

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETECTAR PICOBIRNAVIRUS

REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 62/975,419 presentada el 12 de febrero de 2020 y a la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 62/952,956 presentada el 23 de diciembre de 2019, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA DE MATERIAL PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE

[0002] Se incorpora por referencia en su totalidad un listado de secuencias de nucleótidos/aminoácidos legibles por computadora presentado simultáneamente con el presente documento e identificado como sigue: Un archivo ASCII (texto) de 137727 bytes denominado “38035-601_ST25.TXT”, creado el 23 de diciembre de 2020.

CAMPO TÉCNICO

[0003] Se proporcionan composiciones, métodos y kits para detectar el picobirnavirus humano (PBV). En ciertas realizaciones, se proporcionan sondas y cebadores de ácido nucleico específicos para el PBV, y métodos para detectar el ácido nucleico del PBV.

ANTECEDENTES

[0004] Los picobirnavirus (PBV) son virus de ARN segmentados y de doble cadena que se encuentran en una serie de huéspedes y se sabe que están asociados principalmente a la gastroenteritis y la diarrea. El nombre de Picobirnavirus se deriva del latín por ser pequeño (pico), tener dos segmentos (bi), y el núcleo viral formado por ARN, que en este caso es de doble cadena. El virus no está envuelto y las dos bandas de ARN pueden ser de mayor tamaño (Genogrupo I: 2.3-2.6 kb y 1.5-1.9 kb) o de menor tamaño (Genogrupo II: 1.75 y 1.55 kb). Se descubrió inicialmente en muestras fecales tanto de humanos como de ratas pigmeas en Brasil.

[0005] Los PBVs se han encontrado en humanos como el “único” patógeno en casos de diarrea acuosa y gastroenteritis, a menudo en pacientes inmunodeprimidos. Sin embargo, también se han encontrado en una amplia gama de especies animales de todo el mundo, tengan o no diarrea. De hecho, se trata de virus genéticamente distintos que parecen evolucionar rápidamente por reordenación, debido a su naturaleza segmentada. Por ejemplo, el estrecho parentesco de las cepas porcinas y humanas apunta a la probabilidad que se produzcan eventos de cruce o circulación entre estos huéspedes, de forma muy similar a la gripe. De hecho, a diferencia de otros virus que han

coevolucionado con su huésped, las cepas del PBV no se segregan en clados distintos según el huésped. Más bien, la cápside simple parece haber obtenido un medio generalizado para infectar células animales y no parece haber una restricción de especie. Así, de nuevo, la detección de PBVs en animales de granja, aves, reptiles, mascotas domésticas, aves silvestres y en las aguas residuales en todas las partes del mundo, junto con los ejemplos documentados de transmisión entre especies (Argentina, Hungría, Venezuela, India) sugiere que los PBVs tienen potencial zoonótico y pueden representar una amenaza para la salud pública (1- 4). En consecuencia, lo que se necesita son composiciones, métodos y kits para diagnosticar los PBV, especialmente en sujetos humanos.

RESUMEN

[0006] El presente documento contiene materiales y métodos para detectar el PBV en una muestra. En algunos aspectos, se proporcionan cebadores para amplificar el PBV en una muestra. En algunas realizaciones, el cebador comprende una secuencia con un 80% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, o sus complementos.

[0007] En algunos aspectos, se proporcionan sondas para detectar el PBV en una muestra. En algunas realizaciones, la sonda comprende una secuencia con un 80% o más de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, o complementos de esta.

[0008] En algunos aspectos, se proporcionan composiciones para amplificar el PBV en una muestra. En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un cebador directo que comprende una secuencia con un 80% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID N°: 4 o un complemento de esta y al menos un cebador inverso que comprende una secuencia con un 80% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID N°: 5 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un cebador directo que comprende una secuencia con un 80% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID N°: 7 o un complemento de esta y al menos un cebador inverso que comprende una secuencia con un 80% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID N°: 8 o un complemento de esta.

[0009] En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un cebador directo que comprende una secuencia con un 80% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID N°: 4 o un complemento de esta, al menos un cebador inverso que comprende una secuencia con un 80% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID N°: 5 o un complemento de esta y una sonda que comprende una secuencia con un 80% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID N°: 6 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un cebador directo que

comprende una secuencia con un 80% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID N°: 7 o un complemento de esta, al menos un cebador inverso que comprenda una secuencia con un 80% o más de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 8 o un complemento de esta, y una sonda que comprende una secuencia con un 80% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID N°: 9 o un complemento de esta.

[0010] En algunos aspectos, se proporcionan aquí métodos para detectar el PBV en una muestra. En algunas realizaciones, los métodos comprenden el contacto de la muestra con al menos un cebador y/o al menos una sonda. En algunas realizaciones, el PBV comprende al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, y SEQ ID N°: 11.

