asp Pro Lys Lys
530 535 540

Thr Val Ile Thr Asp Lys Pro Ser Phe Leu Gly Cys Arg Ile Glu Ala
545 550 555 560

Gly Arg Gln Leu Val Pro Asn Arg Asp Arg Ile Leu Ala Ala Leu Ala
565 570 575

Tyr His Met Lys Ala Gln Asn Ala Ser Glu Tyr Tyr Ala Ser Ala Ala
580 585 590

Ala Ile Leu Met Asp Ser Cys Ala Cys Ile Asp His Asp Pro Glu Trp
595 600 605

Tyr Glu Asp Leu Ile Cys Gly Ile Ala Arg Cys Ala Arg Gln Asp Gly
610 615 620

Tyr Arg Phe Pro Gly Pro Ala Phe Phe Met Ser Met Trp Glu Lys Leu
625 630 635 640

Lys Ser His Asn Glu Gly Lys Lys Cys Arg His Cys Gly Ile Cys Asp
645

650 655

Ala Lys Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Cys Gly Leu Asp Leu Cys Leu Phe 660
665 670

His Ser His Phe His Gln His Cys Pro Val Thr Leu Ser Cys Gly His 675
680 685

His Ala Gly Ser Lys Glu Cys Ser Gln Cys Gln Ser Pro Val Gly Ala 690
695 700

Gly Lys Ser Pro Leu Asp Ala Val Leu Lys Gln Ile Pro Tyr Lys Pro 705
710 715 720

Pro Arg Thr Ile Ile Met Lys Val Asp Asn Lys Thr Thr Thr Leu Asp 725
730 735

Pro Gly Arg Tyr Gln Ser Arg Arg Gly Leu Val Ala Val Lys Arg Gly 740
745 750

Ile Ala Gly Asn Glu Val Asp Leu Ser Asp Gly Asp Tyr Gln Val Val 755
760 765

Pro Leu Leu Pro Thr Cys Lys Asp Ile Asn Met Val Lys Val Ala Cys 770
775 780

Asn Val Leu Leu Ser Lys Phe Ile Val Gly Pro Pro Gly Ser Gly Lys 785
790 795 800

Thr Thr Trp Leu Leu Asn Gln Val Gln Asp Asp Asp Val Ile Tyr Thr 805
810 815

Pro Thr His Gln Thr Met Phe Asp Ile Val Ser Ala Leu Lys Val Cys 820
825 830

Arg Tyr Ser Ile Pro Gly Ala Ser Gly Leu Pro Phe Pro Pro Pro Ala 835
840 845

Arg Ser Gly Pro Trp Val Arg Leu Ile Ala Ser Gly His Val Pro Gly 850
855 860

Arg Val Ser Tyr Leu Asp Glu Ala Gly Tyr Cys Asn His Leu Asp Ile 865
870 875 880

Leu Arg Leu Leu Ser Lys Thr Pro Leu Val Cys Leu Gly Asp Leu Gln 885
890 895

Gln Leu His Pro Val Gly Phe Asp Ser Tyr Cys Tyr Val Phe Asp Gln 900
905 910

Met Pro Gln Lys Gln Leu Thr Thr Ile Tyr Arg Phe Gly Pro Asn Ile 915
920 925

Cys Ala Ala Ile Gln Pro Cys Tyr Arg Glu Lys Leu Glu Ser Lys Ala 930
935 940

Arg Asn Thr Arg Val Val Phe Thr Thr Arg Pro Val Ala Phe Gly Gln 945
950 955 960

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

Asp Ser Ser Gln Gly Ala Thr Phe Asp Ile Val Thr Leu His Leu Pro 980
985 990

Ser Pro Lys Ser Leu Asn Lys Ser Arg Ala Leu Val Ala Ile Thr Arg 995
1000 1005

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

Glu Phe Phe Asn Leu Thr Pro Glu Arg Thr Asp Cys Asn Leu Ala 1025
1030 1035

Phe Ser Arg Gly Asp Glu Leu Val Val Leu Asn Val Asp Asn Ala 1040
1045 1050

Val Thr Thr Val Ala Lys Ala Leu Glu Thr Gly Ser Pro Arg Phe 1055
1060 1065

Arg Val Ser Asp Pro Arg Cys Lys Ser Leu Leu Ala Ala Cys Ser 1070
1075 1080

Ala Ser Leu Glu Gly Ser Cys Met Pro Leu Pro Gln Val Ala His 1085
1090 1095

Asn Leu Gly Phe Tyr Phe Ser Pro Asp Ser Pro Ala Phe Ala Pro 1100
1105 1110

Leu Pro Lys Glu Leu Ala Pro His Trp Pro Val Val Thr His Gln 1115
1120 1125

Asn Asn Arg Ala Trp Pro Asp Arg Leu Val Ala Ser Met Arg Pro 1130
1135 1140

Ile Asp Ala Arg Tyr Ser Lys Pro Met Val Gly Ala Gly Tyr Val 1145
1150 1155

Val Gly Pro Ser Ile Phe Leu Gly Thr Pro Gly Val Val Ser Tyr 1160
1165 1170

Tyr Leu Thr Leu Tyr Ile Gly Gly Glu Pro Gln Ala Leu Pro Glu 1175
1180 1185

Thr Leu Val Ser Thr Gly Arg Ile Ala Thr Asp Cys Arg Glu Tyr 1190
1195 1200

Leu Asp Ala Ala Glu Glu Glu Ala Ala Arg Glu Leu Pro His Ala 1205
1210 1215

Phe Ile Gly Asp Val Lys Gly Thr Thr Ile Gly Gly Cys His His 1220
1225 1230

```
Ile Thr  Ser Lys Tyr Leu Pro  Arg Ser Leu Pro Lys  Asp Ser Val     1235
    1240                1245

Ala Val  Val Gly Val Ser Ser  Pro Gly Arg Ala Ala  Lys Ala Val     1250
    1255                1260

Cys Thr  Leu Thr Asp Val Tyr  Leu Pro Glu Leu Arg  Pro Tyr Leu     1265
    1270                1275

Gln Pro  Glu Thr Ala Ser Lys  Cys Trp Lys Leu Lys  Leu Asp Phe     1280
    1285                1290

Arg Asp  Val Arg Leu Met Val  Trp Lys Gly Ala Thr  Ala Tyr Phe     1295
    1300                1305

Gln Leu  Glu Gly Leu Thr Trp  Ser Ala Leu Pro Asp  Tyr Ala Arg     1310
    1315                1320

Phe Ile  Gln Leu Pro Lys Asp  Ala Val Val Tyr Ile  Asp Pro Cys     1325
    1330                1335

Ile Gly  Pro Ala Thr Ala Asn  Arg Lys Val Val Arg  Thr Thr Asp     1340
    1345                1350

Trp Arg  Ala Asp Leu Ala Val  Thr Pro Tyr Asp Tyr  Gly Ala Gln     1355
    1360                1365

Val Ile  Leu Thr Thr Ala Trp  Phe Glu Asp Leu Gly  Pro Gln Trp     1370
    1375                1380

Lys Ile  Leu Gly Leu Gln Pro  Phe Arg Arg Thr Phe  Gly Phe Glu     1385
    1390                1395

Asn Thr  Glu Asp Trp Ala Ile  Leu Ala Arg Arg Met  Asn Asp Gly     1400
    1405                1410

Lys Asp  Tyr Thr Asp Tyr Asn  Trp His Cys Val Arg  Glu Arg Pro     1415
    1420                1425
```

His Ala Ile Tyr Gly Arg Ala Arg Asp His Thr Tyr His Phe Ala 1430
1435 1440

Leu Gly Thr Glu Leu Gln Val Glu Leu Gly Arg Pro Arg Leu Pro 1445
1450 1455

Pro Glu Gln Val Pro 1460

<210> 4
<211> 249
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ORF 2 DE 94881 MSV CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 11611..12360

<400> 4

Met Gln Trp Val Tyr Cys Gly Val Lys Ser Val Ser Cys Ser Trp Met 1 5
10 15

Pro Ser Leu Ser Ser Leu Leu Val Trp Leu Thr Leu Ser Ser Phe Ser 20
25 30

Pro Tyr Cys Leu Gly Ser Leu Leu Gln Ala Gly Tyr Trp Ser Ser Phe 35
40 45

Ser Glu Trp Phe Ala Pro Arg Phe Ser Val Arg Ala Leu Pro Phe Thr 50
55 60

Leu Pro Asn Tyr Arg Arg Ser Tyr Glu Gly Leu Leu Pro Asn Cys Arg 65
70 75 80

Pro Asp Val Pro Gln Phe Ala Val Lys His Pro Leu Gly Ile Leu Trp 85
90 95

His Met Arg Val Ser His Leu Ile Asp Glu Met Val Ser Arg Arg Ile 100
105 110

Tyr Arg Thr Met Glu His Ser Gly Gln Ala Ala Trp Lys Gln Val Val 115

120 125

Ser Glu Ala Thr Leu Thr Lys Leu Ser Arg Leu Asp Val Val Thr His 130
135 140

Phe Gln His Leu Ala Ala Val Glu Ala Asp Ser Cys Arg Phe Leu Ser 145
150 155 160

Ser Arg Leu Ala Met Leu Lys Asn Leu Ala Val Gly Asn Val Ser Leu 165
170 175

Glu Tyr Asn Thr Thr Leu Asp Arg Val Glu Leu Ile Phe Pro Thr Pro 180
185 190

Gly Thr Arg Pro Lys Leu Thr Asp Phe Arg Gln Trp Leu Ile Ser Val 195
200 205

His Ala Ser Ile Phe Ser Ser Val Ala Ser Ser Val Thr Leu Phe Thr 210
215 220

Val Leu Trp Leu Arg Ile Pro Ala Leu Arg Tyr Val Phe Gly Phe His 225
230 235 240

Trp Pro Thr Ala Thr His His Ser Asn 245

<210> 5
<211> 265
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ORF 3 DE 94881 MSV CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 12219..13016

<400> 5

Met Ala Tyr Gln Arg Ala Arg Phe His Leu Leu Leu Cys Gly Phe Val 1 5
10 15

Cys Tyr Leu Val His Ser Ala Leu Ala Ser Asn Ser Ser Ser Thr Leu 20
25 30

Cys Phe Trp Phe Pro Leu Ala His Gly Asn Thr Ser Phe Glu Leu Thr
40 45

Ile Asn Tyr Thr Ile Cys Lys Pro Cys Pro Thr Ser Gln Ala Ala Gln
55 60

Gln Arg Leu Glu Pro Gly Arg Asn Val Trp Cys Lys Ile Gly His Asp
70 75 80

Arg Cys Glu Glu Arg Asp His Asp Glu Leu Ser Met Ser Ile Pro Ser
90 95

Gly Tyr Asp Asn Leu Lys Leu Glu Gly Tyr Tyr Ala Trp Leu Ala Phe
105 110

Leu Ser Phe Ser Tyr Ala Ala Gln Phe His Pro Glu Leu Phe Gly Ile
120 125

Gly Asn Val Ser Arg Val Phe Val Asp Lys Arg His Gln Phe Ile Cys
135 140

Ala Glu His Asp Gly Gln Asn Ser Thr Ile Ser Ala Arg His Asn Ile
150 155 160

Ser Ala Ser Tyr Ala Val Tyr Tyr His His Gln Ile Asp Gly Gly Asn
170 175

Trp Phe His Leu Glu Trp Leu Arg Pro Phe Phe Ser Ser Trp Leu Val
185 190

Leu Asn Ile Ser Trp Phe Leu Arg Arg Ser Pro Ala Ser Pro Ala Ser
200 205

Arg Arg Ile Tyr Gln Ile Leu Arg Pro Thr Arg Pro Arg Leu Pro Val
215 220

Ser Trp Ser Phe Arg Thr Ser Ile Val Ser Asn Leu Thr Gly Pro Gln
230 235 240

Gln Arg Lys Val Pro Leu Pro Ser Gly Gly Arg Pro Asn Val Val Lys
250 255

Pro Ser Ala Phe Pro Ser Thr Ser Arg
260 265

<210> 6
<211> 183
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ORF 4 DE 94881 MSV CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 12761..13312

<400> 6

Met Ala Ala Thr Ile Leu Phe Leu Leu Ala Gly Ala Gln His Leu Met
10 15

Val Ser Glu Ala Phe Ala Cys Lys Pro Cys Phe Ser Thr His Leu Ser
25 30

Asp Ile Lys Thr Asn Thr Thr Ala Ala Ala Gly Phe Met Val Leu Gln
40 45

Asn Ile Asn Cys Phe Gln Ser His Arg Ala Ser Thr Ala Gln Gly Thr
55 60

Thr Pro Leu Arg Arg Ser Ser Gln Cys Arg Glu Ala Val Gly Ile Pro
70 75 80

Gln Tyr Ile Thr Ile Thr Ala Asn Val Thr Asp Glu Ser Tyr Leu Tyr
90 95

Asn Ala Asp Leu Leu Met Leu Ser Ala Cys Leu Phe Tyr Ala Ser Glu
105 110

Met Ser Glu Lys Gly Phe Lys Val Ile Phe Gly Asn Ile Ser Gly Val
120 125

Val Ser Ala Cys Val Asn Phe Thr Asp Tyr Val Ala His Val Thr Gln 130
135 140

His Thr Gln Gln His His Leu Val Ile Asp His Ile Arg Leu Leu His 145
150 155 160

Phe Leu Thr Pro Ser Thr Met Arg Trp Ala Thr Thr Ile Ala Cys Leu 165
170 175

Leu Ala Ile Leu Leu Ala Val 180

<210> 7
<211> 201
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ORF 5 DE 94881 MSV CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 13309..13914

<400> 7

Met Lys Cys Ser Cys Lys Leu Gly His Phe Leu Thr Pro His Ser Cys 1 5
10 15

Phe Trp Trp Leu Phe Leu Leu Cys Thr Gly Leu Ser Trp Ser Phe Val 20
25 30

Asp Gly Asn Asp Asp Ser Ser Thr Ser Gln Tyr Ile Tyr Asn Leu Thr 35
40 45

Ile Cys Glu Leu Asn Gly Thr Glu Trp Leu Ser Gly His Phe Asp Trp 50
55 60

Ala Val Glu Thr Phe Val Leu Tyr Pro Val Ala Thr His Ile Ile Ser 65
70 75 80

Leu Gly Phe Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Ala Leu Gly Leu Gly 85
90 95

Ala Val Ser Ala Thr Gly Phe Ile Gly Glu Arg Tyr Val Leu Ser Ser 100
105 110

Met Tyr Gly Val Cys Ala Phe Ala Ala Phe Val Cys Phe Val Ile Arg 115
120 125

Ala Ala Lys Asn Cys Met Ala Cys Arg Tyr Ala Arg Thr Arg Phe Thr 130
135 140

Asn Phe Ile Val Asp Asp Arg Gly Arg Ile His Arg Trp Lys Ser Ser 145
150 155 160

Ile Val Val Glu Lys Leu Gly Lys Ala Glu Val Gly Gly Asp Leu Val 165
170 175

Asn Ile Lys His Val Val Leu Glu Gly Val Lys Ala Gln Pro Leu Thr 180
185 190

Arg Thr Ser Ala Glu Gln Trp Glu Ala 195 200

<210> 8
<211> 173
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ORF 6 DE 94881 MSV CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 13902..14423

<400> 8

Met Gly Ser Leu Asp Asp Phe Cys Asn Asp Pro Thr Ala Ala Gln Lys 1 5
10 15

Leu Val Leu Ala Phe Ser Ile Thr Tyr Thr Pro Ile Met Ile Tyr Ala 20
25 30

Leu Lys Val Ser Arg Gly Arg Leu Leu Gly Leu Leu His Ile Leu Ile 35
40 45

Phe Leu Asn Cys Ser Phe Thr Phe Gly Tyr Met Thr Tyr Val His Phe 50
55 60

Gln Ser Thr Asn Arg Val Ala Phe Thr Leu Gly Ala Val Val Ala Leu 65

70 75 80

Leu Trp Gly Val Tyr Ser Leu Thr Glu Ser Trp Lys Phe Ile Thr Ser 85
90 95

Arg Cys Arg Leu Cys Cys Leu Gly Arg Arg Tyr Ile Leu Ala Pro Ala 100
105 110

His His Val Glu Ser Ala Ala Gly Leu His Ser Ile Pro Ala Ser Gly 115
120 125

Asn Arg Ala Tyr Ala Val Arg Lys Pro Gly Leu Thr Ser Val Asn Gly 130
135 140

Thr Leu Val Pro Gly Leu Arg Ser Leu Val Leu Gly Gly Lys Arg Ala 145
150 155 160

Val Lys Arg Gly Val Val Asn Leu Val Lys Tyr Gly Arg 165
170

<210> 9
<211> 128
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ORF 7 DE 94881 MSV CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:1 ENTRE LOS NUCLEÓTIDOS 14413..14799

<400> 9

Met Ala Gly Lys Asn Gln Ser Gln Lys Lys Arg Arg Asn Ala Ala Pro 1 5
10 15

Met Gly Lys Gly Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Leu Leu Gly Thr 20
25 30

Met Ile Lys Ser Gln Arg Gln Gln Ser Arg Gly Gly Gln Ala Lys Lys 35
40 45

Lys Lys Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Ala Glu Asp Asp Ile 50
55 60

Arg His His Leu Thr Gln Ala Glu Arg Ser Leu Cys Leu Gln Ser Ile 65
70 75 80

Gln Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Ala Ser Leu Ser Ser Ser 85
90 95

Gly Lys Val Ser Phe Gln Val Glu Phe Met Leu Pro Val Ala His Thr 100
105 110

Val Arg Leu Ile Arg Val Thr Ser Thr Ser Ala Ser Gln Gly Ala Asn 115
120 125

<210> 10
<211> 14843
<212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor Respiratorio Porcino

<400> 10
tttgtgtacc ttggaggcgt gggtacagcc ctgccccacc ccttggcccc tgttctagcc 60

cgacaggtac ccttctctct cggggcgagc gcgccgcctg ctgctccctt gcggcgggaa 120

ggacctcccg agtatttccg gagagcacct gctttacggg atctccgccc tttaaccatg 180

tctgggatgt tctcccggtg catgtgcacc ccggctgccc gggtattttg gaacgccggc 240

caagtctatt gcacacggtg tctcagtgca cggtctcttc tctctccaga acttcaggac 300

acggacctcg gtgcagttgg cttgtttcac aagcctaaag acaagctcca ttggaaagtt 360

cccattggta tcccccaggt ggaatgttct ccatctgggt gttgctggct gtcaaccatt 420

tttcctttag cgcgcatgac ctccggcaat cacaacttcc ttcaacgact cgtgaaggtt 480

gctgacgtat tgtaccgtga cggttgctta acccctagac acctccgtga actccaagtt 540

tacgagcgtg gttgcaattg gtatccgatt acggggcctg tgcctgggat ggctgtgtac 600

gcgaactcca tgcacgtgtc cgaccaaccg ttccctggtg ccactcatgt gttaacaaat 660

tcccctttgc ctcaacgggc ttgtcggcag ccgttctgtc cgttcgaaga ggcccattct 720

agcatataca ggtgggaaaa atttgtaatt tttatggatt cctcctccga cggtcgatct 780

cgcatgatgt ggactccgga atccgatgac tccacggctt tggaagttct gccgcccgag 840

ctagaacacc aggtcaaggt ccttgttcgg agctttcccg cccatcacct tgtcgacctt 900

gccgattggg agctcactga gtcccctgag aacggttttt ccttcagcac gtcacatcct 960

tgcggctacc ttgttcggga cccggctgta tccgaaggca agtgttggct ttcctgcttt 1020

ttgagccagt cagccgaagt gctcagtcgc gaggcgcatc tggctaccgc ctatggttac 1080

caaaccaagt ggggtgtgcc tggcaagtac atccagcgca gacttcaagt tcacggtctc 1140
cgtgctgtgg tcgaccctga tggtcccatt cacgttgaag cattgtcttg cccccagtct 1200
tggatcaggc acttgaccct gaatgatgat gtcaccccgg gattcgttcg cctaatgtct 1260
cttcgcattg tgccgaacac agagcctacc acacaccgga tctttcgttt tggagtgcac 1320
aagtggtatg gtgccgccgg caaacgggcc cgtggcaagc gtgccgccaa aagtgagaaa 1380
gactcggctt ccaccctcaa ggttgcccga ccgacttcca ccagtggaat cgtcacctac 1440
tccccacctg cggacgggtc ttgtggttgg catgcccttg ccgccatact gaaccggatg 1500
attaataatg acttcacgtc ccctctgcct cggtacaaca ggccggagga cgattgggct 1560
tctgatggtg accttgctca ggccattcaa tgtttgcaac tacctgccgc catagctcgg 1620
aaccgcgcct gccctaacgc caaatacctc gtaaaactca acggagttca ttgggaggta 1680
gaggtgaggc ctggaatggc tcctcgctcc ctctctcgtg agtgcgttgt tggcgtctgc 1740
tctgaaggct gtgtcgcgtc gccttacccg gaggacgggt tgcctaaacg tgcacttgag 1800
gccctggcgt ctgcttatag actgccttca gactgtgttt gtgatggtat tattgacttc 1860
cttgccaatc cacctcccca ggagttctgg actcttgaca aaatgttgac ttccccgtca 1920
ccggagcagt ccggcttctc tagtctgtat aaattgttgt tagaggtctt gccgcagaaa 1980
tgcggatcca cagaagggga attcatctat actgttgaga ggatgttgaa ggattgtccg 2040
agctccaaac aggccatggc cctccttgca aaaattaagg tcccatcctc aaaggcccca 2100
tccgtgactc tgaacgagtg cttccccacg gatgttccag tcaactctga gttaatatct 2160
tgggaagagc ccaaagaccc tggcgctgct gttgtcctat gtccatcgga tgcaaaagaa 2220
tctaaggaaa cagcccctga agaagctcaa gcgagaaacc gtaaggtcct ccaccctgtg 2280
gtccttaccg aggaacttag cgagcaacag gtgcaggtgg ttgagggtga tcaggatatg 2340
ccactggatt tgacttggcc aaccttaacc gctacggcga cccctgttag agggccggta 2400
ccggacaatt tgagctctgg cattggtgcc cagcccgcta ccgttcaaga actcattctg 2460
gcgaggcctg caccccgtct tgttgagcgc tgtggcacgg agtcgaacgg cagcagttca 2520
tttctggatt tgcctgacgt gcagacctcg gaccagcctt tagacctgtc cctggccgcg 2580
tggcctgtaa gggctaccgc gtctgacccc ggttggatcc acggtaggcg tgagcctgtc 2640
tttgtgaagc ctcgaggtgt tttctctgat ggcgagtcgg cccttcagtt cggagagctt 2700
tccgaagcca gttctgtcgt cgatgaccgg acaaaagaag ctccggtggt tgacgccccc 2760
atcgatttga caacttcgaa cgagacgctc tctgggtctg acccctttga attcgccaaa 2820
ttcaggcgcc cgcgtttctc cgcgcaagct ttaatcgacc gaggtggtcc gcttgccgat 2880
gttcatgcaa agataaagag tcgggtatat gaacaatgcc ttcaagcttg tgaacctggt 2940