[0011] En algunos aspectos, se proporcionan kits para detectar el PBV en una muestra. En algunas realizaciones, el kit comprende al menos un cebador directo que comprende una secuencia con un 80% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID N°: 4 o un complemento de esta, al menos un cebador inverso que comprende una secuencia con un 80% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID N°: 5 o un complemento de esta y una sonda que comprende una secuencia con un 80% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID N°: 6 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, el kit comprende al menos un cebador directo que comprende una secuencia con un 80% o más de identidad con la SEQ ID N°: 7 o un complemento de esta, al menos un cebador inverso que comprende una secuencia con un 80% o más de identidad con la SEQ ID N°: 8 o un complemento de esta, y una sonda que comprende una secuencia con un 80% o más de identidad con la SEQ ID N°: 9 o un complemento de esta.

[0012] En algunos aspectos, se proporcionan en el presente documento polinucleótidos aislados que tienen un 50% o más de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de los mismos. En algunos aspectos, se proporcionan aquí vectores y células huésped que comprenden los mismos.

[0013] En algunos aspectos, se proporcionan aquí polipéptidos aislados que tienen un 80% o más de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 11, o fragmentos de los mismos. En algunos aspectos, se proporcionan células huésped que comprenden los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014] Las FIGS. 1A-1B muestran dibujos representativos de la estructura del PBV. Los picobirnavirus (PBV) son virus segmentados de ARN de doble cadena que constan de dos segmentos y una cápside (FIG. 1A). El segmento 1 tiene una longitud de aproximadamente 2,5 kb y codifica

una proteína hipotética e hidrofílica (ORF1) de ~200 aa en un marco de lectura, y la proteína de la cápside en otro (~500 aa). El segmento 2 tiene una longitud aproximada de 1.7 kb y codifica únicamente la RDRP (FIG. 1B).

[0015] La FIG. 2A muestra un gráfico de cobertura para el segmento 1 (cápside) del nuevo PBV descrito en el presente documento, obtenido por secuenciación de próxima generación de la muestra de esputo del caso índice (MRN3406).

[0016] La FIG. 2B muestra un gráfico de cobertura para el segmento 2 (RDRP) del nuevo PBV descrito aquí (por ejemplo, ABT-PBV) obtenido por secuenciación de próxima generación de la muestra de esputo del caso índice (MRN3406).

[0017] La FIG. 3 muestra la alineación por pares de la secuencia de aminoácidos de la cápside de la nueva cepa del PBV (MRN3406) descrita en este documento con la cápside de otras cepas.

[0018] La FIG. 4 muestra la alineación por pares de la secuencia de aminoácidos de la RDRP de la nueva cepa del PBV (MRN3406) descrita en este documento con la secuencia de la RDRP de otras cepas.

[0019] Las FIG. 5A-5B muestran árboles radiales de unión de vecinos de la proteína de la cápside determinados a partir de un alineamiento con gap (hueco) de 521 aminoácidos (FIG. 3A) y un alineamiento con hueco de 156 aminoácidos (FIG. 3B).

[0020] La FIG. 6 muestra un ejemplo de un árbol RDRP de Smits, et al que se basa en el típico segmento conservado de 165 nt (55 aa) interrogado para inferir relaciones filogenéticas entre cepas. Este árbol destaca las secuencias porcinas y humanas obtenidas de las vías respiratorias, como la VS2000252/2005 mostrada en rojo (5).

[0021] La FIG. 7A muestra un árbol de unión de vecinos RDRP de longitud parcial de esta región de 55 aa de la FIG 6, enraizado en la cepa humana del genotipo II, AF246940 (4- GA-91) e incluye la cepa ABT-PBV. Las secuencias de RDRP recuperadas de GenBank (n=841) se redujeron a n=215, para incluir una diversidad de cepas y aquellas con implicaciones para la enfermedad respiratoria. La rama ABT-PBV se ha ampliado para mostrar que se agrupa con las cepas KM285233 y KM285234, cada una obtenida en 2009 a partir de hisopos de las vías respiratorias superiores de dos pacientes en Camboya. GU968930 se ramifica con un apoyo bootstrap (análisis de remuestreo) del 99% con VS2000252/2005 que se muestra en la FIG. 6. La FIG. 7B muestra árboles lineales y radiales de un alineamiento de 132 secuencias que abarcan 348 aa (coordinadas ABT: 126-473). La secuencia ABT-PBV sigue ramificándose con las cepas respiratorias camboyanas en la región más

larga analizada.

[0022] La FIG. 8A muestra una alineación de aminoácidos de la región objetivo de la RDRP qPCR. Nótese la identidad (‘’) de la proteína RDRP del ABT-PBV con las proteínas de Camboya (AK92636.1 y AKG92637.1). La FIG. 8B muestra la alineación de nucleótidos de la región objetivo de la RDRP qPCR y posición relativa de los cebadores y las sondas dentro del amplicón. MRN3406= Nueva cepa ABT-PBV; KM285233 y KM285234 son cepas respiratorias.

[0023] La FIG. 9 describe el esquema y los resultados esperados para dos reacciones independientes de RT-PCR cuantitativa que detectan infecciones de seis cepas diferentes de picobirnavirus. La columna 1 muestra las curvas de amplificación de los controles positivos diluidos en serie que detectan la cápside con una única sonda marcada con FAM. Sólo se detectan las nuevas cepas ABT-PBV o las altamente idénticas. Las columnas 2 y 4 muestran las curvas de una 2ª reacción de PCR múltiple que detecta el segmento RDRP. Los cebadores universales generan un amplicón para el que una sonda universal (FAM; columna 2) detecta las 6 cepas del PBV, una sonda Cy5 detecta sólo el ABT PBV, y una sonda Cy3 detecta sólo las cepas respiratorias del PBV de Camboya.

[0024] La FIG. 10 muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio de transcripciones *in vitro* (IVT). Los carriles 1-3 son secuencias VP0 de aichivirus, los carriles 4-8 y 10 son secuencias RDRP derivadas de 6 cepas diferentes de PBV, y el carril 9 es la secuencia de la cápside derivada de la cepa ABT-PBV. Los IVTs sirven como controles positivos en el ensayo qPCR.

[0025] La FIG. 11A-B muestra los resultados reales de la rtPCR para diluciones seriadas de 10 veces del IVT de la cápside de ABT-PBV (9: PVABTCA) utilizando los cebadores y las sondas de la cápside, como se muestra en la FIG. 9, columna 1. Las curvas de amplificación se muestran en la FIG. 11A. El gráfico de regresión lineal se muestra en la FIG. 11B.

[0026] La FIG. 12 muestra los resultados reales de la rtPCR para diluciones seriadas de 10 veces de RDRP IVT para varios transcritos *in vitro*, como se representa en la FIG 9, columnas 2-4. Los RDRP de las 6 cepas se detectan por FAM (columna 1), mientras que sólo los similares a ABT-PBV (8: MRN3406) se detectan por Cy5 y a la cepa camboyana (6: KM285233) se detectan por Cy3.

[0027] La FIG. 13 resume los aciertos detectados en un tamizaje de n=130 muestras de esputo obtenidas de individuos estadounidenses y colombianos hospitalizados con enfermedades respiratorias graves.

[0028] La FIG. 14 muestra un árbol lineal para la cápside (como en la FIG. 5A) a partir de un alineamiento de 147 secuencias que abarcan 242 aa (coordenadas ABT: 91-333), e incluye las nuevas

cepas respiratorias secuenciadas identificadas por el ensayo qPCR. Las nuevas secuencias respiratorias se agrupan en grupos distintos, pero se distancian de las cepas respiratorias camboyanas y se ramifican con las cepas derivadas del tracto gastrointestinal. [0029] La FIG. 15 muestra un árbol lineal para RDRP (como en la FIG. 7B) a partir de un alineamiento de 143 secuencias que abarcan 348 aa (coordinadas ABT: 126-473), e incluye las nuevas cepas respiratorias secuenciadas identificadas por el ensayo qPCR. Las nuevas secuencias respiratorias se agrupan en grupos distintos y se encuentran en la misma rama con las cepas respiratorias de Camboya sin ninguna cepa derivada del tracto gastrointestinal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0030] En algunos aspectos, se proporcionan aquí materiales y métodos para detectar cualquier infección por picobirnavirus en un sujeto. Por ejemplo, se proporcionan aquí materiales y métodos para detectar picobirnavirus asociados con gastroenteritis, diarrea o enfermedades respiratorias. En otras realizaciones, se proporcionan aquí materiales y métodos para detectar picobirnavirus específicos asociados con enfermedades respiratorias en un sujeto.

[0031] Recientemente se han detectado PBVs en secreciones respiratorias, tanto en cerdos como en humanos (5). Por ejemplo, en un estudio de vigilancia realizado en Uganda se detectaron nuevas cepas de PBV en dos pacientes con una enfermedad respiratoria grave y aguda (6). Es posible que la importancia del papel de estos virus en las enfermedades respiratorias esté empezando a apreciarse. Una cuestión que se plantea es si estos virus infectan realmente a los animales o se encuentran en las bacterias intestinales u otros parásitos eucariotas. Su capacidad de autoproteolizar su cápside e invadir liposomas sugiere que se trata en realidad de virus vertebrados, a diferencia de los partitivirus relacionados que infectan organismos unicelulares y hongos. Los estudios realizados en cerdos y pollos sugieren que el virus puede persistir crónicamente, con periodos de gran diseminación intercalados por periodos de silencio, y que algunos huéspedes pueden servir de reservorios asintomáticos. Esto implica que el virus está adaptado al huésped y puede subrayar por qué la patogenicidad (por ejemplo, la diarrea) se observa a menudo en los inmunocomprometidos o en los coinfectados con otros virus entéricos como el rotavirus, el calicivirus y el astrovirus, y por tanto los PBVs pueden ser patógenos oportunistas.

[0032] El diagnóstico se ha realizado previamente mediante PAGE y la detección con tinción de plata de los dos segmentos de ARN, aunque la PCR es ahora un enfoque más sencillo de uso generalizado. El segmento 1 tiene una longitud aproximada de 2.5 kb y codifica una proteína

hipotética e hidrofílica (ORF1) de ~200 aa en un marco de lectura, y la proteína de la cápside en otro (~500 aa). El segmento 2 tiene una longitud de aproximadamente 1.7 kb y codifica únicamente la RDRP. Dada la gran diversidad genética de los PBVs, incluso los conjuntos de cebadores degenerados en la región conservada de la RDRP (280 pb) tienen un éxito limitado.