agtcgtgcga ccccagccac caagaagtgg ctcgacaaaa tgtgggacag ggtggacatg 3000

aaaacttggc gctgcacctc gcagttccaa gctggtcaca ttcttgagtc cctcaaattc 3060

ctccctgaca tgattcaaga cacaccgcct cctgttccca ggaagaaccg agctggtgac 3120

agtgccggcc tgaagcaact ggtggcgcag tgggatagga aattgagtgt gacacccccc 3180

acaaaaccgg ttggaccggt gcttgaccag accgtccctc tgcctatgga catccagcaa 3240

gaagatgcca tctccgctga caagccaccc cattcgcaaa acccttctag tcaagtagat 3300

gtgggtggag gttggaaaag ttttatgctc tccggcaccc gtttcgcggg gtccgttagt 3360

cagcgcctta cgacatgggt ttttgaggtt ctctcccatc tcccagcttt tatgctcaca 3420

cttttctcgc cacggggctc tatggctcca ggtgattggc tgtttgcagg tgctgttcta 3480

cttgctctcc tgctctgccg ttcttaccca atactcggat gccttccctt attgggtgtc 3540

ttttctggtt ctgtgcggtg tgttcgtttg ggtgtttttg gttcttggat ggcttttgct 3600

gtatttttat tctcgactcc acccgaccca gtcggttctt cttgtgacca cgattcgccg 3660

gagtgtcatg ctgagctttt ggctcttgag cagcgccaac tttgggaacc tgtgcgcagc 3720

cttgtggtcg ggccatcggg cctcttatgc gtcattcttg gcaagttact cggtgggtca 3780

cgttgtctct ggtttgttct cctacgtata tgcatgctcg cagatttggc aatttctctt 3840

atttatgtgg tgtcccaagg gcgttgtcac aagtgttggg gaaagtgtat aaggacggct 3900

cctgcagaag tgacccttaa tgtgtttcct ttttcgcgcg ccacccgctc atctcttgtg 3960

tccttgtgtg atcggttcca agcgccaaaa ggagttgacc ccgtgcactt ggcgacaggc 4020

tggcgcgggt gctggtgtgg tgagagccct attcatcaat cacaccaaaa accgatagct 4080

tatgccaact tggatgaaaa gaagatatcc gcccagacgg tgattgctgt cccgtatgat 4140

cccagtcagg ccattaaatg cctgaaagtt ttgcaggcag gaggggctat tgtggaccag 4200

cctacgcccg aggtcgtccg tgtgtctgag attcccttct cggccccatt ttttccgaag 4260

gtcccagtca acccagattg cagggttgtg gtagattcgg acacttttgt ggctgcggtc 4320

cgctgcggtt attcgacagc acaactggtc cttggtcggg gcaactttgc caagctaaat 4380

cagacccccc tcaggaactc tgtccccacc aaaacaactg gtggggcctc atacaccctt 4440

gccgtggccc aggtatctgt gtggactctt gttcatttca tcctcggcct ttggttaacg 4500

tcacctcaag tgtgtggtcg agggacctct gacccgtggt gttcgaaccc tttttcgtat 4560

cctacttatg gccccggagt tgtgtgttcc tctcgactct gcgtgtctgc cgacggagtt 4620

accctgccat tgttctcagc cgttgcccat ctttccggta gagaggtggg gatttttatt 4680

ttggtgcttg cctccttggg cgctttagcc caccgcttgg ctcttaaggc agacatgtca 4740

atggtctttt tggcgttttg tgcttacgcc tggcccatga gctcctggtt aatttgcttc 4800

tttcctatgc tcttgaggtg ggtaaccctt catcctctca ctatgctttg ggtgcactca 4860

ttttggtgt tttgcctacc agctgccggc gttctctcgc tgggaataac cggtcttctt 4920
tgggcagttg gccgtttcac ccaggttgcc ggaattatca caccttatga catccaccag 4980
tatacctccg gaccacgtgg tgcagctgct gtagcaacgg ctccagaagg tacttacatg 5040
gcggccgttc ggagagccgc tttgactgga cggactttga tcttcacacc atctgcagtc 5100
ggatcccttc ttgaaggtgc tttcagaact caaaagccct gccttaacac cgtgaatgtc 5160
gtaggctctt cccttggttc tggaggagtt ttcaccattg atggcagaag agtcatcgtc 5220
actgccaccc atgtgttgaa tggtaacaca gccagggtca ctggtgattc ctacaaccgc 5280
atgcacacgt tcaatactaa tggtgattat gcctggtccc atgctgatga ctggcaaggc 5340
gttgccccta tggttaagat cgctaagggg tatcgcggtc gtgcctactg gcaaacgtca 5400
accggagtcg aacctggcat catgggggaa ggattcgcct tctgtttcac taactgtggc 5460
gactcagggt cacctgtcat ttcagaagct ggtgacctta ttggagtcca taccggttca 5520
aacaaactcg gttctggtct tgtgacaacc cctgaagggg agacctgctc catcaaggaa 5580
actaggctct ctgacctttc tagacatttt gcaggtccaa gcgtccctct tggggacatt 5640
aagttgagcc cagccatcat ccctgatgtg acaactattc cgagtgactt ggcatcgctc 5700
cttgcttctg tccccgtgat ggaaggtggc ctctcaactg tccagctttt gtgcgtcttt 5760
ttccttctct ggcgcatgat gggccatgcc tggacaccca ttgttgccgt aggcttcttt 5820
ttgctgaatg aaattctccc agcagtcttg gtccgagctg tgttctcttt tgcactcttt 5880
gtacttgcat gggccacccc ctggtcggca caagtgttga tgattagact cctcacggcg 5940
gctctcaacc gcaacaggtt gtccctggcg ttctacgcac tcggaggtgt cgttggcctg 6000
gccacagaaa tcgggacttt tgctggtgga tggcctgaac tgtcccaagc cctctcgaca 6060
tactgcttcc tgcccaggtt ccttgctgtg actagttatg tccccaccat catcatcggt 6120
gggctccatg ccctcggcgt aattttgtgg ttattcaaat accgatgcct ccacaacatg 6180
ctggttggtg atgggagttt ctcaagcgct ttcttcctac ggtattttgc tgagggtaat 6240
cttaggaaag gcgtgtcgca gtcctgtggc atgaataacg aatccctgac agctgctttg 6300
gcttgcaagt tgtcgcaagc tgaccttgat tttttgtcca gtttaacgaa cttcaagtgc 6360
tttgtgtccg cttcaaacat gaaaaatgca gctggccaat acatcgaggc ggcgtatgct 6420
agagctctgc gtcaggagct ggcctccttg gttcaggttg acaagatgaa aggagtattg 6480
gccaagctcg aggctttcgc tgagacggcc actccgtcac ttgacacagg tgacgtgatt 6540
gttctgcttg ggcaacaccc ccatggatcc atcctcgaca ttaatgtggg gggtgaaagg 6600
aaaactgtgt ctgtgcaaga aacacgatgc ctgggtggtt ccaaattcag tgtctgcact 6660
gtcgtgtcca acacgcccgt ggataccttg accggcatcc cacttcagac gccaacccca 6720

cttttttgaaa atggcccgcg ccatcgcagc gaggacgacg accttaaagt tgagagaatg 6780

aaaaaacact gtgtatccct cggcttccac aaaatcaatg gtaaagttta ctgcaaaatt 6840

tgggacaagt ctaacggcga cacctttac acggatgatt cccgatacac tcaagaccat 6900

gcttttcagg acaggtcaac cgactataga gacagggatt atgaaggtgt acagaccgcc 6960

ccccaacagg gattcgatcc aaagtccgaa gcccctgttg gcactgttgt aatcggtggc 7020

attacgtata acaggcatct ggtcaaaggt aaggaggtcc tagttcccaa acctgacaac 7080

tgccttgaag ctgccagact gtcccttgag caagctcttg ctgggatggg ccaaacttgt 7140

gaccttacag ctaccgaagt ggagaaacta aagcgcatca ttagtcaact ccaaggtctg 7200

accactgaac aggctttaaa ctgctagccg ccagcggctt gacccgctgt ggccgcggcg 7260

gcctagttgt aactgaaacg gcggtaaaaa tcgtaaaata ccacagcaga actttcacct 7320

taggctcttt agacctaaaa gtcacctccg aggtggaggt gaagaaatca actgagcagg 7380

ggcacgctgt cgtggcgaac ttatgttccg gtgtcgtctt gatgaggcct cacccaccgt 7440

cccttgttga cgttctcctc aaacccggac ttgacacaac acccggcatt caaccagggc 7500

atggggccgg gaatatgggc gtgaacggtt ctatttggga ttttgaaact gcacccacaa 7560

aggtagaact agagttgtcc aagcaaataa tccaagcatg tgaagtcagg cgcggggacg 7620

cccctaacct ccaactcccc tacaagcttt atcctgtcag gggggacccc gagcggcgta 7680

aaggtcgcct tgtcaacact aggtttggag atttacctta caaaactccc caagacacca 7740

agtccgcaat tcatgcggct tgttgcctgc atcccaatgg ggtcctcgtg tctgatggta 7800

aatccacgct gggtaccact cttcaacatg gtttcgagct ttatgtcccc actgtacctt 7860

atagtgtcat ggaatacctt gattcacgcc ctgacacccc ttttatgtgt actaaacatg 7920

gcacttccaa ggctgctgca gaggacctcc aaaaatatga cctatccact caagggtttg 7980

tcttgcctgg ggtcctacgc ctagtgcgca ggttcatctt tagccatgtt ggtaaggcgc 8040

caccactgtt ccttccatca acctaccctg ccaagaactc catggcaggg gtcaatggcc 8100

agaggttccc aacaaaggat gtccagagca tacctgaaat tgatgaaatg tgcgcccgtg 8160

ccgtcaagga aaattggcag actgtgacac cttgcaccct caaaaaacag tactgttcca 8220

aacctaaaac tagaaccatc ctaggtacca acaacttcat agccttggct cacaggtcag 8280

cactcagtgg tgtcacccag gcgttcatga agaaggcctg gaagtcccca attgccttgg 8340

ggaaaaacaa gtttaaggaa ttgcattgca ctgtcgccgg cagatgcctt gaggctgacc 8400

tggcttcctg cgatcgcagc acccccgcca ttgtgaggtg gtttgttgcc aacctcctgt 8460

atgaacttgc aggatgtgaa gagtacttgc ctagctacgt gctcaactgt tgccatgacc 8520

ttgtggcaac gcaggatggc gctttcacaa aacgcggtgg cctgtcgtcc ggggaccccg 8580

tcaccagtgt gtccaacacc gtctactcac tgataattta cgcccagcac atggtgcttt 8640

cggccttgaa gatgggtcat gaaattggtc tcaagttcct tgaggaacag ctcaaatttg 8700

aggaccttct tgaaatccag cccatgttag tgtattctga tgacctcgtc ttgtatgcgg 8760

aaagacccac ttttcccaac taccattggt gggtcgagca tcttgacctg atgttgggct 8820

ttaaaacgga cccaaagaaa actgtcataa ctgataaacc cagttttctc ggctgcagaa 8880

ttgaagcagg acggcagtta gtccccaatc gcgaccgtat tctggctgct cttgcatatc 8940

atatgaaggc gcagaacgcc tcagagtatt atgcgtccgc tgccgcaatt ctgatggatt 9000

cgtgtgcttg cattgaccat gaccccgagt ggtatgagga ccttatctgc ggcatcgccc 9060

ggtgtgctcg ccaggacggt taccgttttc caggcccggc atttttcatg tccatgtggg 9120

agaagctgaa aagtcataac gaagggaaga aatgccgtca ctgcggcatc tgcgacgcca 9180

aagccgacta tgcgtccgcc tgtggacttg atttgtgttt gttccattca cactttcatc 9240

aacactgccc agtcactctg agctgtggcc accatgccgg ttcaaaggaa tgttcgcagt 9300

gtcagtcacc tgtcggggct ggcaaatccc cccttgacgc tgtgctgaaa caaatcccgt 9360

acaaacctcc tcgtaccatt atcatgaagg tggacaacaa aacaacgacc cttgacccgg 9420

gaagatatca gtcccgtcga ggtcttgttg cagtcaaaag aggtattgca ggtaatgagg 9480

ttgatctttc tgatggagac taccaagtgg tgcctctttt gccgacttgc aaagacataa 9540

acatggtgaa ggtggcttgc aacgtactac tcagcaagtt tatagtaggg ccgccaggtt 9600

ccggaaaaac cacctggcta ctgaaccaag tccaggacga tgatgtcatt tacacaccta 9660

ctcatcagac aatgtttgac atagtcagtg ctcttaaagt ttgcaggtat tccatcccag 9720

gagcctcagg actccctttt ccaccacctg ccaggtccgg gccgtgggtt aggctcatcg 9780

ccagcggaca tgtccctggc cgagtgtcat atctcgatga ggcaggatat tgcaatcatc 9840

tagacattct aaggctgctt tccaaaacac cccttgtgtg tttgggtgac cttcagcaac 9900

ttcacccggt cggctttgat tcctattgtt atgtgttcga tcagatgcct cagaagcagc 9960

tgaccaccat ttatagattt ggccctaaca tctgtgcagc catccagcct tgttacaggg 10020

agaaacttga atccaaggcc aggaacacca gagtggtttt caccacccgg cctgtggcct 10080

ttggtcaggt cctgacaccg taccacaaag atcgtaccgg ctctgcaata actatagatt 10140

catcccaggg ggcgaccttc gacattgtga cattgcatct accatcgcca aagtccctaa 10200

acaaatcccg agcacttgta gccatcactc gggcaagaca tgggttgttc atttatgacc 10260

ctcatgacca actccaggag tttttcaact taacccccga gcgcactgat tgtaaccttg 10320

cgttcagccg tggggatgag ctggttgttt tgaatgtgga taatgcggtc acaactgtag 10380

cgaaggccct agagacaggt tcaccccgat ttcgagtatc ggacccgagg tgcaagtctc 10440

tcttagccgc ttgttcggcc agtctagaag ggagctgcat gccactacca caagtagcac 10500

ataacctggg gttttacttt tccccggaca gcccagcttt tgcacccctg ccaaaagagc 10560

tggcgccaca ttggccagtg gtcacccacc agaataatcg agcgtggcct gatcgacttg 10620

tcgctagtat gcgcccaatt gatgcccgct acagcaagcc aatggtcggt gcagggtatg 10680

tggtcgggcc atccattttt cttggcactc ctggtgtggt gtcatactat ctcacattat 10740

acatcggggg cgagcctcag gccctgccag aaacactcgt ttcaacagga cgtatagcca 10800

cagattgtcg ggaatatctc gacgcggctg aggaagaggc agcgagagaa cttccccacg 10860

catttattgg cgatgtcaaa ggcactacgg tcgggggggtg tcaccacatt acatcgaaat 10920

acctacctag gtccctgcct aaagactctg ttgctgtggt tggggtgagt tcgcccggta 10980

gggctgctaa agccgtgtgc actctcaccg atgtgtacct ccccgaactc cgaccatatt 11040

tgcaaccgga gacggcatca aaatgctgga aacttaaact ggatttcagg gatgttcgac 11100

tgatggtctg gaaaggcgcc acagcctatt tccagttgga agggctgaca tggtcagcgc 11160

tgcccgatta tgctaggttc attcagctac ccaaggatgc cgttgtgtac atcgatccgt 11220

gtatagggcc ggcaacagcc aatcgcaagg ttgtgcgaac cacagactgg cgggccgacc 11280

tggcagtgac accgtatgat tacggtgctc aggtcatttt gacaacagcc tggttcgagg 11340

accttgggcc gcagtggaag attttggggt tgcagccttt cagacgaaca tttggctttg 11400

agaacactga agattgggca attctcgcac gccgtatgaa tgacggcaaa gattacactg 11460

actataattg gcattgtgta cgagaacgcc cacacgcaat ttacgggcgc gcccgtgacc 11520

atacgtatca ttttgccctt ggcactgaac tgcaagtaga gctgggcaga ccccggctgc 11580

ctcctgagca agtgccgtga acgcggagtg atgcaatggg ttcactgtgg agtaaaatca 11640

gtcagttgtt cgtggatgcc ttcactgagt tccttgttag tgtggttgac attgtcatct 11700

ttctcgccat attgtttggg ttcactgttg caggctggtt attggtcttc cttctcagag 11760

tggtttgctc cgcgtttctc cgttcgcgct ctgccattca ctctcccgaa ctatcgaagg 11820

tcctatgagg gcttgctacc caactgcaga ccggatgtcc cacaattcgc agttaagcac 11880

ccgttgggta tactttggca tatgcgagtc tcccacctaa ttgacgaaat ggtctctcgc 11940

cgcatttacc ggaccatgga acattcgggt caagcggcct ggaagcaggt tgttagtgaa 12000

gccactctca caaaactgtc aaggcttgac gtagtcactc atttccaaca cctggccgca 12060

gtggaggctg attcttgccg cttccttagc tcacgactcg cgatgctgaa aaaccttgcc 12120

gttggcaatg tgagcctgga gtacaacact actttggacc gcgttgagct catctttccc 12180

acaccaggta cgaggcccaa gttgaccgat tttaggcaat ggcttatcag cgtgcacgct 12240

tccatcttct cctctgtggc ttcgtctgtt accttgttca cagtgctttg gcttcgaatt 12300

ccagctctac gctatgtttt tggtttccat tggcccacgg caacacatca ttcgaactaa 12360

ctatcaatta cactatatgt aagccatgcc ctaccagtca agctgcccaa caaagactcg 12420

agcctggccg taacgtgtgg tgcaaaatag ggcacgacag gtgtgaggaa cgtgaccatg 12480
atgagttgtc aatgtccatt ccgtccgggt acgacaacct caaacttgag ggttattatg 12540
cttggctggc ttttttgtcc ttttcctacg cggcccaatt ccatccggag ctgttcggaa 12600
taggaaacgt gtcgcgcgtc tttgtggata agcgacacca gttcatttgc gccgagcatg 12660
atggacaaaa ttcaaccata tctgccagac acaacatctc cgcgtcgtat gcggtgtatt 12720
accatcatca aatagacggg ggcaattggt ttcatttgga atggctgcga ccattctttt 12780
cctcctggct ggtgctcaac atctcatggt ttctgaggcg ttcgcctgca agccctgctt 12840
ctcgacgcat ctatcagata ttaagaccaa cacgaccgcg gctgccggtt tcatggtcct 12900
tcagaacatc aattgtttcc aatctcacag ggcctcaaca gcgcaaggta ccactcccct 12960
caggaggtcg tcccaatgtc gtgaagccgt cggcattccc cagtacatca cgataacggc 13020
taatgtgacc gatgaatcgt atttgtacaa cgcggacttg ctgatgcttt ccgcgtgcct 13080
tttctacgcc tcggaaatga gcgagaaagg cttcaaagtc atctttggga atatttctgg 13140
cgttgtttcc gcttgtgtta atttcacaga ttatgtggcc catgtgaccc aacacactca 13200
gcagcaccat ttggtaattg atcacattcg gttactacac ttcttgacac cgtctacgat 13260
gaggtgggct acaaccattg cttgtttgtt tgccattctt ttggcggtat gaaatgttct 13320
tgcaagttgg ggcatttctt gactcctcac tcttgcttct ggtggctttt tttgctgtgt 13380
accggcttgt cttggtcctt tgtcgatggc aacgacaaca gctcgacatc ccaatacata 13440
tataatttga cgatatgcga gctgaatggg accgaatggt tgtccggtca ttttgattgg 13500
gcagtcgaaa cctttgtgct ttacccagtt gccactcata tcatttcact gggttttctc 13560
acaacaagcc atttccttga tgcgctcggt ctcggcgctg tgtccgccac aggattcatt 13620
ggcgagcggt atgtacttag cagcatgtac ggcgtttgcg ccttcgcggc gctcgtatgt 13680
tttgtcatcc gtgctgctaa aaattgcatg gcttgccgct atgcccgcac ccggtttacc 13740
aacttcatcg tggacgaccg gggaagaatc catcgatgga agtcttcaat agtggtggag 13800
aaattgggca aagctgaagt cggtggtgac cttgtcaaca ttaagcatgt tgtcctcgaa 13860
ggggttaaag ctcaaccctt gacgaggact tcggctgagc aatgggaagc ctagacgact 13920
tttgcaacga tcccaccgcc gcacaaaaac tcgtgctggc ctttagcatc acatatacac 13980
ccataatgat atacgccctt aaggtgtcac gcggccgact cctggggctg ttgcacatct 14040
tgatatttct gaattgttcc tttacttttg ggtacatgac atatgtgcat tttcaatcca 14100
ccaaccgtgt cgcactcact ctgggggctg tagtcgccct tttgtggggt gtttacagcc 14160
tcacagagtc atggaagttc atcacttcca gatgcagatt gtgttgccta ggccggcgat 14220
acattctggc ccctgcccat cacgtagaaa gtgctgcagg cctccattca atcccagcgt 14280

ctggtaaccg agcatacgct gtgagaaagc ccggactaac atcagtgaac ggcactctag 14340

tacctgggct tcggagcctc gtgctgggcg gcaaacgagc tgttaaacga ggagtggtta 14400

acctcgtcaa gtatggccgg taagaaccag agccagaaga aaagaagaaa tgcagctccg 14460

atggggaaag gccagccagt caatcaactg tgccagttgc tgggtacaat gataaagtcc 14520

cagcgccagc aatctagggg aggacaggcc aaaaagaaga agcctgagaa gccacatttt 14580

cccctagctg ctgaagatga cattcggcac catctcaccc aggccgaacg ttccctctgc 14640

ttgcaatcga tccagacggc tttcaatcaa ggcgcaggaa ctgcgtcgct ttcatccagc 14700

gggaaggtca gtttccaggt tgagttcatg ctgccggttg ctcatacagt gcgcctgatt 14760

cgcgtgactt ctacatccgc cagtcagggt gcaaattaat ttgacagtca ggtgaatggc 14820

cgcgattgac gtgtggcctc taa 14843

<210> 11
<211> 2349
<212> PRT
<213> Virus del Síndrome Reproductor Respiratorio Porcino