Los análisis filogenéticos suelen basarse en sólo 168 nt/55 aa en el RDRP7. Su naturaleza heteróloga es aún más pronunciada por la detección documentada de múltiples cepas de PBV en individuos. La NGS no sesgada es ahora el medio preferido de detección y secuenciación. En la actualidad, sólo existen 6 cepas completas de genomas del PBV en el NCBI (por ejemplo, ambos segmentos). Todos ellos proceden de muestras de origen entérico; el nuestro sería el primero de muestras respiratorias.

[0033] Los títulos de las secciones que se utilizan en esta sección y en la totalidad de la divulgación son meramente organizativos y no pretenden ser limitativos.

1. Definiciones

[0034] A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que los entendidos comúnmente por un experto en la materia. En caso de conflicto, prevalecerá el presente documento, incluyendo las definiciones. A continuación, se describen los métodos y materiales preferidos, aunque en la práctica o en las pruebas de la presente divulgación pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

Los materiales, métodos y ejemplos aquí expuestos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

[0035] Los términos “comprende(n)”, “incluye(n)”, “tiene(n)”, “puede(n)”, “contiene(n)” y sus variantes, tal y como se utilizan aquí, pretenden ser frases, términos o palabras transitorias abiertas que no excluyen la posibilidad de actos o estructuras adicionales. Las formas singulares “uno”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. La presente divulgación también contempla otras realizaciones “que comprenden”, “que consisten en” y “que consisten esencialmente en” las realizaciones o los elementos presentados en el presente documento, tanto si se exponen explícitamente como si no.

[0036] Para la recitación de rangos numéricos en este documento, se contempla explícitamente cada número intermedio con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el rango de 6-9, se

contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9, y para el rango 6.0-7.0, se contemplan explícitamente los números 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 y 7.0.

[0037] Tal y como se utiliza aquí, el término “amplicón” se refiere a un ácido nucleico generado mediante una reacción de amplificación. El amplicón es típicamente ADN de doble cadena; sin embargo, puede ser ARN y/o un híbrido ADN:ARN. El amplicón comprende ADN complementario a un ácido nucleico de la muestra. En algunas realizaciones, los pares de cebadores están configurados para generar amplicones a partir de un ácido nucleico de muestra. Como tal, la composición de bases de cualquier amplicón dado puede incluir el par de cebadores, el complemento del par de cebadores y la región de un ácido nucleico de muestra que se amplificó para generar el amplicón. En una realización, la incorporación de las secuencias de pares diseñadas por cebador en un amplicón puede reemplazar las secuencias nativas en el sitio de unión del cebador, y su complemento. En ciertas realizaciones, tras la amplificación de la región objetivo utilizando los cebadores, los amplicones resultantes que tienen las secuencias del cebador se utilizan para el análisis posterior (por ejemplo, la determinación de la composición de bases, por ejemplo, mediante secuenciación directa). En algunas realizaciones, el amplicón comprende además una longitud que es compatible con el análisis posterior. Un ejemplo de amplicón es un producto de ADN o ARN (normalmente un segmento de un gen, ADN o ARN) producido como resultado de una PCR, PCR en tiempo real, RT-PCR, RT-PCR competitiva, reacción en cadena de la ligasa (LCR), LCR de brechas (gap), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA), o similares.

[0038] Tal como se utilizan en el presente documento, las frases “amplificación”, “método de amplificación” o “reacción de amplificación” se utilizan indistintamente y se refieren a un método o proceso que aumenta la representación de una población de secuencias de ácidos nucleicos específicos (todos los tipos de ADN o ARN) (como una secuencia objetivo o un ácido nucleico objetivo) en una muestra. Los ejemplos de métodos de amplificación que pueden utilizarse en la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, la PCR, la PCR en tiempo real, la RT-PCR, la RT-PCR competitiva, y similares, todos ellos conocidos por un experto en la materia.

[0039] Tal como se utiliza aquí, la frase “condiciones de amplificación” se refiere a las condiciones que promueven el recocido y/o la extensión de las secuencias de los cebadores. Estas condiciones son bien conocidas en la técnica y dependen del método de amplificación seleccionado. Por ejemplo, las condiciones de amplificación de la PCR generalmente comprenden ciclos térmicos, por ejemplo,

ciclos de la mezcla de reacción entre dos o más temperaturas. En las reacciones de amplificación isotérmica, la amplificación se produce sin ciclado térmico, aunque puede ser necesario un aumento inicial de la temperatura para iniciar la reacción. Las condiciones de amplificación abarcan todas las condiciones de reacción, incluyendo, pero sin limitarse a ello, la temperatura y el ciclado térmico, el tampón, la sal, la fuerza iónica, el pH y similares.

[0040] Tal y como se utiliza en el presente documento, la frase “reactivos de amplificación” se refiere a los reactivos utilizados en las reacciones de amplificación y puede incluir, entre otros, tampones, reactivos, enzimas con actividades de transcriptasa inversa y/o polimerasa o exonucleasa; cofactores enzimáticos como el magnesio o el manganeso; sales; y desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP), como el desoxiadenosina trifosfato (dATP), la desoxiguanosina trifosfato (dGTP), la desoxicitidina trifosfato (dCTP), la desoximidina trifosfato (dTTP) y la desoxiuridina trifosfato (dUTP). Los reactivos de amplificación pueden ser seleccionados fácilmente por un experto en la materia en función del método de amplificación empleado.

[0041] Una “secuencia codificadora” es una secuencia de polinucleótidos que se transcribe en ARNm y se traduce en un polipéptido cuando se coloca bajo el control de las secuencias reguladoras adecuadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan e incluyen un codón de inicio de la traducción en el extremo 5' y uno o más codones de parada de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, ARNm, ADNc y secuencias de polinucleótidos recombinantes.

[0042] El término “secuencia de control” se refiere a las secuencias de polinucleótidos que son necesarias para llevar a cabo la expresión de las secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere según el organismo huésped. En procariotas, dichas secuencias de control incluyen generalmente el promotor, el sitio de unión ribosomal y los terminadores; en eucariotas, dichas secuencias de control incluyen generalmente los promotores, los terminadores y, en algunos casos, los potenciadores. Por lo tanto, el término “secuencia de control” pretende incluir como mínimo todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, las secuencias líderes.

[0043] Un “epítipo conformacional” es un epítipo que se compone de una yuxtaposición específica de aminoácidos en una estructura inmunológicamente reconocible, estando dichos aminoácidos presentes en el mismo polipéptido en un orden contiguo o no contiguo o presentes en diferentes polipéptidos.

[0044] Tal como se utiliza en el presente documento, la frase “directamente detectable”, cuando se utiliza en referencia a una etiqueta detectable o a una fracción detectable, significa que la etiqueta detectable o la fracción detectable no requiere una reacción o manipulación adicional para ser detectable. Por ejemplo, una fracción fluorescente es directamente detectable por métodos de espectroscopia de fluorescencia. Por el contrario, la frase “detectable indirectamente”, cuando se utiliza en el presente documento en referencia a una etiqueta detectable o a una fracción detectable, significa que la etiqueta detectable o la fracción detectable se vuelve detectable después de una reacción o manipulación adicional. Por ejemplo, un hapteno se hace detectable tras la reacción con un anticuerpo apropiado unido a un reportero, como un colorante fluorescente.

[0045] “Codificado por” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica. También se incluyen las secuencias polipeptídicas que son inmunológicamente identificables con un polipéptido codificado por la secuencia. Por lo tanto, una secuencia de “polipéptido”, “proteína” o “aminoácido”, tal y como se reivindica en el presente documento, puede tener una similitud de al menos el 60%, más preferiblemente una similitud de al menos el 70%, y más preferiblemente alrededor del 80% de similitud con un polipéptido particular o secuencia de aminoácidos especificada a continuación.

[0046] Tal como se utiliza aquí, “epítopo” significa un determinante antigénico de un polipéptido. Es posible que un epítopo comprenda tres aminoácidos en una conformación espacial que es única para el epítopo. Generalmente, un epítopo consta de al menos cinco de estos aminoácidos, y más habitualmente, consta de al menos ocho a diez aminoácidos. Los métodos para examinar la conformación espacial son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional.

[0047] Los términos “fluoróforo”, “fracción fluorescente”, “etiqueta fluorescente” y “colorante fluorescente” se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a una molécula que absorbe un cuanto de radiación electromagnética a una longitud de onda y emite uno o más fotones a una longitud de onda diferente, normalmente más larga, en respuesta a la misma.

Numerosas tinciones fluorescentes de una amplia variedad de estructuras y características son adecuadas para su uso en la práctica de la presente divulgación. Se conocen métodos y materiales para el marcado fluorescente de moléculas de ácido nucleico (véase, R. P. Haugland, “Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 1992- 1994”, 5ª Ed., 1994, Molecular Probes, Inc.). Preferiblemente, una etiqueta o fracción fluorescente absorbe y emite luz con alta eficiencia (por ejemplo, tiene un alto coeficiente de absorción molar a la longitud de onda

de excitación utilizada, y un alto rendimiento cuántico de fluorescencia), y es fotoestable (por ejemplo, no sufre una degradación significativa tras la excitación de la luz dentro del tiempo necesario para realizar el análisis). En lugar de ser directamente detectables por sí mismos, algunas tinciones fluorescentes transfieren energía a otro tinte fluorescente en un proceso llamado transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), y el segundo tinte produce la señal detectada. Estos pares de tinciones fluorescentes FRET también se engloban en el término “fracción fluorescente”. El uso de moléculas reporteras/químicas fluorescentes vinculadas físicamente también está dentro del alcance de la presente divulgación. En estos aspectos, cuando el reportero fluorescente y la fracción atenuadora o “quencher” se mantienen en estrecha proximidad, como en los extremos de una sonda, la fracción atenuadora impide la detección de una señal fluorescente de la fracción reportera. Cuando las dos moléculas se separan físicamente, por ejemplo, después de la escisión por una ADN polimerasa, la señal fluorescente de la molécula informadora se puede detectar.

[0048] Un “fragmento” de un polipéptido especificado se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende al menos unos 3-5 aminoácidos, más preferiblemente al menos unos 8-10 aminoácidos, y aún más preferiblemente al menos unos 15-20 aminoácidos, derivados del polipéptido especificado. Un “fragmento” de un polinucleótido específico se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende al menos 10 pares de bases. Por ejemplo, un fragmento puede comprender al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, o al menos 100 pares de bases.