<400> 11

Met Ser Gly Met Phe Ser Arg Cys Met Cys Thr Pro Ala Ala Arg Val 1 5 10 15

Phe Trp Asn Ala Gly Gln Val Tyr Cys Thr Arg Cys Leu Ser Ala Arg 20 25 30

Ser Leu Leu Ser Pro Glu Leu Gln Asp Thr Asp Leu Gly Ala Val Gly 35 40 45

Leu Phe His Lys Pro Lys Asp Lys Leu His Trp Lys Val Pro Ile Gly 50 55 60

Ile Pro Gln Val Glu Cys Ser Pro Ser Gly Cys Cys Trp Leu Ser Thr 65 70 75 80

Ile Phe Pro Leu Ala Arg Met Thr Ser Gly Asn His Asn Phe Leu Gln 85 90 95

Arg Leu Val Lys Val Ala Asp Val Leu Tyr Arg Asp Gly Cys Leu Thr 100 105 110

Pro Arg His Leu Arg Glu Leu Gln Val Tyr Glu Arg Gly Cys Asn Trp
120 125

Tyr Pro Ile Thr Gly Pro Val Pro Gly Met Ala Val Tyr Ala Asn Ser
135 140

Met His Val Ser Asp Gln Pro Phe Pro Gly Ala Thr His Val Leu Thr
150 155 160

Asn Ser Pro Leu Pro Gln Arg Ala Cys Arg Gln Pro Phe Cys Pro Phe
170 175

Glu Glu Ala His Ser Ser Ile Tyr Arg Trp Glu Lys Phe Val Ile Phe
185 190

Met Asp Ser Ser Ser Asp Gly Arg Ser Arg Met Met Trp Thr Pro Glu
200 205

Ser Asp Asp Ser Thr Ala Leu Glu Val Leu Pro Pro Glu Leu Glu His
215 220

Gln Val Lys Val Leu Val Arg Ser Phe Pro Ala His His Leu Val Asp
230 235 240

Leu Ala Asp Trp Glu Leu Thr Glu Ser Pro Glu Asn Gly Phe Ser Phe
250 255

Ser Thr Ser His Pro Cys Gly Tyr Leu Val Arg Asp Pro Ala Val Ser
265 270

Glu Gly Lys Cys Trp Leu Ser Cys Phe Leu Ser Gln Ser Ala Glu Val
280 285

Leu Ser Arg Glu Ala His Leu Ala Thr Ala Tyr Gly Tyr Gln Thr Lys
295 300

Trp Gly Val Pro Gly Lys Tyr Ile Gln Arg Arg Leu Gln Val His Gly
310 315 320

Leu Arg Ala Val Val Asp Pro Asp Gly Pro Ile His Val Glu Ala Leu 325
330 335

Ser Cys Pro Gln Ser Trp Ile Arg His Leu Thr Leu Asn Asp Asp Val 340
345 350

Thr Pro Gly Phe Val Arg Leu Met Ser Leu Arg Ile Val Pro Asn Thr 355
360 365

Glu Pro Thr Thr His Arg Ile Phe Arg Phe Gly Val His Lys Trp Tyr 370
375 380

Gly Ala Ala Gly Lys Arg Ala Arg Gly Lys Arg Ala Ala Lys Ser Glu 385
390 395 400

Lys Asp Ser Ala Ser Thr Leu Lys Val Ala Arg Pro Thr Ser Thr Ser 405
410 415

Gly Ile Val Thr Tyr Ser Pro Pro Ala Asp Gly Ser Cys Gly Trp His 420
425 430

Ala Leu Ala Ala Ile Leu Asn Arg Met Ile Asn Asn Asp Phe Thr Ser 435
440 445

Pro Leu Pro Arg Tyr Asn Arg Pro Glu Asp Asp Trp Ala Ser Asp Gly 450
455 460

Asp Leu Ala Gln Ala Ile Gln Cys Leu Gln Leu Pro Ala Ala Ile Ala 465
470 475 480

Arg Asn Arg Ala Cys Pro Asn Ala Lys Tyr Leu Val Lys Leu Asn Gly 485
490 495

Val His Trp Glu Val Glu Val Arg Pro Gly Met Ala Pro Arg Ser Leu 500
505 510

Ser Arg Glu Cys Val Val Gly Val Cys Ser Glu Gly Cys Val Ala Ser 515

520 525

Pro Tyr Pro Glu Asp Gly Leu Pro Lys Arg Ala Leu Glu Ala Leu Ala 530
535 540

Ser Ala Tyr Arg Leu Pro Ser Asp Cys Val Cys Asp Gly Ile Ile Asp 545
550 555 560

Phe Leu Ala Asn Pro Pro Pro Gln Glu Phe Trp Thr Leu Asp Lys Met 565
570 575

Leu Thr Ser Pro Ser Pro Glu Gln Ser Gly Phe Ser Ser Leu Tyr Lys 580
585 590

Leu Leu Leu Glu Val Leu Pro Gln Lys Cys Gly Ser Thr Glu Gly Glu 595
600 605

Phe Ile Tyr Thr Val Glu Arg Met Leu Lys Asp Cys Pro Ser Ser Lys 610
615 620

Gln Ala Met Ala Leu Leu Ala Lys Ile Lys Val Pro Ser Ser Lys Ala 625
630 635 640

Pro Ser Val Thr Leu Asn Glu Cys Phe Pro Thr Asp Val Pro Val Asn 645
650 655

Ser Glu Leu Ile Ser Trp Glu Glu Pro Lys Asp Pro Gly Ala Ala Val 660
665 670

Val Leu Cys Pro Ser Asp Ala Lys Glu Ser Lys Glu Thr Ala Pro Glu 675
680 685

Glu Ala Gln Ala Arg Asn Arg Lys Val Leu His Pro Val Val Leu Thr 690
695 700

Glu Glu Leu Ser Glu Gln Gln Val Gln Val Val Glu Gly Asp Gln Asp 705
710 715 720

Met Pro Leu Asp Leu Thr Trp Pro Thr Leu Thr Ala Thr Ala Thr Pro
730 735 725

Val Arg Gly Pro Val Pro Asp Asn Leu Ser Ser Gly Ile Gly Ala Gln
745 750 740

Pro Ala Thr Val Gln Glu Leu Ile Leu Ala Arg Pro Ala Pro Arg Leu
760 765 755

Val Glu Arg Cys Gly Thr Glu Ser Asn Gly Ser Ser Ser Phe Leu Asp
775 780 770

Leu Pro Asp Val Gln Thr Ser Asp Gln Pro Leu Asp Leu Ser Leu Ala
790 795 800 785

Ala Trp Pro Val Arg Ala Thr Ala Ser Asp Pro Gly Trp Ile His Gly
810 815 805

Arg Arg Glu Pro Val Phe Val Lys Pro Arg Gly Val Phe Ser Asp Gly
825 830 820

Glu Ser Ala Leu Gln Phe Gly Glu Leu Ser Glu Ala Ser Ser Val Val
840 845 835

Asp Asp Arg Thr Lys Glu Ala Pro Val Val Asp Ala Pro Ile Asp Leu
855 860 850

Thr Thr Ser Asn Glu Thr Leu Ser Gly Ser Asp Pro Phe Glu Phe Ala
870 875 880 865

Lys Phe Arg Arg Pro Arg Phe Ser Ala Gln Ala Leu Ile Asp Arg Gly
890 895 885

Gly Pro Leu Ala Asp Val His Ala Lys Ile Lys Ser Arg Val Tyr Glu
905 910 900

Gln Cys Leu Gln Ala Cys Glu Pro Gly Ser Arg Ala Thr Pro Ala Thr
920 925 915

Lys Lys Trp Leu Asp Lys Met Trp Asp Arg Val Asp Met Lys Thr Trp 930
935 940

Arg Cys Thr Ser Gln Phe Gln Ala Gly His Ile Leu Glu Ser Leu Lys 945
950 955 960

Phe Leu Pro Asp Met Ile Gln Asp Thr Pro Pro Pro Val Pro Arg Lys 965
970 975

Asn Arg Ala Gly Asp Ser Ala Gly Leu Lys Gln Leu Val Ala Gln Trp 980
985 990

Asp Arg Lys Leu Ser Val Thr Pro Pro Thr Lys Pro Val Gly Pro Val 995
1000 1005

Leu Asp Gln Thr Val Pro Leu Pro Met Asp Ile Gln Gln Glu Asp 1010
1015 1020

Ala Ile Ser Ala Asp Lys Pro Pro His Ser Gln Asn Pro Ser Ser 1025
1030 1035

Gln Val Asp Val Gly Gly Gly Trp Lys Ser Phe Met Leu Ser Gly 1040
1045 1050

Thr Arg Phe Ala Gly Ser Val Ser Gln Arg Leu Thr Thr Trp Val 1055
1060 1065

Phe Glu Val Leu Ser His Leu Pro Ala Phe Met Leu Thr Leu Phe 1070
1075 1080

Ser Pro Arg Gly Ser Met Ala Pro Gly Asp Trp Leu Phe Ala Gly 1085
1090 1095

Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Leu Cys Arg Ser Tyr Pro Ile Leu 1100
1105 1110

Gly Cys Leu Pro Leu Leu Gly Val Phe Ser Gly Ser Val Arg Cys 1115
1120 1125

Val Arg Leu Gly Val Phe Gly Ser Trp Met Ala Phe Ala Val Phe 1130
1135 1140

Leu Phe Ser Thr Pro Pro Asp Pro Val Gly Ser Ser Cys Asp His 1145
1150 1155

Asp Ser Pro Glu Cys His Ala Glu Leu Leu Ala Leu Glu Gln Arg 1160
1165 1170

Gln Leu Trp Glu Pro Val Arg Ser Leu Val Val Gly Pro Ser Gly 1175
1180 1185

Leu Leu Cys Val Ile Leu Gly Lys Leu Leu Gly Gly Ser Arg Cys 1190
1195 1200

Leu Trp Phe Val Leu Leu Arg Ile Cys Met Leu Ala Asp Leu Ala 1205
1210 1215

Ile Ser Leu Ile Tyr Val Val Ser Gln Gly Arg Cys His Lys Cys 1220
1225 1230

Trp Gly Lys Cys Ile Arg Thr Ala Pro Ala Glu Val Thr Leu Asn 1235
1240 1245

Val Phe Pro Phe Ser Arg Ala Thr Arg Ser Ser Leu Val Ser Leu 1250
1255 1260

Cys Asp Arg Phe Gln Ala Pro Lys Gly Val Asp Pro Val His Leu 1265
1270 1275

Ala Thr Gly Trp Arg Gly Cys Trp Cys Gly Glu Ser Pro Ile His 1280
1285 1290

Gln Ser His Gln Lys Pro Ile Ala Tyr Ala Asn Leu Asp Glu Lys 1295
1300 1305

Lys Ile Ser Ala Gln Thr Val Ile Ala Val Pro Tyr Asp Pro Ser 1310
1315 1320

Gln Ala Ile Lys Cys Leu Lys Val Leu Gln Ala Gly Gly Ala Ile 1325
1330 1335

Val Asp Gln Pro Thr Pro Glu Val Val Arg Val Ser Glu Ile Pro 1340
1345 1350

Phe Ser Ala Pro Phe Phe Pro Lys Val Pro Val Asn Pro Asp Cys 1355
1360 1365

Arg Val Val Val Asp Ser Asp Thr Phe Val Ala Ala Val Arg Cys 1370
1375 1380

Gly Tyr Ser Thr Ala Gln Leu Val Leu Gly Arg Gly Asn Phe Ala 1385
1390 1395

Lys Leu Asn Gln Thr Pro Leu Arg Asn Ser Val Pro Thr Lys Thr 1400
1405 1410

Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Thr Leu Ala Val Ala Gln Val Ser Val 1415
1420 1425

Trp Thr Leu Val His Phe Ile Leu Gly Leu Trp Leu Thr Ser Pro 1430
1435 1440

Gln Val Cys Gly Arg Gly Thr Ser Asp Pro Trp Cys Ser Asn Pro 1445
1450 1455

Phe Ser Tyr Pro Thr Tyr Gly Pro Gly Val Val Cys Ser Ser Arg 1460
1465 1470

Leu Cys Val Ser Ala Asp Gly Val Thr Leu Pro Leu Phe Ser Ala 1475
1480 1485

Val Ala His Leu Ser Gly Arg Glu Val Gly Ile Phe Ile Leu Val 1490

1495 1500

Leu Ala Ser Leu Gly Ala Leu Ala His Arg Leu Ala Leu Lys Ala 1505
1510 1515

Asp Met Ser Met Val Phe Leu Ala Phe Cys Ala Tyr Ala Trp Pro 1520
1525 1530

Met Ser Ser Trp Leu Ile Cys Phe Phe Pro Met Leu Leu Arg Trp 1535
1540 1545

Val Thr Leu His Pro Leu Thr Met Leu Trp Val His Ser Phe Leu 1550
1555 1560

Val Phe Cys Leu Pro Ala Ala Gly Val Leu Ser Leu Gly Ile Thr 1565
1570 1575

Gly Leu Leu Trp Ala Val Gly Arg Phe Thr Gln Val Ala Gly Ile 1580
1585 1590

Ile Thr Pro Tyr Asp Ile His Gln Tyr Thr Ser Gly Pro Arg Gly 1595
1600 1605

Ala Ala Ala Val Ala Thr Ala Pro Glu Gly Thr Tyr Met Ala Ala 1610
1615 1620

Val Arg Arg Ala Ala Leu Thr Gly Arg Thr Leu Ile Phe Thr Pro 1625
1630 1635

Ser Ala Val Gly Ser Leu Leu Glu Gly Ala Phe Arg Thr Gln Lys 1640
1645 1650

Pro Cys Leu Asn Thr Val Asn Val Val Gly Ser Ser Leu Gly Ser 1655
1660 1665

Gly Gly Val Phe Thr Ile Asp Gly Arg Arg Val Ile Val Thr Ala 1670
1675 1680

```
Thr His  Val Leu Asn Gly Asn  Thr Ala Arg Val Thr  Gly Asp Ser     1685
    1690                1695

Tyr Asn  Arg Met His Thr Phe  Asn Thr Asn Gly Asp  Tyr Ala Trp     1700
    1705                1710

Ser His  Ala Asp Asp Trp Gln  Gly Val Ala Pro Met  Val Lys Ile     1715
    1720                1725

Ala Lys  Gly Tyr Arg Gly Arg  Ala Tyr Trp Gln Thr  Ser Thr Gly     1730
    1735                1740

Val Glu  Pro Gly Ile Met Gly  Glu Gly Phe Ala Phe  Cys Phe Thr     1745
    1750                1755

Asn Cys  Gly Asp Ser Gly Ser  Pro Val Ile Ser Glu  Ala Gly Asp     1760
    1765                1770

Leu Ile  Gly Val His Thr Gly  Ser Asn Lys Leu Gly  Ser Gly Leu     1775
    1780                1785

Val Thr  Thr Pro Glu Gly Glu  Thr Cys Ser Ile Lys  Glu Thr Arg     1790
    1795                1800

Leu Ser  Asp Leu Ser Arg His  Phe Ala Gly Pro Ser  Val Pro Leu     1805
    1810                1815

Gly Asp  Ile Lys Leu Ser Pro  Ala Ile Ile Pro Asp  Val Thr Thr     1820
    1825                1830

Ile Pro  Ser Asp Leu Ala Ser  Leu Leu Ala Ser Val  Pro Val Met     1835
    1840                1845

Glu Gly  Gly Leu Ser Thr Val  Gln Leu Leu Cys Val  Phe Phe Leu     1850
    1855                1860

Leu Trp  Arg Met Met Gly His  Ala Trp Thr Pro Ile  Val Ala Val     1865
    1870                1875
```

```
Gly Phe  Phe Leu Leu Asn Glu  Ile Leu Pro Ala Val  Leu Val Arg     1880
    1885                 1890

Ala Val  Phe Ser Phe Ala Leu  Phe Val Leu Ala Trp  Ala Thr Pro     1895
    1900                 1905

Trp Ser  Ala Gln Val Leu Met  Ile Arg Leu Leu Thr  Ala Ala Leu     1910
    1915                 1920

Asn Arg  Asn Arg Leu Ser Leu  Ala Phe Tyr Ala Leu  Gly Gly Val     1925
    1930                 1935

Val Gly  Leu Ala Thr Glu Ile  Gly Thr Phe Ala Gly  Gly Trp Pro     1940
    1945                 1950

Glu Leu  Ser Gln Ala Leu Ser  Thr Tyr Cys Phe Leu  Pro Arg Phe     1955
    1960                 1965

Leu Ala  Val Thr Ser Tyr Val  Pro Thr Ile Ile Ile  Gly Gly Leu     1970
    1975                 1980

His Ala  Leu Gly Val Ile Leu  Trp Leu Phe Lys Tyr  Arg Cys Leu     1985
    1990                 1995

His Asn  Met Leu Val Gly Asp  Gly Ser Phe Ser Ser  Ala Phe Phe     2000
    2005                 2010

Leu Arg  Tyr Phe Ala Glu Gly  Asn Leu Arg Lys Gly  Val Ser Gln     2015
    2020                 2025

Ser Cys  Gly Met Asn Asn Glu  Ser Leu Thr Ala Ala  Leu Ala Cys     2030
    2035                 2040

Lys Leu  Ser Gln Ala Asp Leu  Asp Phe Leu Ser Ser  Leu Thr Asn     2045
    2050                 2055
```

```
Phe Lys  Cys Phe Val Ser Ala  Ser Asn Met Lys Asn  Ala Ala Gly     2060
    2065                 2070

Gln Tyr  Ile Glu Ala Ala Tyr  Ala Arg Ala Leu Arg  Gln Glu Leu     2075
    2080                 2085

Ala Ser  Leu Val Gln Val Asp  Lys Met Lys Gly Val  Leu Ala Lys     2090
    2095                 2100

Leu Glu  Ala Phe Ala Glu Thr  Ala Thr Pro Ser Leu  Asp Thr Gly     2105
    2110                 2115

Asp Val  Ile Val Leu Leu Gly  Gln His Pro His Gly  Ser Ile Leu     2120
    2125                 2130

Asp Ile  Asn Val Gly Gly Glu  Arg Lys Thr Val Ser  Val Gln Glu     2135
    2140                 2145

Thr Arg  Cys Leu Gly Gly Ser  Lys Phe Ser Val Cys  Thr Val Val     2150
    2155                 2160

Ser Asn  Thr Pro Val Asp Thr  Leu Thr Gly Ile Pro  Leu Gln Thr     2165
    2170                 2175

Pro Thr  Pro Leu Phe Glu Asn  Gly Pro Arg His Arg  Ser Glu Asp     2180
    2185                 2190

Asp Asp  Leu Lys Val Glu Arg  Met Lys Lys His Cys  Val Ser Leu     2195
    2200                 2205

Gly Phe  His Lys Ile Asn Gly  Lys Val Tyr Cys Lys  Ile Trp Asp     2210
    2215                 2220

Lys Ser  Asn Gly Asp Thr Phe  Tyr Thr Asp Asp Ser  Arg Tyr Thr     2225
    2230                 2235

Gln Asp  His Ala Phe Gln Asp  Arg Ser Thr Asp Tyr  Arg Asp Arg     2240
    2245                 2250
```

Asp Tyr Glu Gly Val Gln Thr Ala Pro Gln Gln Gly Phe Asp Pro 2255
2260 2265

Lys Ser Glu Ala Pro Val Gly Thr Val Val Ile Gly Gly Ile Thr 2270
2275 2280

Tyr Asn Arg His Leu Val Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Pro Lys 2285
2290 2295

Pro Asp Asn Cys Leu Glu Ala Ala Arg Leu Ser Leu Glu Gln Ala 2300
2305 2310

Leu Ala Gly Met Gly Gln Thr Cys Asp Leu Thr Ala Thr Glu Val 2315
2320 2325

Glu Lys Leu Lys Arg Ile Ile Ser Gln Leu Gln Gly Leu Thr Thr 2330
2335 2340

Glu Gln Ala Leu Asn Cys 2345

<210> 12
<211> 1463
<212> PRT
<213> Virus del Síndrome Reproductor Respiratorio Porcino

<400> 12

Thr Gly Phe Lys Leu Leu Ala Ala Ser Gly Leu Thr Arg Cys Gly Arg 1 5
10 15

Gly Gly Leu Val Val Thr Glu Thr Ala Val Lys Ile Val Lys Tyr His 20
25 30

Ser Arg Thr Phe Thr Leu Gly Ser Leu Asp Leu Lys Val Thr Ser Glu 35
40 45

Val Glu Val Lys Lys Ser Thr Glu Gln Gly His Ala Val Val Ala Asn 50
55 60

Leu Cys Ser Gly Val Val Leu Met Arg Pro His Pro Pro Ser Leu Val 65
70 75 80

Asp Val Leu Leu Lys Pro Gly Leu Asp Thr Thr Pro Gly Ile Gln Pro
85 90 95

Gly His Gly Ala Gly Asn Met Gly Val Asn Gly Ser Ile Trp Asp Phe
100 105 110

Glu Thr Ala Pro Thr Lys Val Glu Leu Glu Leu Ser Lys Gln Ile Ile
115 120 125

Gln Ala Cys Glu Val Arg Arg Gly Asp Ala Pro Asn Leu Gln Leu Pro
130 135 140

Tyr Lys Leu Tyr Pro Val Arg Gly Asp Pro Glu Arg Arg Lys Gly Arg 145
150 155 160

Leu Val Asn Thr Arg Phe Gly Asp Leu Pro Tyr Lys Thr Pro Gln Asp
165 170 175

Thr Lys Ser Ala Ile His Ala Ala Cys Cys Leu His Pro Asn Gly Val
180 185 190

Leu Val Ser Asp Gly Lys Ser Thr Leu Gly Thr Thr Leu Gln His Gly
195 200 205

Phe Glu Leu Tyr Val Pro Thr Val Pro Tyr Ser Val Met Glu Tyr Leu
210 215 220

Asp Ser Arg Pro Asp Thr Pro Phe Met Cys Thr Lys His Gly Thr Ser 225
230 235 240

Lys Ala Ala Ala Glu Asp Leu Gln Lys Tyr Asp Leu Ser Thr Gln Gly
245 250 255

Phe Val Leu Pro Gly Val Leu Arg Leu Val Arg Arg Phe Ile Phe Ser
260 265 270

His Val Gly Lys Ala Pro Pro Leu Phe Leu Pro Ser Thr Tyr Pro Ala
280 285

Lys Asn Ser Met Ala Gly Val Asn Gly Gln Arg Phe Pro Thr Lys Asp
295 300

Val Gln Ser Ile Pro Glu Ile Asp Glu Met Cys Ala Arg Ala Val Lys
310 315 320

Glu Asn Trp Gln Thr Val Thr Pro Cys Thr Leu Lys Lys Gln Tyr Cys
330 335

Ser Lys Pro Lys Thr Arg Thr Ile Leu Gly Thr Asn Asn Phe Ile Ala
345 350

Leu Ala His Arg Ser Ala Leu Ser Gly Val Thr Gln Ala Phe Met Lys
360 365

Lys Ala Trp Lys Ser Pro Ile Ala Leu Gly Lys Asn Lys Phe Lys Glu
375 380

Leu His Cys Thr Val Ala Gly Arg Cys Leu Glu Ala Asp Leu Ala Ser
390 395 400

Cys Asp Arg Ser Thr Pro Ala Ile Val Arg Trp Phe Val Ala Asn Leu
410 415

Leu Tyr Glu Leu Ala Gly Cys Glu Glu Tyr Leu Pro Ser Tyr Val Leu
425 430

Asn Cys Cys His Asp Leu Val Ala Thr Gln Asp Gly Ala Phe Thr Lys
440 445

Arg Gly Gly Leu Ser Ser Gly Asp Pro Val Thr Ser Val Ser Asn Thr
455 460

Val Tyr Ser Leu Ile Ile Tyr Ala Gln His Met Val Leu Ser Ala Leu
465

470 475 480

Lys Met Gly His Glu Ile Gly Leu Lys Phe Leu Glu Glu Gln Leu Lys 485
490 495

Phe Glu Asp Leu Leu Glu Ile Gln Pro Met Leu Val Tyr Ser Asp Asp 500
505 510

Leu Val Leu Tyr Ala Glu Arg Pro Thr Phe Pro Asn Tyr His Trp Trp 515
520 525

Val Glu His Leu Asp Leu Met Leu Gly Phe Lys Thr Asp Pro Lys Lys 530
535 540

Thr Val Ile Thr Asp Lys Pro Ser Phe Leu Gly Cys Arg Ile Glu Ala 545
550 555 560

Gly Arg Gln Leu Val Pro Asn Arg Asp Arg Ile Leu Ala Ala Leu Ala 565
570 575

Tyr His Met Lys Ala Gln Asn Ala Ser Glu Tyr Tyr Ala Ser Ala Ala 580
585 590

Ala Ile Leu Met Asp Ser Cys Ala Cys Ile Asp His Asp Pro Glu Trp 595
600 605

Tyr Glu Asp Leu Ile Cys Gly Ile Ala Arg Cys Ala Arg Gln Asp Gly 610
615 620

Tyr Arg Phe Pro Gly Pro Ala Phe Phe Met Ser Met Trp Glu Lys Leu 625
630 635 640

Lys Ser His Asn Glu Gly Lys Lys Cys Arg His Cys Gly Ile Cys Asp 645
650 655

Ala Lys Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Cys Gly Leu Asp Leu Cys Leu Phe 660
665 670

His Ser His Phe His Gln His Cys Pro Val Thr Leu Ser Cys Gly His
680 685 675

His Ala Gly Ser Lys Glu Cys Ser Gln Cys Gln Ser Pro Val Gly Ala
695 700 690

Gly Lys Ser Pro Leu Asp Ala Val Leu Lys Gln Ile Pro Tyr Lys Pro
710 715 720 705

Pro Arg Thr Ile Ile Met Lys Val Asp Asn Lys Thr Thr Thr Leu Asp
730 735 725

Pro Gly Arg Tyr Gln Ser Arg Arg Gly Leu Val Ala Val Lys Arg Gly
745 750 740

Ile Ala Gly Asn Glu Val Asp Leu Ser Asp Gly Asp Tyr Gln Val Val
760 765 755

Pro Leu Leu Pro Thr Cys Lys Asp Ile Asn Met Val Lys Val Ala Cys
775 780 770

Asn Val Leu Leu Ser Lys Phe Ile Val Gly Pro Pro Gly Ser Gly Lys
790 795 800 785

Thr Thr Trp Leu Leu Asn Gln Val Gln Asp Asp Asp Val Ile Tyr Thr
810 815 805

Pro Thr His Gln Thr Met Phe Asp Ile Val Ser Ala Leu Lys Val Cys
825 830 820

Arg Tyr Ser Ile Pro Gly Ala Ser Gly Leu Pro Phe Pro Pro Pro Ala
840 845 835

Arg Ser Gly Pro Trp Val Arg Leu Ile Ala Ser Gly His Val Pro Gly
855 860 850

Arg Val Ser Tyr Leu Asp Glu Ala Gly Tyr Cys Asn His Leu Asp Ile
870 875 880 865

Leu Arg Leu Leu Ser Lys Thr Pro Leu Val Cys Leu Gly Asp Leu Gln 885
890 895

Gln Leu His Pro Val Gly Phe Asp Ser Tyr Cys Tyr Val Phe Asp Gln 900
905 910

Met Pro Gln Lys Gln Leu Thr Thr Ile Tyr Arg Phe Gly Pro Asn Ile 915
920 925

Cys Ala Ala Ile Gln Pro Cys Tyr Arg Glu Lys Leu Glu Ser Lys Ala 930
935 940

Arg Asn Thr Arg Val Val Phe Thr Thr Arg Pro Val Ala Phe Gly Gln 945
950 955 960

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

Asp Ser Ser Gln Gly Ala Thr Phe Asp Ile Val Thr Leu His Leu Pro 980
985 990

Ser Pro Lys Ser Leu Asn Lys Ser Arg Ala Leu Val Ala Ile Thr Arg 995
1000 1005

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

Glu Phe Phe Asn Leu Thr Pro Glu Arg Thr Asp Cys Asn Leu Ala 1025
1030 1035

Phe Ser Arg Gly Asp Glu Leu Val Val Leu Asn Val Asp Asn Ala 1040
1045 1050

Val Thr Thr Val Ala Lys Ala Leu Glu Thr Gly Ser Pro Arg Phe 1055
1060 1065

Arg Val Ser Asp Pro Arg Cys Lys Ser Leu Leu Ala Ala Cys Ser 1070
1075 1080

Ala Ser Leu Glu Gly Ser Cys Met Pro Leu Pro Gln Val Ala His 1085
1090 1095

Asn Leu Gly Phe Tyr Phe Ser Pro Asp Ser Pro Ala Phe Ala Pro 1100
1105 1110

Leu Pro Lys Glu Leu Ala Pro His Trp Pro Val Val Thr His Gln 1115
1120 1125

Asn Asn Arg Ala Trp Pro Asp Arg Leu Val Ala Ser Met Arg Pro 1130
1135 1140

Ile Asp Ala Arg Tyr Ser Lys Pro Met Val Gly Ala Gly Tyr Val 1145
1150 1155

Val Gly Pro Ser Ile Phe Leu Gly Thr Pro Gly Val Val Ser Tyr 1160
1165 1170

Tyr Leu Thr Leu Tyr Ile Gly Gly Glu Pro Gln Ala Leu Pro Glu 1175
1180 1185

Thr Leu Val Ser Thr Gly Arg Ile Ala Thr Asp Cys Arg Glu Tyr 1190
1195 1200

Leu Asp Ala Ala Glu Glu Glu Ala Ala Arg Glu Leu Pro His Ala 1205
1210 1215

Phe Ile Gly Asp Val Lys Gly Thr Thr Val Gly Gly Cys His His 1220
1225 1230

Ile Thr Ser Lys Tyr Leu Pro Arg Ser Leu Pro Lys Asp Ser Val 1235
1240 1245

Ala Val Val Gly Val Ser Ser Pro Gly Arg Ala Ala Lys Ala Val 1250
1255 1260

Cys Thr Leu Thr Asp Val Tyr Leu Pro Glu Leu Arg Pro Tyr Leu 1265
1270 1275

Gln Pro Glu Thr Ala Ser Lys Cys Trp Lys Leu Lys Leu Asp Phe 1280
1285 1290

Arg Asp Val Arg Leu Met Val Trp Lys Gly Ala Thr Ala Tyr Phe 1295
1300 1305

Gln Leu Glu Gly Leu Thr Trp Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Arg 1310
1315 1320

Phe Ile Gln Leu Pro Lys Asp Ala Val Val Tyr Ile Asp Pro Cys 1325
1330 1335

Ile Gly Pro Ala Thr Ala Asn Arg Lys Val Val Arg Thr Thr Asp 1340
1345 1350

Trp Arg Ala Asp Leu Ala Val Thr Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Gln 1355
1360 1365

Val Ile Leu Thr Thr Ala Trp Phe Glu Asp Leu Gly Pro Gln Trp 1370
1375 1380

Lys Ile Leu Gly Leu Gln Pro Phe Arg Arg Thr Phe Gly Phe Glu 1385
1390 1395

Asn Thr Glu Asp Trp Ala Ile Leu Ala Arg Arg Met Asn Asp Gly 1400
1405 1410

Lys Asp Tyr Thr Asp Tyr Asn Trp His Cys Val Arg Glu Arg Pro 1415
1420 1425

His Ala Ile Tyr Gly Arg Ala Arg Asp His Thr Tyr His Phe Ala 1430
1435 1440

Leu Gly Thr Glu Leu Gln Val Glu Leu Gly Arg Pro Arg Leu Pro 1445

1450 1455

Pro Glu Gln Val Pro 1460

<210> 13
<211> 249
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ORF 2 DE CEPA PRRSV PARENTAL 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE NUCLEÓTIDOS 11611..12360

<400> 13

Met Gln Trp Val His Cys Gly Val Lys Ser Val Ser Cys Ser Trp Met 1 5 10 15

Pro Ser Leu Ser Ser Leu Leu Val Trp Leu Thr Leu Ser Ser Phe Ser 20 25 30

Pro Tyr Cys Leu Gly Ser Leu Leu Gln Ala Gly Tyr Trp Ser Ser Phe 35 40 45

Ser Glu Trp Phe Ala Pro Arg Phe Ser Val Arg Ala Leu Pro Phe Thr 50 55 60

Leu Pro Asn Tyr Arg Arg Ser Tyr Glu Gly Leu Leu Pro Asn Cys Arg 65 70 75 80

Pro Asp Val Pro Gln Phe Ala Val Lys His Pro Leu Gly Ile Leu Trp 85 90 95

His Met Arg Val Ser His Leu Ile Asp Glu Met Val Ser Arg Arg Ile 100 105 110

Tyr Arg Thr Met Glu His Ser Gly Gln Ala Ala Trp Lys Gln Val Val 115 120 125

Ser Glu Ala Thr Leu Thr Lys Leu Ser Arg Leu Asp Val Val Thr His 130 135 140

Phe Gln His Leu Ala Ala Val Glu Ala Asp Ser Cys Arg Phe Leu Ser 145
150 155 160

Ser Arg Leu Ala Met Leu Lys Asn Leu Ala Val Gly Asn Val Ser Leu 165
170 175

Glu Tyr Asn Thr Thr Leu Asp Arg Val Glu Leu Ile Phe Pro Thr Pro 180
185 190

Gly Thr Arg Pro Lys Leu Thr Asp Phe Arg Gln Trp Leu Ile Ser Val 195
200 205

His Ala Ser Ile Phe Ser Ser Val Ala Ser Ser Val Thr Leu Phe Thr 210
215 220

Val Leu Trp Leu Arg Ile Pro Ala Leu Arg Tyr Val Phe Gly Phe His 225
230 235 240

Trp Pro Thr Ala Thr His His Ser Asn 245

<210> 14
<211> 265
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ORF 3 DE CEPA PRRSV PARENTAL 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE NUCLEÓTIDOS 12219..13016

<400> 14

Met Ala Tyr Gln Arg Ala Arg Phe His Leu Leu Leu Cys Gly Phe Val 1 5
10 15

Cys Tyr Leu Val His Ser Ala Leu Ala Ser Asn Ser Ser Ser Thr Leu 20
25 30

Cys Phe Trp Phe Pro Leu Ala His Gly Asn Thr Ser Phe Glu Leu Thr 35
40 45

Ile Asn Tyr Thr Ile Cys Lys Pro Cys Pro Thr Ser Gln Ala Ala Gln 50
55 60

Gln Arg Leu Glu Pro Gly Arg Asn Val Trp Cys Lys Ile Gly His Asp 65
70 75 80

Arg Cys Glu Glu Arg Asp His Asp Glu Leu Ser Met Ser Ile Pro Ser 85
90 95

Gly Tyr Asp Asn Leu Lys Leu Glu Gly Tyr Tyr Ala Trp Leu Ala Phe 100
105 110

Leu Ser Phe Ser Tyr Ala Ala Gln Phe His Pro Glu Leu Phe Gly Ile 115
120 125

Gly Asn Val Ser Arg Val Phe Val Asp Lys Arg His Gln Phe Ile Cys 130
135 140

Ala Glu His Asp Gly Gln Asn Ser Thr Ile Ser Ala Arg His Asn Ile 145
150 155 160

Ser Ala Ser Tyr Ala Val Tyr Tyr His His Gln Ile Asp Gly Gly Asn 165
170 175

Trp Phe His Leu Glu Trp Leu Arg Pro Phe Phe Ser Ser Trp Leu Val 180
185 190

Leu Asn Ile Ser Trp Phe Leu Arg Arg Ser Pro Ala Ser Pro Ala Ser 195
200 205

Arg Arg Ile Tyr Gln Ile Leu Arg Pro Thr Arg Pro Arg Leu Pro Val 210
215 220

Ser Trp Ser Phe Arg Thr Ser Ile Val Ser Asn Leu Thr Gly Pro Gln 225
230 235 240

Gln Arg Lys Val Pro Leu Pro Ser Gly Gly Arg Pro Asn Val Val Lys 245
250 255

Pro Ser Ala Phe Pro Ser Thr Ser Arg 260 265

<210> 15
<211> 183
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ORF 4 DE CEPA PRRSV PARENTAL STRAIN 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE NUCLEOTIDOS 12761..13312

<400> 15

Met Ala Ala Thr Ile Leu Phe Leu Leu Ala Gly Ala Gln His Leu Met 1 5
10 15

Val Ser Glu Ala Phe Ala Cys Lys Pro Cys Phe Ser Thr His Leu Ser 20
25 30

Asp Ile Lys Thr Asn Thr Thr Ala Ala Ala Gly Phe Met Val Leu Gln 35
40 45

Asn Ile Asn Cys Phe Gln Ser His Arg Ala Ser Thr Ala Gln Gly Thr 50
55 60

Thr Pro Leu Arg Arg Ser Ser Gln Cys Arg Glu Ala Val Gly Ile Pro 65
70 75 80

Gln Tyr Ile Thr Ile Thr Ala Asn Val Thr Asp Glu Ser Tyr Leu Tyr 85
90 95

Asn Ala Asp Leu Leu Met Leu Ser Ala Cys Leu Phe Tyr Ala Ser Glu 100
105 110

Met Ser Glu Lys Gly Phe Lys Val Ile Phe Gly Asn Ile Ser Gly Val 115
120 125

Val Ser Ala Cys Val Asn Phe Thr Asp Tyr Val Ala His Val Thr Gln 130
135 140

His Thr Gln Gln His His Leu Val Ile Asp His Ile Arg Leu Leu His 145
150 155 160

Phe Leu Thr Pro Ser Thr Met Arg Trp Ala Thr Thr Ile Ala Cys Leu 165
170 175

Phe Ala Ile Leu Leu Ala Val 180

<210> 16
<211> 201
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ORF 5 DE CEPA PRRSV PARENTAL 94881 CODIFICADO POR LA SECUENCIA DE SEQ ID NO:10 ENTRE NUCLEÓTIDOS 13309..13914

<400> 16

Met Lys Cys Ser Cys Lys Leu Gly His Phe Leu Thr Pro His Ser Cys 1 5
10 15

Phe Trp Trp Leu Phe Leu Leu Cys Thr Gly Leu Ser Trp Ser Phe Val 20
25 30

Asp Gly Asn Asp Asn Ser Ser Thr Ser Gln Tyr Ile Tyr Asn Leu Thr 35
40 45

Ile Cys Glu Leu Asn Gly Thr Glu Trp Leu Ser Gly His Phe Asp Trp 50
55 60

Ala Val Glu Thr Phe Val Leu Tyr Pro Val Ala Thr His Ile Ile Ser 65
70 75 80

Leu Gly Phe Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Ala Leu Gly Leu Gly 85
90 95

Ala Val Ser Ala Thr Gly Phe Ile Gly Glu Arg Tyr Val Leu Ser Ser 100
105 110

Met Tyr Gly Val Cys Ala Phe Ala Ala Leu Val Cys Phe Val Ile Arg 115
120 125

Ala Ala Lys Asn Cys Met Ala Cys Arg Tyr Ala Arg Thr Arg Phe Thr 130

135 140

Asn Phe Ile Val Asp Asp Arg Gly Arg Ile His Arg Trp Lys Ser Ser 145
150 155 160

Ile Val Val Glu Lys Leu Gly Lys Ala Glu Val Gly Gly Asp Leu Val 165
170 175

Asn Ile Lys His Val Val Leu Glu Gly Val Lys Ala Gln Pro Leu Thr 180
185 190

Arg Thr Ser Ala Glu Gln Trp Glu Ala 195 200

<210> 17
<211> 173
<212> PRT
<213> Virus del Síndrome Reproductor Respiratorio Porcino

<400> 17

Met Gly Ser Leu Asp Asp Phe Cys Asn Asp Pro Thr Ala Ala Gln Lys 1 5
10 15

Leu Val Leu Ala Phe Ser Ile Thr Tyr Thr Pro Ile Met Ile Tyr Ala 20
25 30

Leu Lys Val Ser Arg Gly Arg Leu Leu Gly Leu Leu His Ile Leu Ile 35
40 45

Phe Leu Asn Cys Ser Phe Thr Phe Gly Tyr Met Thr Tyr Val His Phe 50
55 60

Gln Ser Thr Asn Arg Val Ala Leu Thr Leu Gly Ala Val Val Ala Leu 65
70 75 80

Leu Trp Gly Val Tyr Ser Leu Thr Glu Ser Trp Lys Phe Ile Thr Ser 85
90 95

Arg Cys Arg Leu Cys Cys Leu Gly Arg Arg Tyr Ile Leu Ala Pro Ala 100
105 110

His His Val Glu Ser Ala Ala Gly Leu His Ser Ile Pro Ala Ser Gly 115
120 125

Asn Arg Ala Tyr Ala Val Arg Lys Pro Gly Leu Thr Ser Val Asn Gly 130
135 140

Thr Leu Val Pro Gly Leu Arg Ser Leu Val Leu Gly Gly Lys Arg Ala 145
150 155 160

Val Lys Arg Gly Val Val Asn Leu Val Lys Tyr Gly Arg 165
170

<210> 18
<211> 128
<212> PRT
<213> Virus del Síndrome Reproductor Respiratorio Porcino

<400> 18

Met Ala Gly Lys Asn Gln Ser Gln Lys Lys Arg Arg Asn Ala Ala Pro 1 5
10 15

Met Gly Lys Gly Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Leu Leu Gly Thr 20
25 30

Met Ile Lys Ser Gln Arg Gln Gln Ser Arg Gly Gly Gln Ala Lys Lys 35
40 45

Lys Lys Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Ala Glu Asp Asp Ile 50
55 60

Arg His His Leu Thr Gln Ala Glu Arg Ser Leu Cys Leu Gln Ser Ile 65
70 75 80

Gln Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Ala Ser Leu Ser Ser Ser 85
90 95

Gly Lys Val Ser Phe Gln Val Glu Phe Met Leu Pro Val Ala His Thr 100
105 110

Val Arg Leu Ile Arg Val Thr Ser Thr Ser Ala Ser Gln Gly Ala Asn 115
120 125

<210> 19
<211> 7050
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Nucleótido que codifica ORF1A atenuado de PRRSV 94881