[0049] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “hibridación” se refiere a la formación de complejos entre secuencias de ácido nucleico que son lo suficientemente complementarias como para formar complejos mediante el emparejamiento de bases Watson-Crick o el emparejamiento de bases no canónico. Por ejemplo, cuando un cebador se “hibrida” con una secuencia diana (molde), dichos complejos (o híbridos) son lo suficientemente estables como para cumplir la función de cebado requerida por, por ejemplo, la ADN polimerasa, para iniciar la síntesis de ADN. Un experto en la materia apreciará que las secuencias de hibridación no necesitan tener una complementariedad perfecta para proporcionar híbridos estables. En muchas situaciones, se formarán híbridos estables cuando menos de un 10% de las bases sean desiguales. Por consiguiente, tal como se utiliza en el presente documento, el término “complementario” se refiere a un oligonucleótido que forma un dúplex estable con su complemento en condiciones de ensayo, generalmente cuando hay

aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94% aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99% de homología mayor. Los expertos en la materia saben cómo estimar y ajustar la rigurosidad de las condiciones de hibridación de forma que las secuencias que tengan al menos un nivel deseado de complementariedad hibriden de forma estable, mientras que las que tengan una complementariedad menor no lo hagan. Se pueden encontrar ejemplos de condiciones y parámetros de hibridación, por ejemplo, en, Sambrook et al., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”1989, Second Edition, Cold Spring Harbor Press: Plainview, NY; F. M. Ausubel, “Current Protocols in Molecular Biology” 1994, John Wiley & Sons: Secaucus, NJ.

[0050] El término “inmunológicamente identificable con/en” se refiere a la presencia de epítipo(s) y polipéptido(s) que también están presentes en el polipéptido(s) designado(s) y son únicos. La identidad inmunológica puede determinarse mediante la unión de anticuerpos y/o la competencia en la unión. Estas técnicas son conocidas por el artesano experto y también se describen en el presente documento. La singularidad de un epítipo también puede determinarse mediante búsquedas informáticas en bancos de datos conocidos, como el GenBank, para las secuencias de polinucleótidos que codifican el epítipo, y mediante comparaciones de secuencias de aminoácidos con otras proteínas conocidas.

[0051] Un polipéptido es “inmunológicamente reactivo” con un anticuerpo cuando se une a éste debido al reconocimiento por parte del anticuerpo de un epítipo específico contenido en el polipéptido. La reactividad inmunológica puede determinarse por la unión del anticuerpo, más particularmente por la cinética de la unión del anticuerpo, y/o por la competencia en la unión utilizando como competidor(es) un polipéptido(s) conocido(s) que contenga(n) un epítipo contra el que se dirige el anticuerpo. Los métodos para determinar si un polipéptido es inmunológicamente reactivo con un anticuerpo son conocidos en la técnica.

[0051] El término “aislado” significa que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se produce de forma natural). Por ejemplo, no se aísla un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un animal vivo, sino que se aísla el mismo polinucleótido o ADN o polipéptido, que se separa de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Dicho polinucleótido podría formar parte de un vector y/o dicho polinucleótido o polipéptido

podría formar parte de una composición, y seguir siendo aislado en el sentido de que el vector o la composición no forman parte de su entorno natural.

[0053] En el presente documento, los términos “marcado” y “marcado con una etiqueta (o agente o fracción) detectable” se utilizan indistintamente y especifican que una entidad (por ejemplo, un cebador o una sonda) puede visualizarse, por ejemplo, tras la unión a otra entidad (por ejemplo, un producto de amplificación o amplicón). Preferiblemente, la etiqueta detectable se selecciona de forma que genere una señal que pueda medirse y cuya intensidad esté relacionada con (por ejemplo, proporcional a) la cantidad de entidad unida. Una amplia variedad de sistemas para etiquetar y/o detectar moléculas de ácidos nucleicos, como cebadores y sondas, son bien conocidos en la técnica. Los ácidos nucleicos marcados pueden prepararse mediante la incorporación de, o la conjugación con, una etiqueta que sea directa o indirectamente detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos, químicos u otros. Los agentes detectables adecuados incluyen, entre otros, radionúclidos, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, micropartículas, enzimas, etiquetas colorimétricas, etiquetas magnéticas, haptenos, balizas moleculares, balizas de aptámeros y similares.

[0054] Tal y como se utilizan aquí, los términos “ácido nucleico”, “secuencia de ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se refieren a al menos dos nucleótidos unidos covalentemente. La representación de una sola hebra también define la secuencia de la hebra complementaria. Así, un oligonucleótido también abarca la cadena complementaria de una cadena simple representada. Un oligonucleótido también abarca los ácidos nucleicos sustancialmente idénticos y sus complementos. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, o pueden contener porciones de secuencias tanto bicatenarios como monocatenarios. El oligonucleótido puede ser ADN, tanto genómico como complementario (ADNc), ARN o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribo y ribonucleótidos, y combinaciones de bases que incluyen uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Los oligonucleótidos pueden obtenerse por métodos de síntesis química o por métodos recombinantes. Una secuencia particular de oligonucleótidos puede abarcar variantes modificadas de forma conservadora (por ejemplo, sustituciones de codones), alelos, ortólogos, polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente.

[0055] “Operablemente ligado” se refiere a una situación en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Así, por ejemplo, una secuencia de

control “operativamente ligada” a una secuencia codificadora se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0056] “Polipéptido” y “proteína” se utilizan indistintamente en este documento e indican una cadena molecular de aminoácidos unidos mediante enlaces covalentes y/o no covalentes. Los términos no se refieren a una longitud específica del producto. Por lo tanto, los péptidos, oligopéptidos y proteínas se incluyen en la definición de polipéptido. Los términos incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. Además, se incluyen en el significado de polipéptido los fragmentos de proteínas, los análogos, las proteínas mutadas o variantes, las proteínas de fusión y similares.

[0057] El término “cebador” o “cebador oligonucleotídico”, utilizado indistintamente en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de iniciación para la síntesis de ADN en condiciones adecuadas. Las condiciones adecuadas incluyen aquellas en las que se produce la hibridación del oligonucleótido con un ácido nucleico molde, y se produce la síntesis o amplificación de la secuencia objetivo, en presencia de cuatro nucleósidos trifosfatos diferentes y un agente de extensión (por ejemplo, una ADN polimerasa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Un “cebador oligonucleótido directo” o “cebador de sentido”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de iniciación para la síntesis de ADN en el extremo 5’ de una secuencia de ácido nucleico objetivo. Un “cebador oligonucleótido inverso” o “cebador antisentido”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de iniciación para la síntesis de ADN en el extremo 3’ de una secuencia de ácido nucleico diana. La frase “cebador directo” se refiere a un cebador que se hibrida con la secuencia diana (por ejemplo, la cadena molde). La frase “cebador inverso” se refiere a un cebador que se hibrida con la cadena complementaria de la secuencia diana. La frase “cebador directo” se refiere a un cebador que se hibrida con la secuencia diana (por ejemplo, la cadena molde). La frase “cebador inverso” se refiere a un cebador que se hibrida (o rectifica) con la cadena complementaria de la secuencia objetivo. El cebador directo se hibrida con la secuencia diana 5’ con respecto al cebador inverso.

[0058] Tal como se utiliza en el presente documento, la frase “conjunto de cebadores” se refiere a dos o más cebadores que juntos son capaces de cebar la amplificación de una secuencia diana o ácido nucleico diana de interés (por ejemplo, una secuencia diana dentro del PBV). En ciertas realizaciones, el término “conjunto de cebadores” se refiere a un par de cebadores que incluyen un cebador 5’ (aguas arriba) (o cebador directo) que se hibrida con el extremo 5’ de la secuencia diana o el ácido

nucleico diana a amplificar y un cebador 3' (aguas abajo) (o cebador inverso) que se hibrida con el complemento de la secuencia diana o el ácido nucleico diana a amplificar. Estos conjuntos de cebadores o pares de cebadores son particularmente útiles en las reacciones de amplificación por PCR.

[0059] Los términos “sonda” o “cebador oligonucleotídico”, utilizados indistintamente en el presente documento, se refieren a un oligonucleótido que se hibrida específicamente con una secuencia diana en un ácido nucleico, preferentemente en un ácido nucleico amplificado, en condiciones que favorecen la hibridación, para formar un híbrido detectable. Una sonda puede contener una fracción detectable (por ejemplo, una etiqueta) que puede estar unida al extremo o extremos de la sonda o puede ser interna. Los nucleótidos de la sonda que se hibridan con la secuencia de ácido nucleico objetivo no tienen por qué ser estrictamente contiguos, como puede ser el caso de una fracción detectable interna a la secuencia de la sonda. La detección puede ser directa (es decir, resultante de la hibridación de una sonda directamente a la secuencia diana o al ácido nucleico amplificado) o indirecta (es decir, resultante de la hibridación de una sonda a una estructura molecular intermedia que une la sonda a la secuencia diana o al ácido nucleico amplificado). Una sonda oligonucleotídica puede comprender secuencias específicas de la diana y otras secuencias que contribuyen a la conformación tridimensional de la sonda (por ejemplo, como se describe en, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nº 5,118,801 y 5,312,728).

[0060] Tal como se utiliza aquí, la frase “conjunto de cebadores y sondas” se refiere a una combinación que incluye dos o más cebadores que juntos son capaces de cebar la amplificación de una secuencia objetivo o ácido nucleico objetivo, y al menos una sonda que puede detectar la secuencia objetivo o el ácido nucleico objetivo. La sonda generalmente se hibrida con una cadena de un producto de amplificación (o amplicón) para formar un híbrido producto de amplificación/sonda, que puede detectarse mediante técnicas rutinarias conocidas por los expertos en la materia.

[0061] “Polipéptido purificado” o “polinucleótido purificado” se refiere a un polipéptido o polinucleótido de interés o fragmento del mismo que contiene menos de aproximadamente el 50%, preferiblemente menos de aproximadamente el 70%, y más preferiblemente, menos de aproximadamente el 90% de los componentes celulares con los que el polipéptido o polinucleótido de interés o fragmento del mismo está naturalmente asociado. Los métodos de purificación son conocidos en la técnica.