<400> 19
atgtctggga tgttctcccg gtgcatgtgc accccggctg cccgggtatt ttggaacgcc 60

ggccaagtct attgcacacg gtgtctcagt gcacggtctc ttctctctcc agaacttcag 120

gacacggacc tcggtgcagt tggcttgttt cacaagccta aagacaagct ccattggaaa 180

gttcccattg gtatccccca ggtggaatgt tctccatctg ggtgttgctg gctgtcaacc 240

atttttcctt tagcgcgcat gacctccggc aatcacaact tccttcaacg actcgtgaag 300

gttgctgatg tattgtaccg tgacggttgc ttaaccccta gacacctccg tgaactccaa 360

gtttacgagc gtggttgcaa ttggtatccg attacggggc ctgtgcctgg gatggctgtg 420

tacgcgaact ccatgcacgt gtccgaccaa ccgttccctg gtgccactca tgtgttaaca 480

aattcccctt tgcctcaacg ggcttgtcgg cagccgttct gtccgttcga agaggcccat 540

tctagcatat acaggtggga aaaatttgta atttttatgg attcctcctc cgacggtcga 600

tctcgcatga tgtggactcc ggaatccgat gactccacgg ctttggaagt tctgccgccc 660

gagctagaac accaggtcaa ggtccttgtt cggagctttc ccgcccatca ccttgtcgac 720

cttgccgatt gggagctcac tgagtcccct gataacggtt tttccttcag cacgtcacat 780

ccttgcggct accttgttcg ggacccggct gtatccgaag gcaagtgttg gctttcctgc 840

ttttgagcc agtcagccga agtgctcagt cgcgaggcgc atctggctac cgcctatggt 900

taccaaacca agtggggtgt gcctggcaag tacatccagc gcagacttca agttcacggt 960

ctccgtgctg tggtcgaccc tgatggtccc attcacgttg aagcattgtc ttgcccccag 1020

tcttggatca ggcacttgac cctgaatgat gatgtcaccc cgggattcgt tcgcctaatg 1080

tctcttcgca ttgtgccgaa cacagagcct accacacacc ggatctttcg ttttggagtg 1140

cacaagtggt atggtgccgc cggcaaacgg gcccgtggca agcgtgccgc caaaagtgag 1200

aaagactcgg cttccaccct caaggttgcc cgaccgactt ccaccagtgg aatcgtcacc 1260

tactccccac ctgcggacgg gtcttgtggt tggcatgccc ttgccgccat actgaaccgg 1320

atgattaata atgacttcac gtcccctctg cctcggtaca acaggccgga ggacgattgg 1380

gcttctgatg gtgaccttgc tcaggccatt caatgtttgc aactacctgc cgccatagct 1440

cggaaccgcg cctgccctaa cgccaaatac ctcataaaac tcaacggagt tcattgggag 1500

gtagaggtga ggcctggaat ggctcctcgc tccctctctc gtgagtgcgt tgttggcgtc 1560

tgctctgaag gctgtgtcgc gtcgccttac ccggaggacg ggttgcctaa acgtgcactt 1620

gaggccctgg cgtctgctta tagactgcct tcagactgtg tttgtgatgg tattattgac 1680

ttccttgcca atccacctcc ccaggagttc tggactcttg acaaaatgtt gacttccccg 1740

tcaccggagc agtccggctt ctctagtctg tataaattgt tgttagagat cttgccgcag 1800

aaatgcggat ccacagaagg ggaattcatc tatactgttg agaggatgtt gaaggattgt 1860

ccgagctcca aacaggccat ggccctcctt gcaaaaatta aggtcccatc ctcaaaggcc 1920

ccatccgtga ctctgaacga gtgcttcccc acggatgttc cagtcaactc tgagttaata 1980

tcttgggaag agcccaaaga ccctggcgct gctgttgtcc tatgtccatc ggatgcaaaa 2040

gaatctaagg aaacagcccc tgaagaagct caagcgagaa accgtaaggt ccttcaccct 2100

gtggtcctta ccgaggaact tagcgagcaa caggtgcagg tggttgaggg tgatcaggat 2160

atgccactgg atttgacttg gccaacctta accgctacgg cgacccctgt tagagggccg 2220

gtaccggaca atttgagctc tggcattggt gcccagcccg ctaccgttca agaactcatt 2280

ctggcgaggc ctgcaccccg tcttgttgag cgctgtggca cggagtcgaa cggcagcagt 2340

tcatttctgg atttgcctga cgtgcagacc tcggaccagc ctttagacct gtccctggcc 2400

gcgtggcctg taagggctac cgcgtctgac cccggttgga tccacggtag gcgtgagcct 2460

gtctttgtga agcctcgagg tgttttctct gatggcgagt cggcccttca gttcggagag 2520

ctttccgaag ccagttctgt cgtcgatgac cggacaaaag aagctccggt ggttgacgcc 2580

cccatcgatt tgacaacttc gaacgagacg ctctctgggt ctgacccctt tgaattcgcc 2640

aaattcaggc gcccgcgttt ctccgcgcaa gctttaatcg accgaggtgg tccgcttgcc 2700

gatgttcatg caaagataaa gagtcgggta tatgaacaat gccttcaagc ttgtgaacct 2760

ggtagtcgtg cgaccccagc caccaagaag tggctcgaca aaatgtggga cagggtggac 2820

atgaaaactt ggcgctgcac ctcgcagttc caagctggtc acattcttga gtccctcaaa 2880

ttcctccctg acatgattca agacacaccg cctcctgttc ccaggaagaa ccgagctggt 2940

gacagtgccg gcctgaagca actggtggcg cagtgggata ggaaatcgag tgtgacaccc 3000

cccacaaaac cggttggacc ggtgcttgac caggccgtcc ctctgcctat ggacatccag 3060

caaggagatg ccatctccgc tgacaagcca ccccattcgc aaaacccttc tagtcaagta 3120

gatgtgggtg gaggttggaa aagttttatg ctctccggca cccgtttcgc ggggtccgtt 3180

agtcagcgcc ttacgacatg ggtttttgag gttctctccc atctcccagc ttttatgctc 3240

acacttttct cgccacgggg ctctatggct ccaggtgatt ggctgtttgc aggtgctgtt 3300

ctacttgctc tcctgctctg ccgttcttac ccaatactcg gatgccttcc cttattgggt 3360

gtcttttctg gttctgtgcg gtgtgttcgt ttgggtgttt ttggttcttg gatggctttt 3420
gctgtatttt tattctcgac tccacccgac ccagtcggtt cttcttgtga ccacgattcg 3480
ccggagtgtc atgctgagct tttggctctt gagcagcgcc aactttggga acctgtgcgc 3540
agccttgtgg tcgggccatc gggcctctta tgcgtcattc ttggcaagtt actcggtggg 3600
tcacgttgtc tctggtttgt tctcctacgt atatgcatgc tcgcagattt ggcaatttct 3660
cttatttatg tggtgtccca agggcgttgt cacaagtgtt ggggaaagtg tataaggacg 3720
gctcctgcag aagtggccct taatgtgttt ccttttcgc gcgccacccg ctcatctctt 3780
gtgtccttgt gtgatcggtt ccaagcgcca aaaggagttg accccgtgca cttggcgaca 3840
ggctggcgcg ggtgctggtg tggtgagagc cctattcatc aatcacacca aaaaccgata 3900
gcttatgcca acttggatga aaagaagata tccgcccaga cggtgattgc tgtcccgtat 3960
gatcctagtc aggccattaa atgcctgaaa gttttgcagg caggaggggc tattgtggac 4020
cagcctacgc ccgaggtcgt ccgtgtgtct gagattccct tctcggcccc atttttccg 4080
aaggtcccag tcaacccaga ctgcagggtt gtggtagatt cggacacttt tgtggctgcg 4140
gtccgctgcg gttattcgac agcacaactg gtccttggtc ggggcaactt tgccaagcta 4200
aatcagaccc ccctcaggaa ctctgtcccc accaaaacaa ctggtggggc ctcatacacc 4260
cttgccgtgg cccaggtatc tgtgtggact cttgttcatt tcatcctcgg cctttggtta 4320
acgtcacctc aagtgtgtgg tcgagggacc tctgacccgt ggtgttcgaa ccctttttcg 4380
tatcctactt atggccccgg agttgtgtgt tcctctcgac tctgcgtgtc tgccgacgga 4440
gttaccctgc cattgttctc agccgttgcc catctttccg gtagagaggt ggggattttt 4500
attttggtgc ttgcctcctt gggcgcttta gcccaccgct tggctcttaa ggcagacatg 4560
tcaatggtct ttttggcgtt ttgtgcttac gcctggccca tgagctcctg gttaatttgc 4620
ttctttccta tgctcttgag gtgggtaacc cttcatcctc tcactatgct ttgggtgcac 4680
tcatttttgg tgttttgcct accagctgcc ggcgttctct cgctgggaat aaccggtctt 4740
ctttgggcag ttggccgttt cacccaggtt gccggaatta tcacacctta tgacatccac 4800
cagtatacct ccggaccacg tggtgcagct gctgtagcaa cggctccaga aggtacttac 4860
atggcggccg ttcggagagc cgctttgact ggacggactt tgatcttcac accatctgca 4920
gtcggatccc ttcttgaagg tgctttcaga actcaaaagc cctgccttaa caccgtgaat 4980
gtcgtaggct cttcccttgg ttctggagga gttttcacca ttgatggcag aagagtcatc 5040
gtcactgcca cccatgtgtt gaatggtaac acagccaggg tcactggtga ttcctacaac 5100
cgcatgcaca cgttcaatac taatggtgat tatgcctggt cccatgctga tgactggcaa 5160
ggcgttgccc ctatggttaa gatcgctaag gggtatcgcg gtcgtgccta ctggcaaacg 5220

tcaaccggag tcgaacctgg catcatgggg gaaggattcg ccttctgttt cactaactgt 5280

ggcgactcag ggtcacctgt catttcagaa gctggtgacc ttattggagt ccataccggt 5340

tcaaacaaac tcggttctgg tcttgtgaca acccctgaag gggagacctg ctccatcaag 5400

gaaactaggc tctctgacct ttctagacat tttgcaggtc caagcgtccc tcttggggac 5460

attaagttga gcccagccat catccctgat gtgacaacta ttccgagtga cttggcatcg 5520

ctccttgctt ctgtccccgt gatggaaggt ggcctctcaa ctgtccagct tttgtgcgtc 5580

tttttccttc tctggcgcat gatgggccat gcctggacac ccattgttgc cgtaggcttc 5640

tttttgctga atgaaattct cccagcagtc ttggtccgag ctgtgttctc ttttgcactc 5700

tttgtacttg catgggccac cccctggtcg gcacaagtgt tgatgattag actcctcacg 5760

gcggctctca accgcaacag gttgtccctg gcgttctacg cattcggagg tgtcgttggc 5820

ctggccacag aaatcgggac ttttgctggt ggatggcctg aactgtccca agccctctcg 5880

acatactgct tcctgcccag gttccttgct gtgactagtt atgtccccac catcatcatc 5940

ggtgggctcc atgccctcgg cgtaattttg tggttattca aataccgatg cctccacaac 6000

atgctggttg gtgatgggag tttctcaagc gctttcttcc tacggtattt tgctgagggt 6060

aatcttagga aaggcgtgtc gcagtcctgt ggcatgaata acgaatccct gacagctgct 6120

ttggcttgca agttgtcgca agctgacctt gatttttgt ccagtttaac gaacttcaag 6180

tgctttgtgt ccgcttcaaa catgaaaaat gcagctggcc aatacatcga ggcggcgtat 6240

gctagagctc tgcgtcagga gctggcctcc ttggttcagg ttgacaagat gaaaggagta 6300

ttggccaagc tcgaggcttt cgctgagacg gccactccgt cacttgacac aggggacgtg 6360

attgttctgc ttgggcaaca cccccatgga tccatcctcg acattaatgt ggggggtgaa 6420

aggaaaactg tgtctgtgca agaaacacga tgcctgggtg gttccaaatt cagtgtctgc 6480

actgtcgtgt ccaacacgcc cgtggatacc ttgaccggta tcccacttca gacgccaacc 6540

ccacttttg aaaatggccc gcgccatcgc agcgaggacg acgacctcaa agttgagaga 6600

atgaaaaaac actgtgtatc cctcggcttc cacaaaatca atggtaaagt ttactgcaaa 6660

atttgggaca agtctaacgg cgacaccttt tacacggatg attcccgata cactcaagac 6720

catgcttttc aggacaggtc aaccgactat agagacaggg attatgaagg tgtacagacc 6780

gccccccaac agggattcga tccaaagtcc gaagcccctg ttggcactgt tgtaatcggt 6840

ggcattacgt ataacaggca tctggtcaaa ggtaaggagg tcctagttcc caaacctgac 6900

aactgccttg aagctgccag actgtccctt gagcaagctc ttgctgggat gggccaaact 6960

tgtgacctta cagctaccga agtggagaaa ctaaagcgca tcattagtca actccaaggt 7020

ctgaccactg aacaggcttt aaactgctag 7050

<210> 20
<211> 4392
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Nucleótido que codifica ORF1B atenuado de PRRSV 94881

<400> 20
acaggcttta aactgctagc cgccagcggc ttgacccgct gtggccgcgg cggcctagtt 60

gtaactgaaa cggcggtaaa aatcgtaaaa taccacagca gaactttcac cttaggctct 120

ttagacctaa aagtcacctc cgaggtggag gtgaagaaat caactgagca ggggcacgct 180

gtcgtggcga acttatgttc cggtgtcgtc ttgatgaggc ctcacccacc gtcccttgtt 240

gacgttctcc tcaaacccgg acttgacaca acacccggca ttcaaccagg gcatggggcc 300

gggaatatgg gcgtgaacgg ttctatttgg gattttgaaa ctgcacccac aaaggtagaa 360

ctagagttgt ccaagcaaat aatccaagca tgtgaagtca ggcgcgggga cgcccctaac 420

ctccaactcc cctacaagct ttatcctgtc agggggggacc ccgagcggcg taaaggtcgc 480

cttgtcaaca ctaggtttgg agatttacct tacaaaactc cccaagacac caagtccgca 540

attcatgcgg cttgttgcct gcatcccaat ggggtcctcg tgtctgatgg caaatccacg 600

ctgggtacca ctcttcaaca tggtttcgag ctttatgtcc ccactgtacc ttatagtgtc 660

atggaatacc ttgattcacg ccctgacacc ccttttatgt gtactaaaca tggcacttcc 720

aaggctgctg cagaggacct ccaaaaatat gacctatcca ctcaagggtt tgtcttgcct 780

ggggtcctac gcctagtgcg caggttcatc tttagccatg ttggtaaggc gccaccactg 840

ttccttccat caacctaccc tgccaagaac tccatggcag gggtcaatgg ccagaggttc 900

ccaacaaagg atgtccagag catacctgaa attgatgaaa tgtgcgcccg tgccgtcaag 960

gaaaattggc agactgtgac accttgcacc ctcaaaaaac agtactgttc caaacctaaa 1020

actagaacca tcctaggtac caacaacttc atagccttgg ctcacaggtc agcactcagt 1080

ggtgtcaccc aggcgttcat gaagaaggcc tggaagtccc caattgcctt ggggaaaaac 1140

aagtttaagg aattgcattg cactgtcgcc ggcagatgcc ttgaggctga cctggcttcc 1200

tgcgatcgca gcacccccgc cattgtgagg tggtttgttg ccaacctcct gtatgaactt 1260

gcaggatgtg aagagtactt gcctagctac gtgctcaact gttgccatga ccttgtggca 1320

acgcaggatg gcgctttcac aaaacgcggt ggcctgtcgt ccggggaccc cgtcaccagt 1380

gtgtccaaca ccgtctactc actgataatt tacgcccagc acatggtgct ttcggccttg 1440

aagatgggtc atgaaattgg tctcaagttc cttgaggaac agctcaaatt tgaggacctt 1500

cttgaaatcc agcccatgtt agtgtattct gatgacctcg tcttgtatgc ggaaagaccc 1560

acttttccca actaccattg gtgggtcgag catcttgacc tgatgttggg ctttaaaacg 1620

gacccaaaga aaactgtcat aactgataaa cccagttttc tcggctgcag aattgaagca 1680

ggacggcagt tagtccccaa tcgcgaccgt attctggctg ctcttgcata tcatatgaag 1740

gcgcagaacg cctcagagta ttatgcgtcc gctgccgcaa ttctgatgga ttcgtgtgct 1800

tgcattgacc atgaccccga gtggtatgag gatcttatct gcggcatcgc ccggtgtgct 1860

cgccaggacg gttaccgttt tccaggcccg gcatttttca tgtccatgtg ggagaagctg 1920

aaaagtcata atgaagggaa gaaatgccgt cactgcggca tctgcgacgc caaagccgac 1980

tatgcgtccg cctgtggact tgatttgtgt ttgttccatt cacactttca tcaacactgc 2040

ccagtcactc tgagctgtgg ccaccatgcc ggttcaaagg aatgttcgca gtgtcagtca 2100

cctgtcgggg ctggcaaatc ccccccttgac gctgtgctga aacaaatccc gtacaaacct 2160

cctcgtacca ttatcatgaa ggtggacaac aaaacaacga cccttgaccc gggaagatat 2220

cagtcccgtc gaggtcttgt tgcagtcaaa agaggtattg caggtaatga ggttgatctt 2280

tctgatggag actaccaagt ggtgcctctt ttgccgactt gcaaagacat aaacatggtg 2340

aaggtggctt gcaacgtact actcagcaag tttatagtag ggccgccagg ttccggaaaa 2400

accacctggc tactgaacca agtccaggac gatgatgtca tttacacacc tactcatcag 2460

acaatgtttg acatagtcag tgctcttaaa gtttgcaggt attccatccc aggagcctca 2520

ggactccctt ttccaccacc tgccaggtcc gggccgtggg ttaggctcat cgccagcgga 2580

catgtccctg gccgagtgtc atatctcgat gaggcaggat attgcaatca tctagacatt 2640

ctaaggctgc tttccaaaac acccccttgtg tgtttgggtg accttcagca acttcacccg 2700

gtcggctttg attcctattg ttatgtgttc gatcagatgc ctcagaagca gctgaccacc 2760

atttatagat ttggccctaa catctgtgca gccatccagc cttgttacag ggagaaactt 2820

gaatccaagg ccaggaacac cagagtggtt ttcaccaccc ggcctgtggc ctttggtcag 2880

gtcctgacac cgtaccacaa agatcgtacc ggctctgcaa taactataga ttcatcccag 2940

ggggcgacct tcgacattgt gacattgcat ctaccatcgc caaagtccct aaacaaatcc 3000

cgagcacttg tagccatcac tcgggcaaga catgggttgt tcatttatga ccctcatgac 3060

caactccagg agtttttcaa cttaaccccc gagcgcactg attgtaacct tgcgttcagc 3120

cgtggggatg agctggttgt tttgaatgtg gataatgcgg tcacaactgt agcgaaggcc 3180

ctagagacag gttcaccccg atttcgagta tcggacccga ggtgcaagtc tctcttagcc 3240

gcttgttcgg ccagtctaga agggagctgc atgccactac cacaagtagc acataacctg 3300

gggttttact tttccccgga cagcccagct tttgcacccc tgccaaaaga gctggcgcca 3360

cattggccag tggtcaccca ccagaataat cgagcgtggc ctgatcgact tgtcgctagt 3420

atgcgcccaa ttgatgcccg ctacagcaag ccaatggtcg gtgcagggta tgtggtcggg 3480

ccatccattt ttcttggcac tcctggtgtg gtgtcatact atctcacatt atacatcggg 3540

ggcgagcctc aggccctgcc agaaacactc gtttcaacag gacgtatagc cacagattgt 3600

cgggaatatc tcgacgcggc tgaggaagag gcagcgagag aacttcccca cgcatttatt 3660

ggcgatgtca aaggcactac gatcgggggg tgtcaccaca ttacatcgaa atacctacct 3720

aggtccctgc ctaaagactc tgttgctgtg gttggggtga gttcgcccgg tagggctgct 3780

aaagccgtgt gcactctcac cgatgtgtac ctccccgaac tccgaccata tttgcaaccg 3840

gagacggcat caaaatgctg gaaacttaaa ctggatttca gggatgttcg actgatggtc 3900

tggaaaggcg ccacagccta tttccagttg gaagggctga catggtcagc gctgcccgat 3960

tatgctaggt tcattcagct acccaaggat gccgttgtgt acatcgatcc gtgtataggg 4020

ccggcaacag ccaatcgcaa ggttgtgcga accacagact ggcgggccga cctggcagtg 4080

acaccgtatg attacggtgc tcaggtcatt ttgacaacag cctggttcga ggaccttggg 4140

ccgcagtgga agattttggg gttgcagcct ttcagacgaa catttggctt tgagaacact 4200

gaagattggg caattctcgc acgccgtatg aatgacggca aagattacac tgactataat 4260

tggcattgtg tacgagaacg cccacacgca atttacgggc gcgcccgtga ccatacgtat 4320

cattttgccc ttggcactga actgcaagta gagctgggca gaccccggct gcctcctgag 4380

caagtgccgt ga 4392

<210> 21
<211> 750
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Nucleótido que codifica ORF2 atenuado de PRRSV 94881

<400> 21
atgcaatggg tttactgtgg agtaaaatca gtcagttgtt cgtggatgcc ttcactgagt 60

tccttgttag tgtggttgac attgtcatct ttctcgccat attgtttggg ttcactgttg 120

caggctggtt attggtcttc cttctcagag tggtttgctc cgcgtttctc cgttcgcgct 180

ctgccattca ctcttccgaa ctatcgaagg tcctatgagg gcttgctacc caactgcaga 240

ccggatgtcc cacaattcgc agttaagcac ccgttgggta tactttggca tatgcgagtc 300

tcccacctaa ttgacgaaat ggtctctcgc cgcatttacc ggaccatgga acattcgggt 360

caagcggcct ggaagcaggt tgttagtgaa gccactctca caaaactgtc aaggcttgac 420

gtagtcactc atttccaaca cctggccgca gtggaggctg attcttgccg cttccttagc 480

tcacgactcg cgatgctgaa aaaccttgcc gttggcaatg tgagcctgga gtacaacact 540

actttggacc gcgttgagct catctttccc acaccaggta cgaggcccaa gttgaccgat 600

tttaggcaat ggcttatcag cgtgcacgct tccatcttct cctctgtggc ttcgtctgtt 660

accttgttca cagtgctttg gcttcgaatt ccagctctac gctatgtttt tggtttccat 720

tggcccacgg caacacatca ttcgaactaa 750

<210> 22
<211> 798
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Nucleótido que codifica ORF3 atenuado de PRRSV 94881

<400> 22
atggcttatc agcgtgcacg cttccatctt ctcctctgtg gcttcgtctg ttaccttgtt 60

cacagtgctt tggcttcgaa ttccagctct acgctatgtt tttggtttcc attggcccac 120

ggcaacacat cattcgaact aactatcaat tacactatat gtaagccatg ccctaccagt 180

caagctgccc aacaaagact cgagcctggc cgtaacgtgt ggtgcaaaat agggcacgac 240

aggtgtgagg aacgtgacca tgatgagttg tcaatgtcca ttccgtccgg gtacgacaac 300

ctcaaacttg agggttatta tgcttggctg gctttttgt ccttttccta cgcggcccaa 360

ttccatccgg agctgttcgg aataggaaac gtgtcgcgcg tctttgtgga taagcgacac 420

cagttcattt gcgccgagca tgatggacaa aattcaacca tatctgccag acacaacatc 480

tccgcgtcgt atgcggtgta ttaccatcat caaatagacg ggggcaattg gtttcatttg 540

gaatggctgc gaccattctt ttcctcctgg ctggtgctca acatctcatg gtttctgagg 600

cgttcgcctg caagccctgc ttctcgacgc atctatcaga tattaagacc aacacgaccg 660

cggctgccgg tttcatggtc cttcagaaca tcaattgttt ccaatctcac agggcctcaa 720

cagcgcaagg taccactccc ctcaggaggt cgtcccaatg tcgtgaagcc gtcggcattc 780

cccagtacat cacgataa 798

<210> 23
<211> 552
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Nucleótido que codifica ORF4 atenuado de PRRSV 94881

<400> 23
atggctgcga ccattctttt cctcctggct ggtgctcaac atctcatggt ttctgaggcg 60

ttcgcctgca agccctgctt ctcgacgcat ctatcagata ttaagaccaa cacgaccgcg 120

gctgccggtt tcatggtcct tcagaacatc aattgtttcc aatctcacag ggcctcaaca 180

gcgcaaggta ccactcccct caggaggtcg tcccaatgtc gtgaagccgt cggcattccc 240

cagtacatca cgataacggc taatgtgacc gatgaatcgt atttgtacaa cgcggacttg 300

ctgatgcttt ccgcgtgcct tttctacgcc tcggaaatga gcgagaaagg cttcaaagtc 360

atctttggga atatttctgg cgttgtttcc gcttgtgtta atttcacaga ttatgtggcc 420

catgtgaccc aacacactca gcagcaccat ttggtaattg atcacattcg gttactacac 480

ttcttgacac cgtctacgat gaggtgggct acaaccattg cttgtttgct tgccattctt 540

ttggcggtat ga 552

<210> 24
<211> 606
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Nucleótido que codifica ORF5 atenuado de PRRSV 94881

<400> 24
atgaaatgtt cttgcaagtt ggggcatttc ttgactcctc actcttgctt ctggtggctt 60

tttttgctgt gtaccggctt gtcttggtcc tttgtcgatg gcaacgacga cagctcgaca 120

tcccaataca tatataattt gacgatatgc gagctgaatg ggaccgaatg gttgtccggt 180

cattttgatt gggcagtcga aacctttgtg ctttacccag ttgccactca tatcatttca 240

ctgggttttc tcacaacaag ccatttcctt gatgcgctcg gtctcggcgc tgtgtccgcc 300

acaggattca ttggcgagcg gtatgtactt agcagcatgt acggcgtttg cgccttcgcg 360

gcgttcgtat gttttgtcat ccgtgctgct aaaaattgca tggcttgccg ctatgcccgc 420

acccggttta ccaacttcat cgtggacgac cggggaagaa tccatcgatg gaagtcttca 480

atagtggtgg agaaattggg caaagctgaa gtcggtggtg accttgtcaa cattaagcat 540

gttgtcctcg aaggggttaa agctcaacct ttgacgagga cttcggctga gcaatgggaa 600

gcctag 606

<210> 25
<211> 522
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Nucleótido que codifica ORF6 atenuado de PRRSV 94881

<400> 25
atgggaagcc tagacgactt ttgcaacgat cccaccgccg cacaaaaact cgtgctggcc 60

tttagcatca catatacacc cataatgata tacgccctta aggtgtcacg cggccgactc 120

ctggggctgt tgcacatctt gatatttctg aattgttcct ttacttttgg gtacatgaca 180

tatgtgcatt ttcaatccac caaccgtgtc gcattcactc tgggggctgt agtcgccctt 240

ttgtggggtg tttacagcct cacagagtca tggaagttca tcacttccag atgcagattg 300

tgttgcctag gccggcgata cattctggcc cctgcccatc acgtagaaag tgctgcaggc 360

ctccattcaa tcccagcgtc tggtaaccga gcatacgctg tgagaaagcc cggactaaca 420

tcagtgaacg gcactctagt acctgggctt cggagcctcg tgctgggcgg caaacgagct 480

gttaaacgag gagtggttaa cctcgtcaag tatggccggt aa 522

<210> 26
<211> 431
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Nucleótido que codifica ORF7 atenuado de PRRSV 94881

<400> 26
atggccggta agaaccagag ccagaagaaa agaagaaatg cagctccgat ggggaaaggc 60

cagccagtca atcaactgtg ccagttgctg ggtacaatga taaagtccca gcgccagcaa 120

tctaggggag gacaggccaa aaagaagaag cctgagaagc cacattttcc cctagctgct 180

gaagatgaca ttcggcacca tctcacccag gccgaacgtt ccctctgctt gcaatcgatc 240

cagacggctt tcaatcaagg cgcaggaact gcgtcgcttt catccagcgg gaaggtcagt 300

ttccaggttg agttcatgct gccggttgct catacagtgc gcctgattcg cgtgacttct 360

acatccgcca gtcagggtgc aaattaattt gacagtcagg tgaatggccg cgattgacgt 420

gtggcctcta a 431

<210> 27
<211> 7083
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Nucleótido que codifica ORF1a parental de PRRSV 94881

<400> 27
atgtctggga tgttctcccg gtgcatgtgc accccggctg cccgggtatt ttggaacgcc 60

ggccaagtct attgcacacg gtgtctcagt gcacggtctc ttctctctcc agaacttcag 120

gacacggacc tcggtgcagt tggcttgttt cacaagccta aagacaagct ccattggaaa 180

gttcccattg gtatccccca ggtggaatgt tctccatctg ggtgttgctg gctgtcaacc 240

atttttcctt tagcgcgcat gacctccggc aatcacaact tccttcaacg actcgtgaag 300

gttgctgacg tattgtaccg tgacggttgc ttaaccccta gacacctccg tgaactccaa 360

gtttacgagc gtggttgcaa ttggtatccg attacggggc ctgtgcctgg gatggctgtg 420

tacgcgaact ccatgcacgt gtccgaccaa ccgttccctg gtgccactca tgtgttaaca 480

aattcccctt tgcctcaacg ggcttgtcgg cagccgttct gtccgttcga agaggcccat 540

tctagcatat acaggtggga aaaatttgta atttttatgg attcctcctc cgacggtcga 600

tctcgcatga tgtggactcc ggaatccgat gactccacgg ctttggaagt tctgccgccc 660

gagctagaac accaggtcaa ggtccttgtt cggagctttc ccgcccatca ccttgtcgac 720

cttgccgatt gggagctcac tgagtcccct gagaacggtt tttccttcag cacgtcacat 780

ccttgcggct accttgttcg ggacccggct gtatccgaag gcaagtgttg gctttcctgc 840

tttttgagcc agtcagccga agtgctcagt cgcgaggcgc atctggctac cgcctatggt 900

taccaaacca agtggggtgt gcctggcaag tacatccagc gcagacttca agttcacggt 960

ctccgtgctg tggtcgaccc tgatggtccc attcacgttg aagcattgtc ttgcccccag 1020

tcttggatca ggcacttgac cctgaatgat gatgtcaccc cgggattcgt tcgcctaatg 1080

tctcttcgca ttgtgccgaa cacagagcct accacacacc ggatctttcg ttttggagtg 1140

cacaagtggt atggtgccgc cggcaaacgg gcccgtggca agcgtgccgc caaaagtgag 1200

aaagactcgg cttccaccct caaggttgcc cgaccgactt ccaccagtgg aatcgtcacc 1260

tactccccac ctgcggacgg gtcttgtggt tggcatgccc ttgccgccat actgaaccgg 1320

atgattaata atgacttcac gtcccctctg cctcggtaca acaggccgga ggacgattgg 1380

gcttctgatg gtgaccttgc tcaggccatt caatgtttgc aactacctgc cgccatagct 1440

cggaaccgcg cctgccctaa cgccaaatac ctcgtaaaac tcaacggagt tcattgggag 1500

gtagaggtga ggcctggaat ggctcctcgc tccctctctc gtgagtgcgt tgttggcgtc 1560

tgctctgaag gctgtgtcgc gtcgccttac ccggaggacg ggttgcctaa acgtgcactt 1620

gaggccctgg cgtctgctta tagactgcct tcagactgtg tttgtgatgg tattattgac 1680

ttccttgcca atccacctcc ccaggagttc tggactcttg acaaaatgtt gacttccccg 1740

tcaccggagc agtccggctt ctctagtctg tataaattgt tgttagaggt cttgccgcag 1800

aaatgcggat ccacagaagg ggaattcatc tatactgttg agaggatgtt gaaggattgt 1860

ccgagctcca aacaggccat ggccctcctt gcaaaaatta aggtcccatc ctcaaaggcc 1920

ccatccgtga ctctgaacga gtgcttcccc acggatgttc cagtcaactc tgagttaata 1980

tcttgggaag agcccaaaga ccctggcgct gctgttgtcc tatgtccatc ggatgcaaaa 2040

gaatctaagg aaacagcccc tgaagaagct caagcgagaa accgtaaggt cctccaccct 2100

gtggtcctta ccgaggaact tagcgagcaa caggtgcagg tggttgaggg tgatcaggat 2160

atgccactgg atttgacttg gccaacctta accgctacgg cgacccctgt tagagggccg 2220

gtaccggaca atttgagctc tggcattggt gcccagcccg ctaccgttca agaactcatt 2280

ctggcgaggc ctgcaccccg tcttgttgag cgctgtggca cggagtcgaa cggcagcagt 2340

tcatttctgg atttgcctga cgtgcagacc tcggaccagc ctttagacct gtccctggcc 2400

gcgtggcctg taagggctac cgcgtctgac cccggttgga tccacggtag gcgtgagcct 2460

gtctttgtga agcctcgagg tgttttctct gatggcgagt cggcccttca gttcggagag 2520

ctttccgaag ccagttctgt cgtcgatgac cggacaaaag aagctccggt ggttgacgcc 2580

cccatcgatt tgacaacttc gaacgagacg ctctctgggt ctgacccctt tgaattcgcc 2640

aaattcaggc gcccgcgttt ctccgcgcaa gctttaatcg accgaggtgg tccgcttgcc 2700

gatgttcatg caaagataaa gagtcgggta tatgaacaat gccttcaagc ttgtgaacct 2760

ggtagtcgtg cgaccccagc caccaagaag tggctcgaca aaatgtggga cagggtggac 2820

atgaaaactt ggcgctgcac ctcgcagttc caagctggtc acattcttga gtccctcaaa 2880

ttcctccctg acatgattca agacacaccg cctcctgttc ccaggaagaa ccgagctggt 2940

gacagtgccg gcctgaagca actggtggcg cagtgggata ggaaattgag tgtgacaccc 3000

cccacaaaac cggttggacc ggtgcttgac cagaccgtcc ctctgcctat ggacatccag 3060

caagaagatg ccatctccgc tgacaagcca ccccattcgc aaaacccttc tagtcaagta 3120

gatgtgggtg gaggttggaa aagttttatg ctctccggca cccgtttcgc ggggtccgtt 3180

agtcagcgcc ttacgacatg ggtttttgag gttctctccc atctcccagc ttttatgctc 3240

acacttttct cgccacgggg ctctatggct ccaggtgatt ggctgtttgc aggtgctgtt 3300

ctacttgctc tcctgctctg ccgttcttac ccaatactcg gatgccttcc cttattgggt 3360

gtcttttctg gttctgtgcg gtgtgttcgt ttgggtgttt ttggttcttg gatggctttt 3420

gctgtatttt tattctcgac tccacccgac ccagtcggtt cttcttgtga ccacgattcg 3480

ccggagtgtc atgctgagct tttggctctt gagcagcgcc aactttggga acctgtgcgc 3540

agccttgtgg tcgggccatc gggcctctta tgcgtcattc ttggcaagtt actcggtggg 3600

tcacgttgtc tctggtttgt tctcctacgt atatgcatgc tcgcagattt ggcaatttct 3660

cttatttatg tggtgtccca agggcgttgt cacaagtgtt ggggaaagtg tataaggacg 3720

gctcctgcag aagtgaccct taatgtgttt ccttttcgc gcgccacccg ctcatctctt 3780

gtgtccttgt gtgatcggtt ccaagcgcca aaaggagttg accccgtgca cttggcgaca 3840

ggctggcgcg ggtgctggtg tggtgagagc cctattcatc aatcacacca aaaaccgata 3900

gcttatgcca acttggatga aaagaagata tccgcccaga cggtgattgc tgtcccgtat 3960

gatcccagtc aggccattaa atgcctgaaa gttttgcagg caggaggggc tattgtggac 4020

cagcctacgc ccgaggtcgt ccgtgtgtct gagattccct tctcggcccc atttttccg 4080

aaggtcccag tcaacccaga ttgcagggtt gtggtagatt cggacacttt tgtggctgcg 4140

gtccgctgcg gttattcgac agcacaactg gtccttggtc ggggcaactt tgccaagcta 4200

aatcagaccc ccctcaggaa ctctgtcccc accaaaacaa ctggtggggc ctcatacacc 4260

cttgccgtgg cccaggtatc tgtgtggact cttgttcatt tcatcctcgg cctttggtta 4320

acgtcacctc aagtgtgtgg tcgagggacc tctgacccgt ggtgttcgaa ccctttttcg 4380

tatcctactt atggccccgg agttgtgtgt tcctctcgac tctgcgtgtc tgccgacgga 4440

gttaccctgc cattgttctc agccgttgcc catctttccg gtagagaggt ggggattttt 4500

attttggtgc ttgcctcctt gggcgcttta gcccaccgct tggctcttaa ggcagacatg 4560

tcaatggtct ttttggcgtt ttgtgcttac gcctggccca tgagctcctg gttaatttgc 4620

ttctttccta tgctcttgag gtgggtaacc cttcatcctc tcactatgct ttgggtgcac 4680

tcatttttgg tgttttgcct accagctgcc ggcgttctct cgctgggaat aaccggtctt 4740

ctttgggcag ttggccgttt cacccaggtt gccggaatta tcacacctta tgacatccac 4800

cagtatacct ccggaccacg tggtgcagct gctgtagcaa cggctccaga aggtacttac 4860

atggcggccg ttcggagagc cgctttgact ggacggactt tgatcttcac accatctgca 4920

gtcggatccc ttcttgaagg tgctttcaga actcaaaagc cctgccttaa caccgtgaat 4980

gtcgtaggct cttcccttgg ttctggagga gttttcacca ttgatggcag aagagtcatc 5040

gtcactgcca cccatgtgtt gaatggtaac acagccaggg tcactggtga ttcctacaac 5100

cgcatgcaca cgttcaatac taatggtgat tatgcctggt cccatgctga tgactggcaa 5160

ggcgttgccc ctatggttaa gatcgctaag gggtatcgcg gtcgtgccta ctggcaaacg 5220

tcaaccggag tcgaacctgg catcatgggg gaaggattcg ccttctgttt cactaactgt 5280

ggcgactcag ggtcacctgt catttcagaa gctggtgacc ttattggagt ccataccggt 5340

tcaaacaaac tcggttctgg tcttgtgaca acccctgaag gggagacctg ctccatcaag 5400

gaaactaggc tctctgacct ttctagacat tttgcaggtc caagcgtccc tcttggggac 5460

attaagttga gcccagccat catccctgat gtgacaacta ttccgagtga cttggcatcg 5520

ctccttgctt ctgtccccgt gatggaaggt ggcctctcaa ctgtccagct tttgtgcgtc 5580

tttttccttc tctggcgcat gatgggccat gcctggacac ccattgttgc cgtaggcttc 5640

tttttgctga atgaaattct cccagcagtc ttggtccgag ctgtgttctc ttttgcactc 5700

tttgtacttg catgggccac cccctggtcg gcacaagtgt tgatgattag actcctcacg 5760

gcggctctca accgcaacag gttgtccctg gcgttctacg cactcggagg tgtcgttggc 5820

ctggccacag aaatcgggac ttttgctggt ggatggcctg aactgtccca agccctctcg 5880

acatactgct tcctgcccag gttccttgct gtgactagtt atgtccccac catcatcatc 5940

ggtgggctcc atgccctcgg cgtaattttg tggttattca aataccgatg cctccacaac 6000

atgctggttg gtgatgggag tttctcaagc gctttcttcc tacggtattt tgctgagggt 6060

aatcttagga aaggcgtgtc gcagtcctgt ggcatgaata acgaatccct gacagctgct 6120

ttggcttgca agttgtcgca agctgacctt gatttttgt ccagtttaac gaacttcaag 6180

tgctttgtgt ccgcttcaaa catgaaaaat gcagctggcc aatacatcga ggcggcgtat 6240

gctagagctc tgcgtcagga gctggcctcc ttggttcagg ttgacaagat gaaaggagta 6300

ttggccaagc tcgaggcttt cgctgagacg gccactccgt cacttgacac aggtgacgtg 6360

attgttctgc ttgggcaaca cccccatgga tccatcctcg acattaatgt ggggggtgaa 6420

aggaaaactg tgtctgtgca agaaacacga tgcctgggtg gttccaaatt cagtgtctgc 6480

actgtcgtgt ccaacacgcc cgtggatacc ttgaccggca tcccacttca gacgccaacc 6540

ccacttttg aaaatggccc gcgccatcgc agcgaggacg acgaccttaa agttgagaga 6600

atgaaaaaac actgtgtatc cctcggcttc cacaaaatca atggtaaagt ttactgcaaa 6660

atttgggaca agtctaacgg cgacaccttt tacacggatg attcccgata cactcaagac 6720

catgcttttc aggacaggtc aaccgactat agagacaggg attatgaagg tgtacagacc 6780

gccccccaac agggattcga tccaaagtcc gaagcccctg ttggcactgt tgtaatcggt 6840

ggcattacgt ataacaggca tctggtcaaa ggtaaggagg tcctagttcc caaacctgac 6900

aactgccttg aagctgccag actgtccctt gagcaagctc ttgctgggat gggccaaact 6960

tgtgacctta cagctaccga agtggagaaa ctaaagcgca tcattagtca actccaaggt 7020

ctgaccactg aacaggcttt aaactgctag ccgccagcgg cttgacccgc tgtggccgcg 7080

gcg 7083

<210> 28
<211> 4392
<212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor Respiratorio Porcino

<400> 28
acaggcttta aactgctagc cgccagcggc ttgacccgct gtggccgcgg cggcctagtt 60

gtaactgaaa cggcggtaaa aatcgtaaaa taccacagca gaactttcac cttaggctct 120

ttagacctaa aagtcacctc cgaggtggag gtgaagaaat caactgagca ggggcacgct 180

gtcgtggcga acttatgttc cggtgtcgtc ttgatgaggc ctcacccacc gtcccttgtt 240

gacgttctcc tcaaacccgg acttgacaca acacccggca ttcaaccagg gcatggggcc 300

gggaatatgg gcgtgaacgg ttctatttgg gattttgaaa ctgcacccac aaaggtagaa 360

ctagagttgt ccaagcaaat aatccaagca tgtgaagtca ggcgcgggga cgcccctaac 420

ctccaactcc cctacaagct ttatcctgtc agggggggacc ccgagcggcg taaaggtcgc 480

cttgtcaaca ctaggtttgg agatttacct tacaaaactc cccaagacac caagtccgca 540

attcatgcgg cttgttgcct gcatcccaat ggggtcctcg tgtctgatgg taaatccacg 600

ctgggtacca ctcttcaaca tggtttcgag ctttatgtcc ccactgtacc ttatagtgtc 660

atggaatacc ttgattcacg ccctgacacc ccttttatgt gtactaaaca tggcacttcc 720

aaggctgctg cagaggacct ccaaaaatat gacctatcca ctcaagggtt tgtcttgcct 780

ggggtcctac gcctagtgcg caggttcatc tttagccatg ttggtaaggc gccaccactg 840

ttccttccat caacctaccc tgccaagaac tccatggcag gggtcaatgg ccagaggttc 900

ccaacaaagg atgtccagag catacctgaa attgatgaaa tgtgcgcccg tgccgtcaag 960

gaaaattggc agactgtgac accttgcacc ctcaaaaaac agtactgttc caaacctaaa 1020

actagaacca tcctaggtac caacaacttc atagccttgg ctcacaggtc agcactcagt 1080

ggtgtcaccc aggcgttcat gaagaaggcc tggaagtccc caattgcctt ggggaaaaac 1140

aagtttaagg aattgcattg cactgtcgcc ggcagatgcc ttgaggctga cctggcttcc 1200

tgcgatcgca gcacccccgc cattgtgagg tggtttgttg ccaacctcct gtatgaactt 1260

gcaggatgtg aagagtactt gcctagctac gtgctcaact gttgccatga ccttgtggca 1320

acgcaggatg gcgctttcac aaaacgcggt ggcctgtcgt ccggggaccc cgtcaccagt 1380

gtgtccaaca ccgtctactc actgataatt tacgcccagc acatggtgct ttcggccttg 1440

aagatgggtc atgaaattgg tctcaagttc cttgaggaac agctcaaatt tgaggacctt 1500

cttgaaatcc agcccatgtt agtgtattct gatgacctcg tcttgtatgc ggaaagaccc 1560

acttttccca actaccattg gtgggtcgag catcttgacc tgatgttggg ctttaaaacg 1620

gacccaaaga aaactgtcat aactgataaa cccagttttc tcggctgcag aattgaagca 1680

ggacggcagt tagtccccaa tcgcgaccgt attctggctg ctcttgcata tcatatgaag 1740

gcgcagaacg cctcagagta ttatgcgtcc gctgccgcaa ttctgatgga ttcgtgtgct 1800

tgcattgacc atgaccccga gtggtatgag gaccttatct gcggcatcgc ccggtgtgct 1860

cgccaggacg gttaccgttt tccaggcccg gcatttttca tgtccatgtg ggagaagctg 1920

aaaagtcata acgaagggaa gaaatgccgt cactgcggca tctgcgacgc caaagccgac 1980

tatgcgtccg cctgtggact tgatttgtgt ttgttccatt cacactttca tcaacactgc 2040

ccagtcactc tgagctgtgg ccaccatgcc ggttcaaagg aatgttcgca gtgtcagtca 2100

cctgtcgggg ctggcaaatc ccccttgac gctgtgctga aacaaatccc gtacaaacct 2160

cctcgtacca ttatcatgaa ggtggacaac aaaacaacga cccttgaccc gggaagatat 2220

cagtcccgtc gaggtcttgt tgcagtcaaa agaggtattg caggtaatga ggttgatctt 2280

tctgatggag actaccaagt ggtgcctctt ttgccgactt gcaaagacat aaacatggtg 2340

aaggtggctt gcaacgtact actcagcaag tttatagtag ggccgccagg ttccggaaaa 2400

accacctggc tactgaacca agtccaggac gatgatgtca tttacacacc tactcatcag 2460

acaatgtttg acatagtcag tgctcttaaa gtttgcaggt attccatccc aggagcctca 2520

ggactccctt ttccaccacc tgccaggtcc gggccgtggg ttaggctcat cgccagcgga 2580

catgtccctg gccgagtgtc atatctcgat gaggcaggat attgcaatca tctagacatt 2640

ctaaggctgc tttccaaaac acccccttgtg tgtttgggtg accttcagca acttcacccg 2700

gtcggctttg attcctattg ttatgtgttc gatcagatgc ctcagaagca gctgaccacc 2760

atttatagat ttggccctaa catctgtgca gccatccagc cttgttacag ggagaaactt 2820

gaatccaagg ccaggaacac cagagtggtt ttcaccaccc ggcctgtggc ctttggtcag 2880

gtcctgacac cgtaccacaa agatcgtacc ggctctgcaa taactataga ttcatcccag 2940

ggggcgacct tcgacattgt gacattgcat ctaccatcgc caaagtccct aaacaaatcc 3000

cgagcacttg tagccatcac tcgggcaaga catgggttgt tcatttatga ccctcatgac 3060

caactccagg agtttttcaa cttaaccccc gagcgcactg attgtaacct tgcgttcagc 3120

cgtggggatg agctggttgt tttgaatgtg gataatgcgg tcacaactgt agcgaaggcc 3180

ctagagacag gttcaccccg atttcgagta tcggacccga ggtgcaagtc tctcttagcc 3240

gcttgttcgg ccagtctaga agggagctgc atgccactac cacaagtagc acataacctg 3300

gggttttact tttccccgga cagcccagct tttgcacccc tgccaaaaga gctggcgcca 3360

cattggccag tggtcaccca ccagaataat cgagcgtggc ctgatcgact tgtcgctagt 3420

atgcgcccaa ttgatgcccg ctacagcaag ccaatggtcg gtgcagggta tgtggtcggg 3480

ccatccattt ttcttggcac tcctggtgtg gtgtcatact atctcacatt atacatcggg 3540

ggcgagcctc aggccctgcc agaaacactc gtttcaacag gacgtatagc cacagattgt 3600

cgggaatatc tcgacgcggc tgaggaagag gcagcgagag aacttcccca cgcatttatt 3660

ggcgatgtca aaggcactac ggtcgggggg tgtcaccaca ttacatcgaa atacctacct 3720

aggtccctgc ctaaagactc tgttgctgtg gttggggtga gttcgcccgg tagggctgct 3780

aaagccgtgt gcactctcac cgatgtgtac ctccccgaac tccgaccata tttgcaaccg 3840

gagacggcat caaaatgctg gaaacttaaa ctggatttca gggatgttcg actgatggtc 3900

tggaaaggcg ccacagccta tttccagttg gaagggctga catggtcagc gctgcccgat 3960

tatgctaggt tcattcagct acccaaggat gccgttgtgt acatcgatcc gtgtataggg 4020

ccggcaacag ccaatcgcaa ggttgtgcga accacagact ggcgggccga cctggcagtg 4080

acaccgtatg attacggtgc tcaggtcatt ttgacaacag cctggttcga ggaccttggg 4140

ccgcagtgga agattttggg gttgcagcct ttcagacgaa catttggctt tgagaacact 4200

gaagattggg caattctcgc acgccgtatg aatgacggca aagattacac tgactataat 4260

tggcattgtg tacgagaacg cccacacgca atttacgggc gcgcccgtga ccatacgtat 4320

cattttgccc ttggcactga actgcaagta gagctgggca gaccccggct gcctcctgag 4380

caagtgccgt ga 4392

<210> 29
<211> 750
<212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor Respiratorio Porcino

<400> 29
atgcaatggg ttcactgtgg agtaaaatca gtcagttgtt cgtggatgcc ttcactgagt 60

tccttgttag tgtggttgac attgtcatct ttctcgccat attgtttggg ttcactgttg 120

caggctggtt attggtcttc cttctcagag tggtttgctc cgcgtttctc cgttcgcgct 180

ctgccattca ctctcccgaa ctatcgaagg tcctatgagg gcttgctacc caactgcaga 240

ccggatgtcc cacaattcgc agttaagcac ccgttgggta tactttggca tatgcgagtc 300

tcccacctaa ttgacgaaat ggtctctcgc cgcatttacc ggaccatgga acattcgggt 360

caagcggcct ggaagcaggt tgttagtgaa gccactctca caaaactgtc aaggcttgac 420

gtagtcactc atttccaaca cctggccgca gtggaggctg attcttgccg cttccttagc 480

tcacgactcg cgatgctgaa aaaccttgcc gttggcaatg tgagcctgga gtacaacact 540

actttggacc gcgttgagct catctttccc acaccaggta cgaggcccaa gttgaccgat 600

tttaggcaat ggcttatcag cgtgcacgct tccatcttct cctctgtggc ttcgtctgtt 660

accttgttca cagtgctttg gcttcgaatt ccagctctac gctatgtttt tggtttccat 720

tggcccacgg caacacatca ttcgaactaa 750

<210> 30
<211> 798
<212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor Respiratorio Porcino

<400> 30
atggcttatc agcgtgcacg cttccatctt ctcctctgtg gcttcgtctg ttaccttgtt 60

cacagtgctt tggcttcgaa ttccagctct acgctatgtt tttggtttcc attggcccac 120

ggcaacacat cattcgaact aactatcaat tacactatat gtaagccatg ccctaccagt 180

caagctgccc aacaaagact cgagcctggc cgtaacgtgt ggtgcaaaat agggcacgac 240

aggtgtgagg aacgtgacca tgatgagttg tcaatgtcca ttccgtccgg gtacgacaac 300

ctcaaacttg agggttatta tgcttggctg gctttttgt ccttttccta cgcggcccaa 360

ttccatccgg agctgttcgg aataggaaac gtgtcgcgcg tctttgtgga taagcgacac 420

cagttcattt gcgccgagca tgatggacaa aattcaacca tatctgccag acacaacatc 480

tccgcgtcgt atgcggtgta ttaccatcat caaatagacg ggggcaattg gtttcatttg 540

gaatggctgc gaccattctt ttcctcctgg ctggtgctca acatctcatg gtttctgagg 600

cgttcgcctg caagccctgc ttctcgacgc atctatcaga tattaagacc aacacgaccg 660

cggctgccgg tttcatggtc cttcagaaca tcaattgttt ccaatctcac agggcctcaa 720

cagcgcaagg taccactccc ctcaggaggt cgtcccaatg tcgtgaagcc gtcggcattc 780

cccagtacat cacgataa 798

<210> 31
<211> 552
<212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor Respiratorio Porcino

<400> 31
atggctgcga ccattctttt cctcctggct ggtgctcaac atctcatggt ttctgaggcg 60

ttcgcctgca agccctgctt ctcgacgcat ctatcagata ttaagaccaa cacgaccgcg 120

gctgccggtt tcatggtcct tcagaacatc aattgtttcc aatctcacag ggcctcaaca 180

gcgcaaggta ccactcccct caggaggtcg tcccaatgtc gtgaagccgt cggcattccc 240

cagtacatca cgataacggc taatgtgacc gatgaatcgt atttgtacaa cgcggacttg 300

ctgatgcttt ccgcgtgcct tttctacgcc tcggaaatga gcgagaaagg cttcaaagtc 360

atctttggga atatttctgg cgttgtttcc gcttgtgtta atttcacaga ttatgtggcc 420

catgtgaccc aacacactca gcagcaccat ttggtaattg atcacattcg gttactacac 480

ttcttgacac cgtctacgat gaggtgggct acaaccattg cttgtttgtt tgccattctt 540

ttggcggtat ga 552

<210> 32
<211> 606
<212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor Respiratorio Porcino

<400> 32
atgaaatgtt cttgcaagtt ggggcatttc ttgactcctc actcttgctt ctggtggctt 60

tttttgctgt gtaccggctt gtcttggtcc tttgtcgatg gcaacgacaa cagctcgaca 120

tcccaataca tatataattt gacgatatgc gagctgaatg ggaccgaatg gttgtccggt 180

cattttgatt gggcagtcga aacctttgtg ctttacccag ttgccactca tatcatttca 240

ctgggttttc tcacaacaag ccatttcctt gatgcgctcg gtctcggcgc tgtgtccgcc 300

acaggattca ttggcgagcg gtatgtactt agcagcatgt acggcgtttg cgccttcgcg 360

gcgctcgtat gttttgtcat ccgtgctgct aaaaattgca tggcttgccg ctatgcccgc 420

acccggttta ccaacttcat cgtggacgac cggggaagaa tccatcgatg gaagtcttca 480

atagtggtgg agaaattggg caaagctgaa gtcggtggtg accttgtcaa cattaagcat 540

gttgtcctcg aaggggttaa agctcaaccc ttgacgagga cttcggctga gcaatgggaa 600

gcctag 606

<210> 33
<211> 522
<212> ADN
<213> Nucleótido que codifica ORF6 de PRRSV 94881

<400> 33
atgggaagcc tagacgactt ttgcaacgat cccaccgccg cacaaaaact cgtgctggcc 60

tttagcatca catatacacc cataatgata tacgccctta aggtgtcacg cggccgactc 120

ctggggctgt tgcacatctt gatatttctg aattgttcct ttacttttgg gtacatgaca 180

tatgtgcatt ttcaatccac caaccgtgtc gcactcactc tgggggctgt agtcgccctt 240

ttgtggggtg tttacagcct cacagagtca tggaagttca tcacttccag atgcagattg 300

tgttgcctag gccggcgata cattctggcc cctgcccatc acgtagaaag tgctgcaggc 360

ctccattcaa tcccagcgtc tggtaaccga gcatacgctg tgagaaagcc cggactaaca 420

tcagtgaacg gcactctagt acctgggctt cggagcctcg tgctgggcgg caaacgagct 480

gttaaacgag gagtggttaa cctcgtcaag tatggccggt aa 522

<210> 34
<211> 387
<212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor Respiratorio Porcino

<400> 34
atggccggta agaaccagag ccagaagaaa agaagaaatg cagctccgat ggggaaaggc 60

cagccagtca atcaactgtg ccagttgctg ggtacaatga taaagtccca gcgccagcaa 120

tctaggggag gacaggccaa aaagaagaag cctgagaagc cacattttcc cctagctgct 180

gaagatgaca ttcggcacca tctcacccag gccgaacgtt ccctctgctt gcaatcgatc 240

cagacggctt tcaatcaagg cgcaggaact gcgtcgcttt catccagcgg gaaggtcagt 300

ttccaggttg agttcatgct gccggttgct catacagtgc gcctgattcg cgtgacttct 360

acatccgcca gtcagggtgc aaattaa 387

FIG 1A

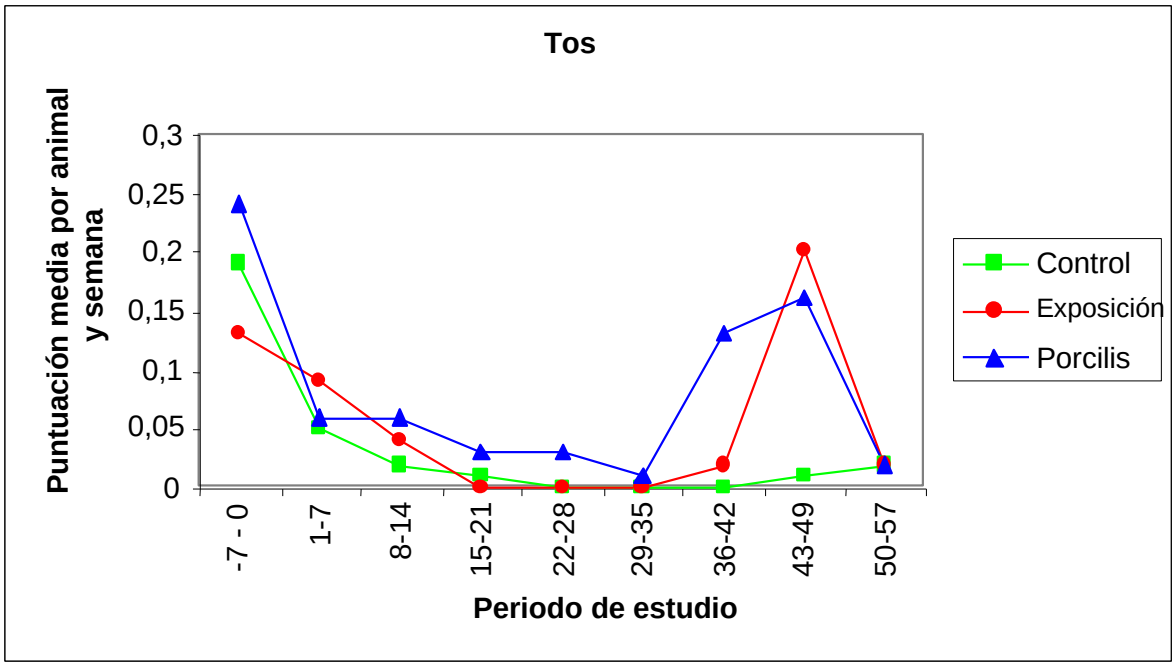

Tos
Puntuación media por animal y semana
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
-7 - 0
1-7
8-14
15-21
22-28
29-35
36-42
43-49
50-57
Periodo de estudio
Control
Exposición
Porcilis

FIG 1B

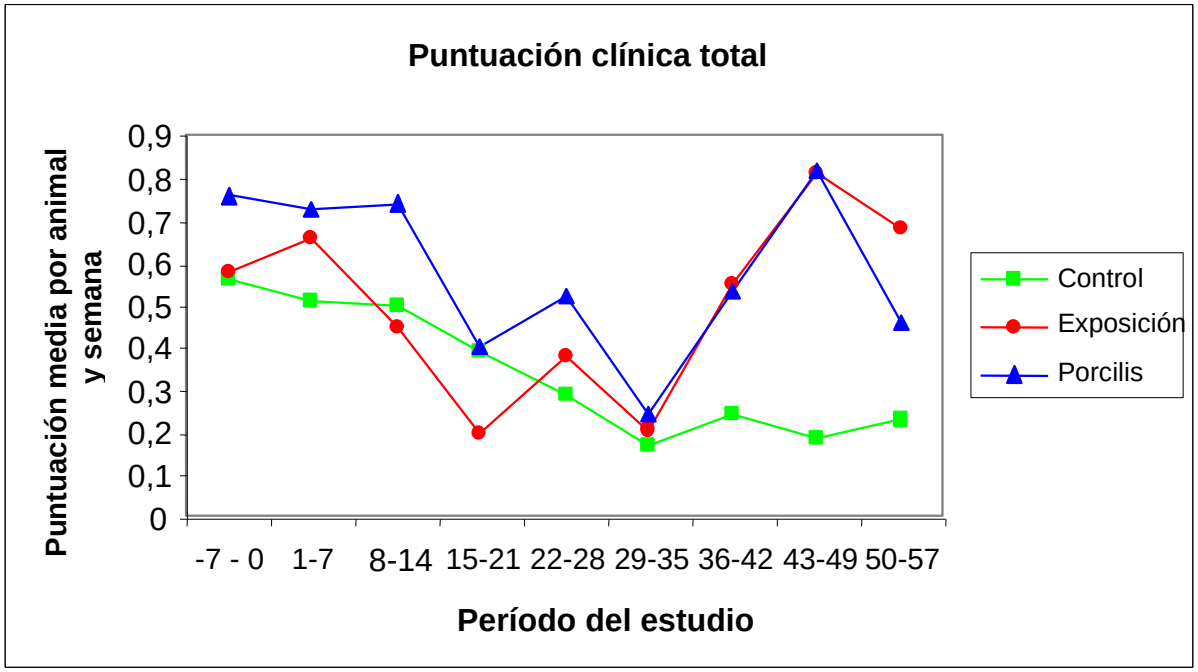

Puntuación clínica total
Puntuación media por animal y semana
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
-7 - 0
1-7
8-14
15-21
22-28
29-35
36-42
43-49
50-57
Período del estudio
Control
Exposición
Porcilis

FIG 2

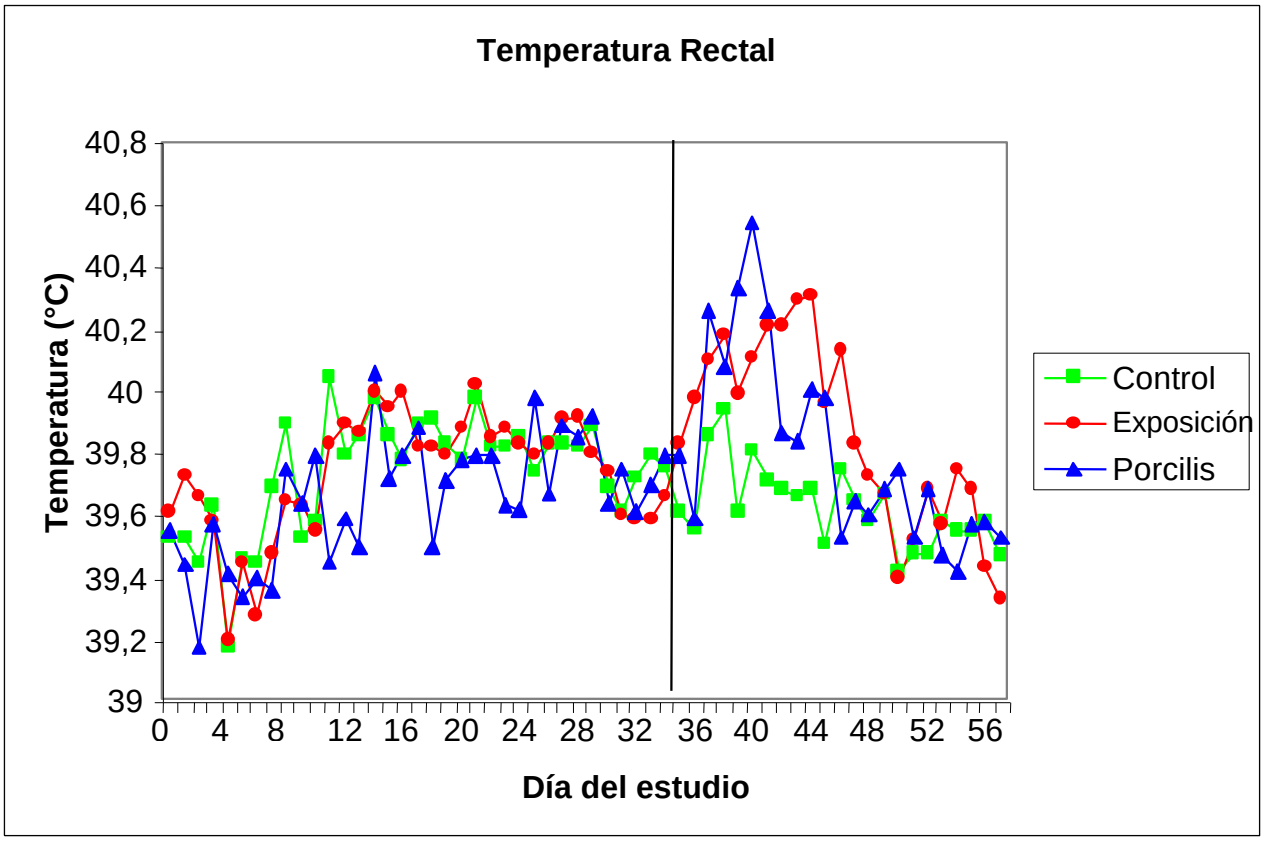

Temperatura Rectal
Temperatura (°C)
40,8
40,6
40,4
40,2
40
39,8
39,6
39,4
39,2
39
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56
Día del estudio
Control
Exposición
Porcilis

FIG 3

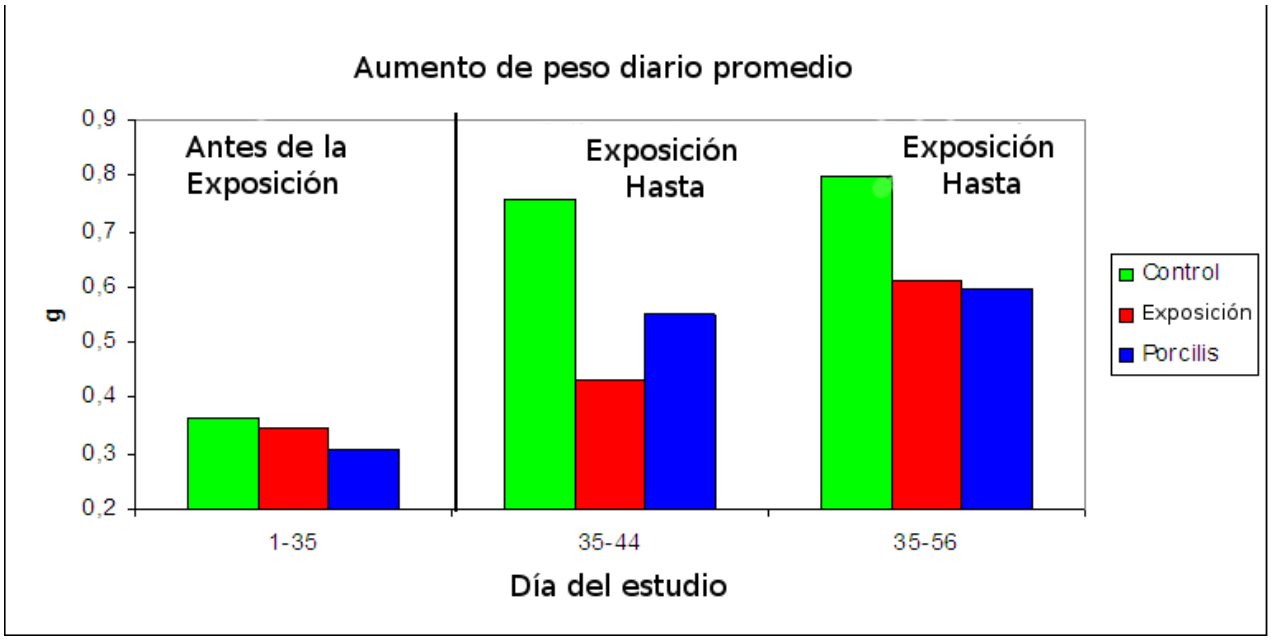

Aumento de peso diario promedio
g
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
Antes de la Exposición
Exposición Hasta
Exposición Hasta
1-35
35-44
35-56
Día del estudio
Control
Exposición
Porcilis

FIG 4

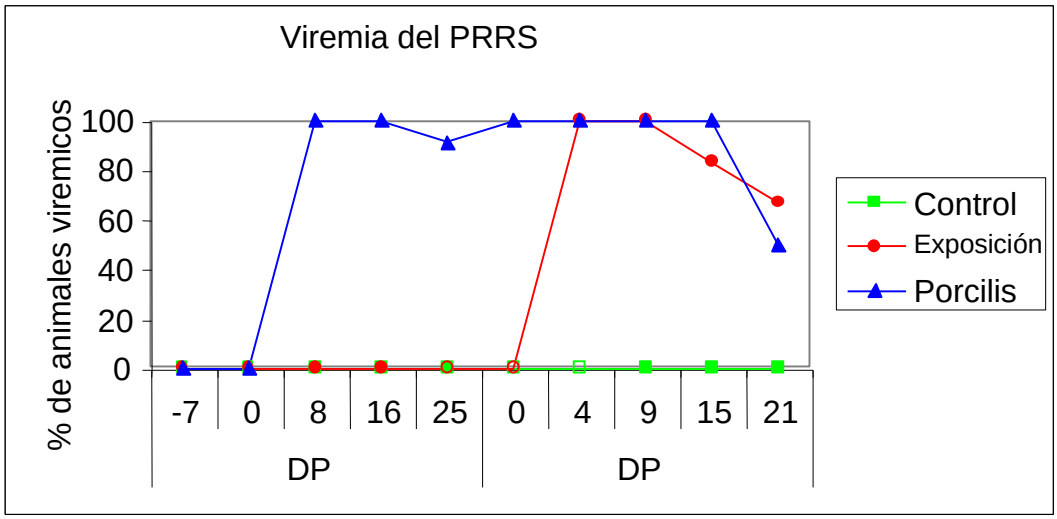

Viremia del PRRS
% de animales viremicos
100
80
60
40
20
0
-7
0
8
16
25
0
4
9
15
21
DP
DP
Control
Exposición
Porcilis

FIG 5

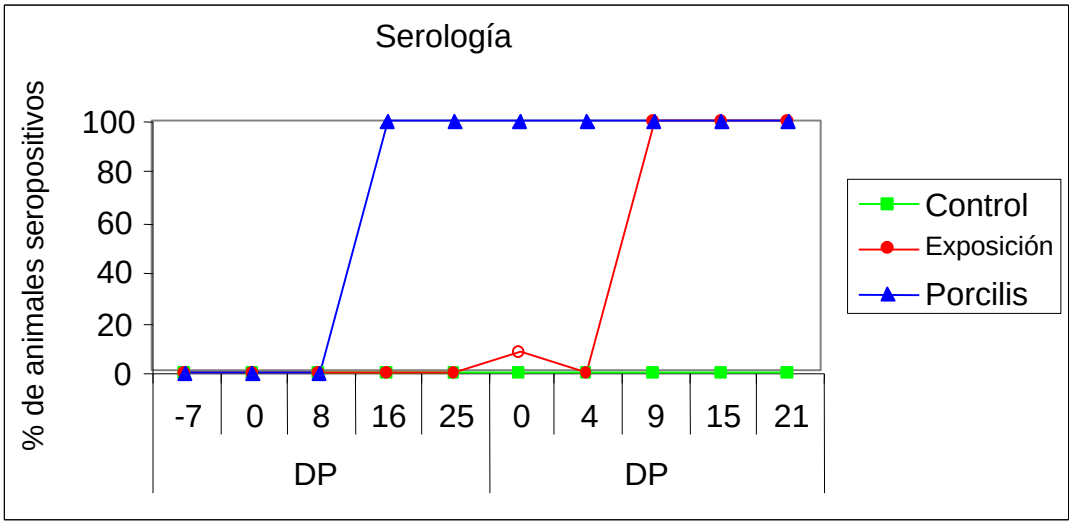

Serología
% de animales seropositivos
100
80
60
40
20
0
-7
0
8
16
25
0
4
9
15
21
DP
DP
Control
Exposición
Porcilis

FIG 6

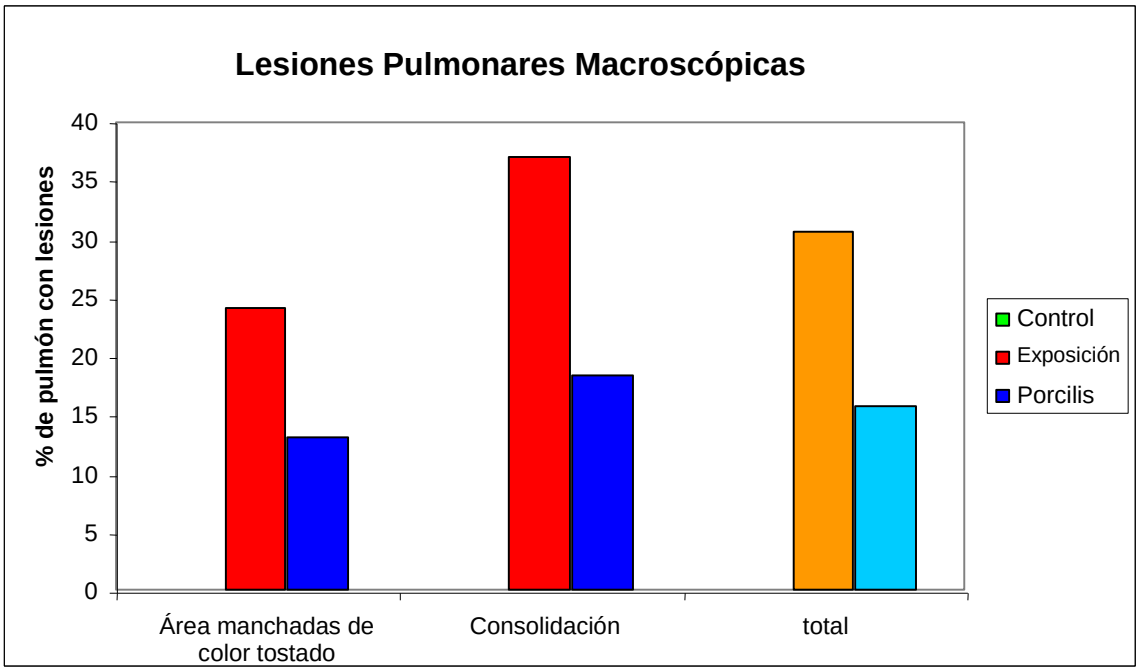

Lesiones Pulmonares Macroscópicas
% de pulmón con lesiones
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Área manchadas de color tostado
Consolidación
total
Control
Exposición
Porcilis

FIG 7A

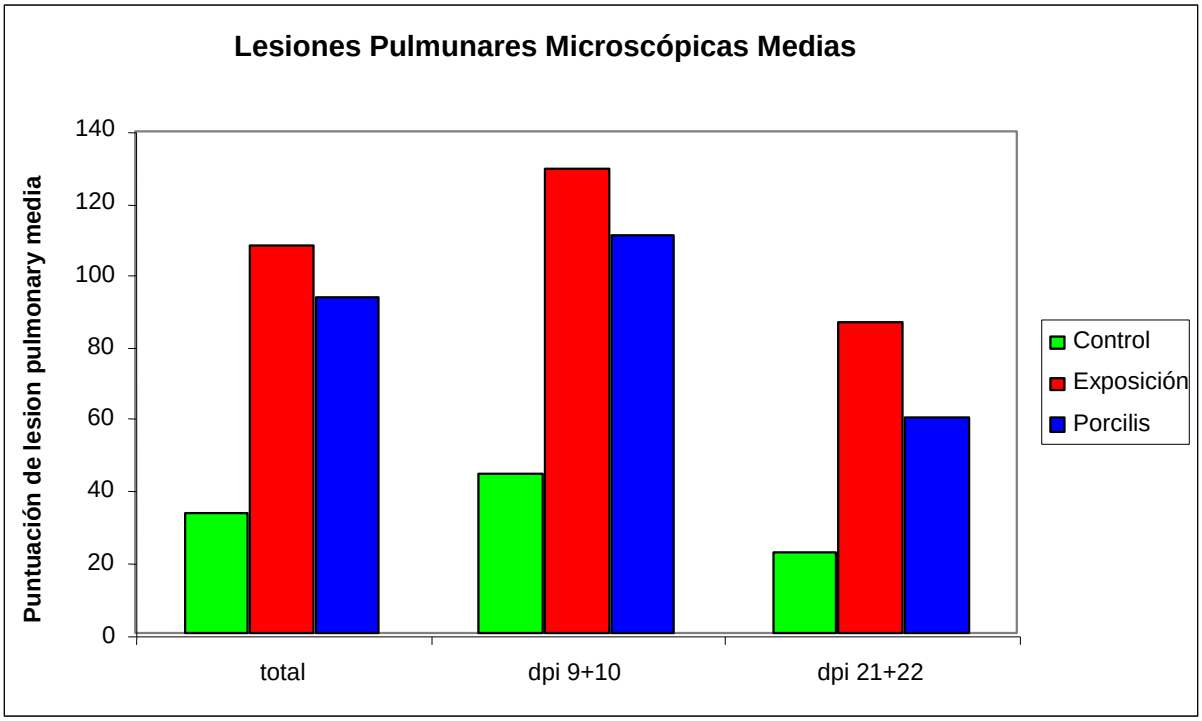

Lesiones Pulmunares Microscópicas Medias
Puntuación de lesion pulmonary media
140
120
100
80
60
40
20
0
total
dpi 9+10
dpi 21+22
Control
Exposición
Porcilis

FIG 7B

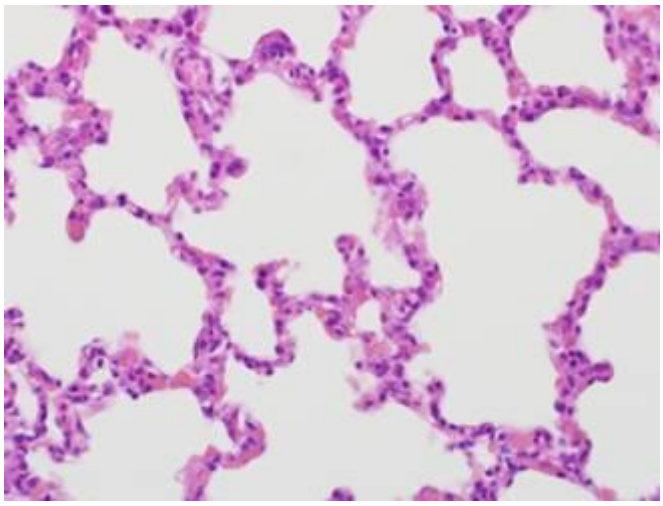


FIG 7C

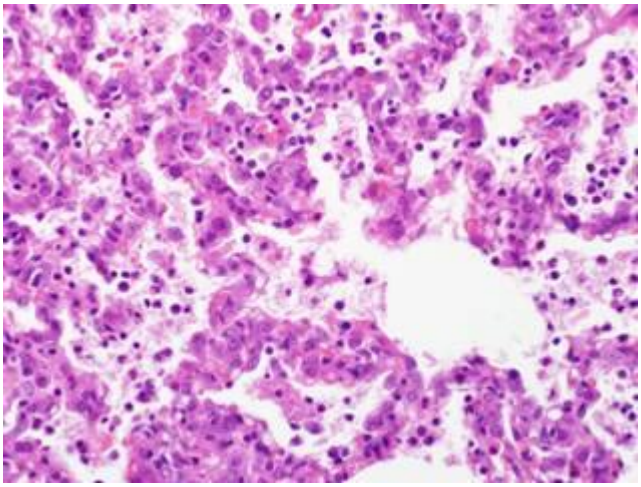
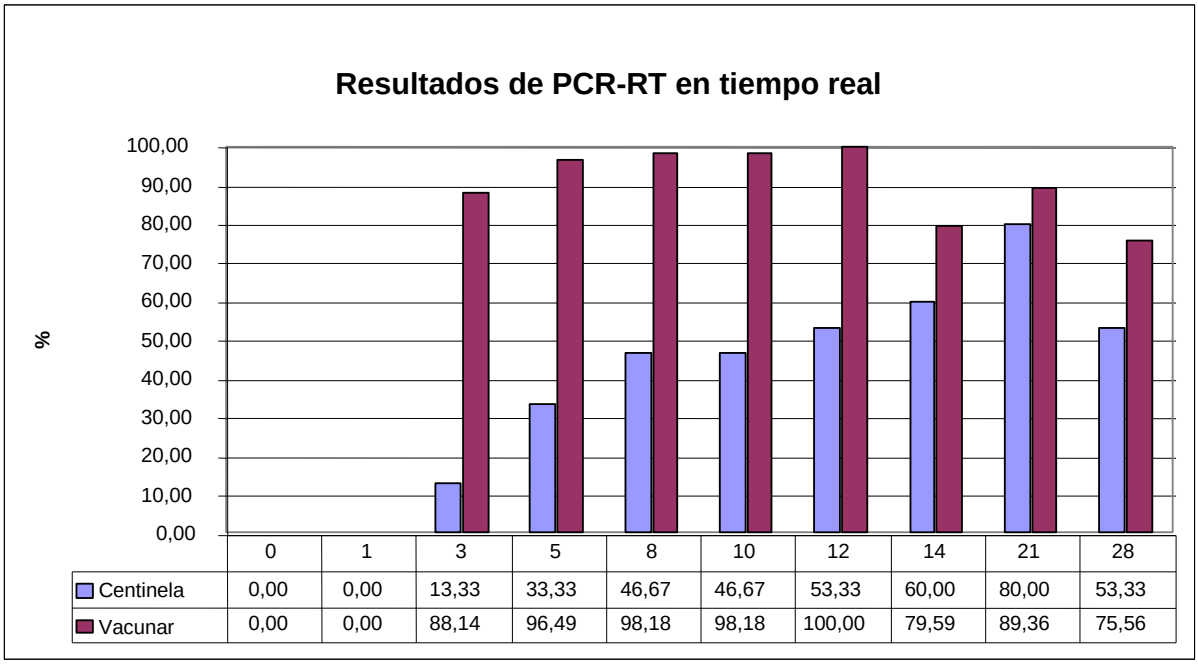
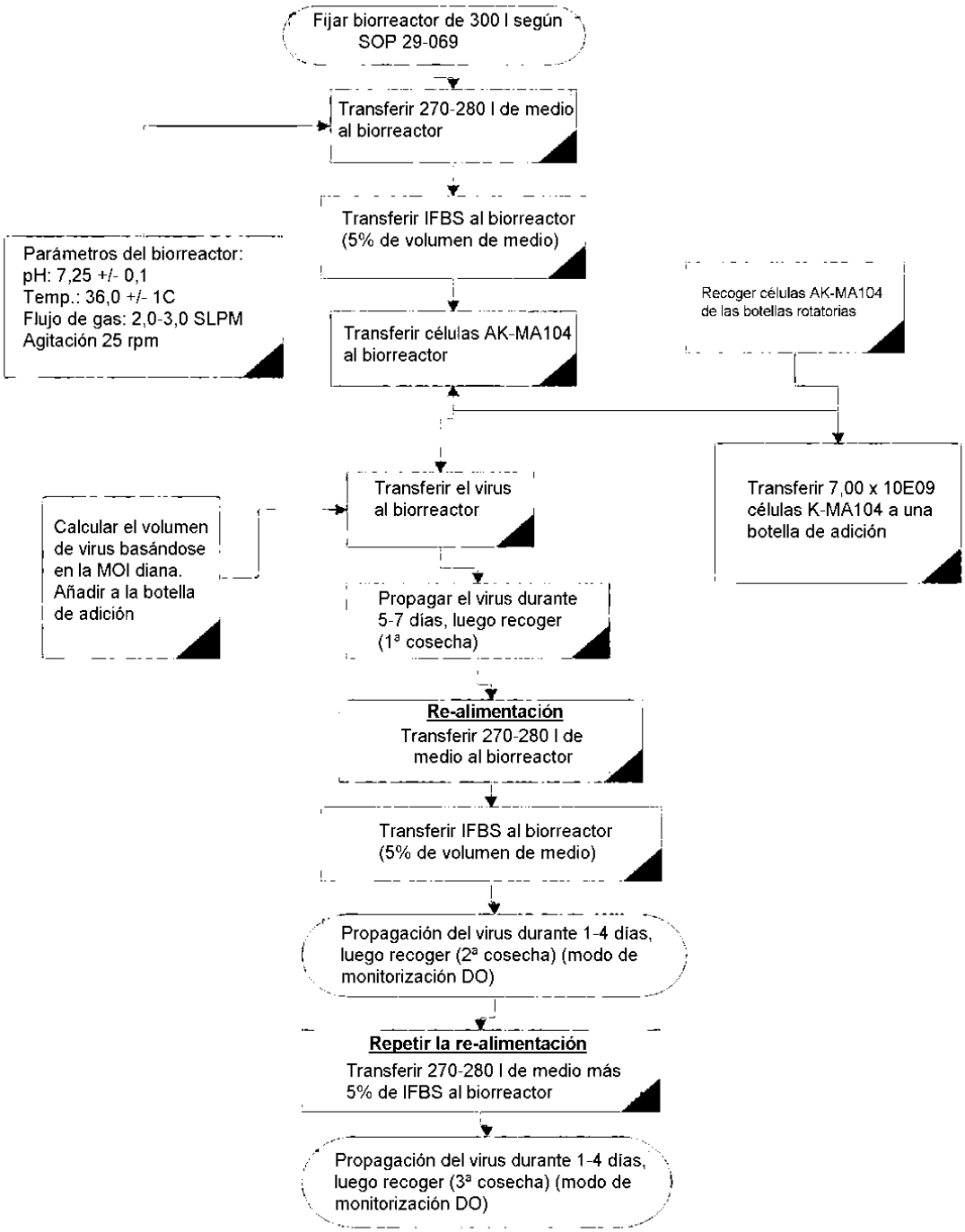


FIG 8



	0	1	3	5	8	10	12	14	21	28
Centinela	0,00	0,00	13,33	33,33	46,67	46,67	53,33	60,00	80,00	53,33
Vacunar	0,00	0,00	88,14	96,49	98,18	98,18	100,00	79,59	89,36	75,56

FIG 9


Fijar biorreactor de 300 l según SOP 29-069
Transferir 270-280 l de medio al biorreactor
Transferir IFBS al biorreactor (5% de volumen de medio)
Parámetros del biorreactor:
pH: 7,25 +/- 0,1
Temp.: 36,0 +/- 1C
Flujo de gas: 2,0-3,0 SLPM
Agitación 25 rpm
Transferir células AK-MA104 al biorreactor
Recoger células AK-MA104 de las botellas rotatorias
Transferir el virus al biorreactor
Calcular el volumen de virus basándose en la MOI diana. Añadir a la botella de adición
Transferir 7,00 x 10E09 células K-MA104 a una botella de adición
Propagar el virus durante 5-7 días, luego recoger (1ª cosecha)
Re-alimentación
Transferir 270-280 l de medio al biorreactor
Transferir IFBS al biorreactor (5% de volumen de medio)
Propagación del virus durante 1-4 días, luego recoger (2ª cosecha) (modo de monitorización DO)
Repetir la re-alimentación
Transferir 270-280 l de medio más 5% de IFBS al biorreactor
Propagación del virus durante 1-4 días, luego recoger (3ª cosecha) (modo de monitorización DO)

ECACC
European Collection of Cell Cultures
A Health Protection Agency Culture Collection

Health Protection Agency

Health Protection Agency, Porton Down and European Collection of Cell Cultures

This document certifies that

Virus Porcine Respiratory & Reproductive Syndrome Virus

Deposit Reference 11012501

has been accepted as a patent deposit, in accordance with The Budapest Treaty of 1977, with the European Collection of Cell Cultures on

25 January 2011

.....

ECACC Patent Supervisor

Health Protection Agency Culture Collections, Centre for Emergency Preparedness and Response, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG, United Kingdom
+44 (0) 1980 612512 +44 (0) 1980 611315 hpacultures@hpa.org.uk www.hpacultures.org.uk

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO
DR S PESCH
BIOSCREEN GMBH
MENDEL STR 11

NORTH RHINE WESTPHALIA
MUENSTER
48149

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:
Porcine Respiratory & Reproductive Syndrome Virus	11012501

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

[x] A scientific description

[ ] A proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 25 January 2011 (date of the original deposit)[1]

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on (date of the original deposit) and A request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)

IV. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: ECACC Patent Supervisor
Address: European Collection of Cell cultures (ECACC)
Centre for Emergency Preparedness and Response
The Health Protection Agency
Porton Down
Salisbury SP4 0JG

Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized officials(s):

Date: 21 JUN 2011

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO
DR S PESCH
BIOSCREEN GMBH
MENDEL STR 11

NORTH RHINE WESTPHALIA
MUENSTER
48149

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY TO WHOM THE VIABILITY OF STATEMENT IS ISSUED

VIABILITY STATEMENT
Issued pursant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: DR S PESCH BIOSCREEN GMBH MENDEL STR 11 Address: NORTH RHINE WESTPHALIA MUENSTER 48149	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: 11012501 Date of the deposit or of the transfer: 25 January 2011

II. VIABILITY STATEMENT

The viability of the microorganism identified under II above was tested on 25 January 2011 [2]. On that date, the said microorganism was

[X] [3] viable

[ ] [3] no longer viable

1 Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

2 In the cases referred to in Rule 10.2 (a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

3 Mark with a cross the applicable box.

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED [4]	
The patent deposit Porcine Respiratory & Reproductive Syndrome Virus 94881 accession number 11012501 was tested according to the depositor's protocol and shown to be infectious and viable.	
II. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: ECACC Patent Supervisor Address: European Collection of Cell cultures (ECACC) Centre for Emergency Preparedness and Response The Health Protection Agency Porton Down Salisbury SP4 0JG	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: 21 JUN 2011 ESL

4 Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form BP/9 (second and last page)

ECACC
European Collection of Cell Cultures
A Health Protection Agency culture collection

Health Protection Agency

Health Protection Agency, Porton Down and European Collection of Cell Cultures

This document certifies that

Virus Porcine Respiratory & Reproductive Syndrome Virus

Deposit Reference 11012502

has been accepted as a patent deposit, in accordance with The Budapest Treaty of 1977, with the European Collection of Cell Cultures on 25 January 2011

.....

ECACC Patent Supervisor

Health Protection Agency Culture Collections, Centre for Emergency Preparedness and Response, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG, United Kingdom
+44 (0) 1980 612512 +44 (0) 1980 611315 hpacultures@hpa.org.uk www.hpacultures.org.uk

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

TO
DR S PESCH
BIOSCREEN GMBH
MENDEL STR 11

NORTH RHINE WESTPHALIA
MUENSTER
48149

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

INTERNATIONAL FORM

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:
Porcine Respiratory & Reproductive Syndrome Virus	11012502

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

[x] A scientific description

[ ] A proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 25 January 2011 (date of the original deposit)[1]

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on (date of the original deposit) and A request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)

IV. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: ECACC Patent Supervisor
Address: European Collection of Cell cultures (ECACC)
Centre for Emergency Preparedness and Response
The Health Protection Agency
Porton Down
Salisbury SP4 0JG

Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized officials(s):

Date: 21 Jun 2011

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO
DR S PESCH
BIOSCREEN GMBH
MENDEL STR 11

NORTH RHINE WESTPHALIA
MUENSTER
48149

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY
TO WHOM THE VIABILITY OF STATEMENT
IS ISSUED

VIABILITY STATEMENT
Issued pursant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: DR S PESCH BIOSCREEN GMBH MENDEL STR 11 Address: NORTH RHINE WESTPHALIA MUENSTER 48149	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: 11012502 Date of the deposit or of the transfer: 25 January 2011

II. VIABILITY STATEMENT

The viability of the microorganism identified under II above was tested on 25 January 2011 [2]. On that date, the said microorganism was

[X] [3] viable

[ ] [3] no longer viable

1 Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

2 In the cases referred to in Rule 10.2 (a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

3 Mark with a cross the applicable box.

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED [4]	
The patent deposit Porcine Respiratory & Reproductive Syndrome Virus 94881 Master Seed Virus accession number 11012502 was tested according to the depositor's protocol and shown to be infectious and viable.	
II. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: ECACC Patent Supervisor Address: European Collection of Cell cultures (ECACC) Centre for Emergency Preparedness and Response The Health Protection Agency Porton Down Salisbury SP4 0JG	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: 01 JUNE 2011

4 Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form BP/9 (second and last page)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
23 August 2012 (23.08.2012)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/110489 A3

(51) **International Patent Classification**:
A61K 39/12 (2006.01) *C12N 7/00* (2006.01)

(21) **International Application Number**:
PCT/EP2012/052475

(22) **International Filing Date**:
14 February 2012 (14.02.2012)

(25) **Filing Language**: English

(26) **Publication Language**: English

(30) **Priority Data**:
61/444,074 17 February 2011 (17.02.2011) US

(71) **Applicant** *(for all designated States except US)*: **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH** [DE/DE]; Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(72) **Inventors; and**

(75) **Inventors/Applicants** *(for US only)*: **BURGARD, Kim** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **KROLL, Jeremy** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **LAYTON, Sarah M.** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **OHLINGER, Volker** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **ORVEILLON, Francois-Xavier** [FR/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **PESCH, Stefan** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **PIONTKOWSKI, Michael Dennis** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **ROOF, Michael B.** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **UTLEY, Philip** [US/US]; 502 8th Avenue, Slater, Iowa 50244 (US). **VAUGHN, Eric Martin** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US).

(74) **Agents**: **HAMMANN ET AL., Heinz** et al.; Boehringer Ingelheim GmbH, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(81) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(88) **Date of publication of the international search report**:
11 October 2012

(54) **Title**: NOVEL EUROPEAN PRRSV STRAIN

(57) **Abstract**: The present invention is related to improved modified live PRRS vaccines containing new PRRSV European strains of PRRSV and methods of use and manufacture of such vaccines.

WO 2012/110489 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2012/052475

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/052475

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/12 C12N7/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PESCH S ET AL: "New insights into the genetic diversity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)", VETERINARY MICROBIOLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 107, no. 1-2, 25 April 2005 (2005-04-25), pages 31-48, XP004807945, ISSN: 0378-1135, DOI: 10.1016/J.VETMIC.2005.01.028 abstract ----- -/--	1-26

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 July 2012	20/08/2012

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Brero, Alessandro

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LAILA DARWICH ET AL: "Genetic and immunobiological diversities of porcine reproductive and respiratory syndrome genotype I strains", VETERINARY MICROBIOLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 150, no. 1, 10 January 2011 (2011-01-10), pages 49-62, XP028194704, ISSN: 0378-1135, DOI: 10.1016/J.VETMIC.2011.01.008 [retrieved on 2011-01-15] abstract figures 1-4,6	1-26
A	ROPP S L ET AL: "CHARACTERIZATION OF EMERGING EUROPEAN-LIKE PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS ISOLATES IN THE UNITED STATES", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 78, no. 7, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 3684-3703, XP009029649, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.78.7.3684-3703.2004 table 1 figures 4,5	1-26
A	WO 01/59077 A1 (UNIV MINNESOTA [US]; COLLINS JAMES E [US]; FAABERG KAY S [US]; ROSSOW) 16 August 2001 (2001-08-16) abstract figure 1	1-26
A	WO 2007/064742 A2 (UNIV IOWA STATE RES FOUND INC [US]; HARRIS DELBERT LINN [US]; ERDMAN M) 7 June 2007 (2007-06-07) abstract figures 20-24	1-26
X	DATABASE UniProt [Online] 3 November 2009 (2009-11-03), "SubName: Full=M protein; SubName: Full=Membrane protein;", XP002680359, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:C9E449 Database accession no. C9E449 sequence	18

-/--

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt [Online] 15 December 2009 (2009-12-15), "SubName: Full=Unglycosylated membrane protein;", XP002680360, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:D0VEE4 Database accession no. D0VEE4 sequence ----- DATABASE UniProt [Online] 5 July 2004 (2004-07-05), "SubName: Full=Membrane protein M;", XP002680361, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q6TLB4 Database accession no. Q6TLB4 sequence -----	18 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/052475

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0159077 A1	16-08-2001	AT 333500 T	15-08-2006
		CA 2400583 A1	16-08-2001
		DE 60121545 T2	28-06-2007
		DK 1255815 T3	30-10-2006
		EP 1255815 A1	13-11-2002
		ES 2267719 T3	16-03-2007
		US 2003086945 A1	08-05-2003
		WO 0159077 A1	16-08-2001
WO 2007064742 A2	07-06-2007	CA 2630648 A1	07-06-2007
		CN 101495138 A	29-07-2009
		EP 1962900 A2	03-09-2008
		US 2008019912 A1	24-01-2008
		US 2009148472 A1	11-06-2009
		US 2009148475 A1	11-06-2009
		US 2011020233 A1	27-01-2011
		WO 2007064742 A2	07-06-2007

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-17(completely); 18-26(partially)

   A Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) of a European type comprising a nucleic acid according to SEQ ID NO: 19 or 27 encoding a PRRSV ORF1a protein that is at least 98% identical to SEQ ID NO: 2 or 11; and subject-matter relating thereto.

   ---

2. claims: 1-17(completely); 18-26(partially)

   A Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) of a European type comprising a nucleic acid according to SEQ ID NO: 20 or 28 encoding a PRRSV ORF1b protein that is at least 98% identical to SEQ ID NO: 3 or 12; and subject-matter relating thereto.

   ---

3. claims: 1-17(completely); 18-26(partially)

   A Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) of a European type comprising a nucleic acid according to SEQ ID NO: 21 or 29 encoding a PRRSV ORF2 protein that is at least 98% identical to SEQ ID NO: 4 or 13; and subject-matter relating thereto.

   ---

4. claims: 1-17(completely); 18-26(partially)

   A Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) of a European type comprising a nucleic acid according to SEQ ID NO: 22 or 30 encoding a PRRSV ORF3 protein that is at least 98% identical to SEQ ID NO: 5 or 14; and subject-matter relating thereto.

   ---

5. claims: 1-17(completely); 18-26(partially)

   A Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) of a European type comprising a nucleic acid according to SEQ ID NO: 23 or 31 encoding a PRRSV ORF4 protein that is at least 98% identical to SEQ ID NO: 6 or 15; and subject-matter relating thereto.

   ---

6. claims: 1-17(completely); 18-26(partially)

   A Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) of a European type comprising a nucleic acid according to SEQ ID NO: 24 or 32 encoding a PRRSV ORF5 protein that is at least 98% identical to SEQ ID NO: 7 or 16; and subject-matter relating thereto.

---

7. claims: 1-17(completely); 18-26(partially)

A Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) of a European type comprising a nucleic acid according to SEQ ID NO: 25 or 33 encoding a PRRSV ORF6 protein that is at least 98% identical to SEQ ID NO: 8 or 17; and subject-matter relating thereto.

---

8. claims: 1-17(completely); 18-26(partially)

A Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) of a European type comprising a nucleic acid according to SEQ ID NO: 26 or 34 encoding a PRRSV ORF7 protein that is at least 98% identical to SEQ ID NO: 9 or 18; and subject-matter relating thereto.