[0062] Los términos “polipéptido recombinante” o “proteína recombinante”, utilizados indistintamente en el presente documento, describen un polipéptido que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociado a la totalidad o a una parte del polipéptido al que está asociado en la naturaleza y/o está unido a un polipéptido distinto del que está unido en la naturaleza. Un polipéptido o proteína recombinante o codificado no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. También puede generarse de cualquier manera, incluida la síntesis química o la expresión de un sistema de expresión recombinante.

[0063] “Células huésped recombinantes”, “células huésped”, “células”, “líneas celulares”, “cultivos celulares” y otros términos similares que denotan microorganismos o líneas celulares eucariotas superiores cultivadas como entidades unicelulares se refieren a células que pueden ser, o han sido, utilizadas como receptores de vectores recombinantes u otro ADN transferido, e incluyen la progenie original de la célula original que ha sido transfectada.

[0064] Tal y como se utiliza aquí, “replicón” significa cualquier elemento genético, como un plásmido, un cromosoma o un virus, que se comporta como una unidad autónoma de replicación de polinucleótidos dentro de una célula.

[0065] Tal y como se utiliza en el presente documento, el término “muestra” se refiere generalmente a un material biológico que se está analizando y/o que se sospecha que contiene un analito de interés, como una secuencia del PBV. La muestra puede proceder de cualquier fuente biológica, como un hisopo o cepillo cervical, vaginal o anal, o un fluido fisiológico que incluya, pero no se limite a, sangre completa, suero, plasma, fluido intersticial, saliva, fluido del cristalino, fluido espinal cerebral, sudor, orina, leche, fluido de ascitis, moco, fluido nasal, esputo, fluido sinovial, fluido peritoneal, fluido vaginal, menstruación, fluido amniótico, semen, etc. La muestra puede utilizarse directamente tal y como se obtiene de la fuente biológica o tras un pretratamiento para modificar el carácter de la muestra. Por ejemplo, dicho pretratamiento puede incluir la preparación de plasma a partir de sangre, la dilución de fluidos viscosos, etc. Los métodos de pretratamiento pueden también implicar la filtración, la precipitación, la dilución, la destilación, la mezcla, la concentración, la liofilización, la inactivación de los componentes interferentes, la adición de reactivos, la lisis, etc. Además, también puede ser beneficioso modificar una muestra sólida para formar un medio líquido o para liberar el analito.

Preferiblemente, la muestra puede ser plasma.

[0066] El término “identidad de secuencia” se refiere al grado de similitud entre dos secuencias (por ejemplo, de ácido nucleico (por ejemplo, secuencias de oligonucleótidos o polinucleótidos) o de

aminoácidos). Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, las secuencias se alinean para lograr una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos para lograr una alineación óptima y se pueden descartar las secuencias no homólogas para la comparación). A continuación, se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o nucleótidos correspondientes. Cuando una posición de la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente de la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas que comparten las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que deben introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

[0067] “Estadísticamente significativo”, tal y como se utiliza aquí, se refiere a la probabilidad de que una relación entre dos o más variables esté causada por algo distinto al azar. La prueba de hipótesis estadística se utiliza para determinar si el resultado de un conjunto de datos es estadísticamente significativo. En la prueba de hipótesis estadística, se obtiene un resultado estadísticamente significativo siempre que el valor p observado de una estadística de prueba sea inferior al nivel de significación definido en el estudio. El valor p es la probabilidad de obtener resultados al menos tan extremos como los observados, dado que la hipótesis nula es verdadera. Entre los ejemplos de análisis estadísticos de hipótesis se encuentran la prueba de rangos con signo de Wilcoxon, la prueba t , la prueba Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher. Significativo”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un cambio que no se ha determinado como estadísticamente significativo (por ejemplo, puede no haber sido sometido a una prueba de hipótesis estadística).

[0068] “Sujeto” y “paciente”, tal como se utilizan aquí indistintamente, se refieren a cualquier vertebrado, incluyendo, pero sin limitarse a, un mamífero (por ejemplo, vaca, cerdo, camello, llama, caballo, cabra, conejo, oveja, hámster, cobaya, gato, perro, rata y ratón, un primate no humano (por ejemplo, un mono, como un mono cynomolgous o rhesus, chimpancé, etc.) y un humano). En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un humano o un no humano. El sujeto o paciente puede ser sometido a otras formas de tratamiento. En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto tiene una enfermedad respiratoria.

[0069] El término “péptido sintético”, tal y como se utiliza en el presente documento, significa una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede ser sintetizada químicamente por métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Estos péptidos sintéticos son útiles en diversas

aplicaciones.

[0070] Las frases “secuencia diana” y “ácido nucleico diana” se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a aquello cuya presencia o ausencia se desea detectar. En el contexto de la presente divulgación, una secuencia diana incluye preferentemente una secuencia de ácido nucleico con la que uno o más cebadores formarán un complejo. La secuencia diana también puede incluir una región de hibridación de la sonda con la que una sonda formará un híbrido estable en condiciones de amplificación adecuadas. Como reconocerá un experto en la materia, una secuencia diana puede ser monocatenaria o bicatenaria.

[0071] El término “transformación” se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula huésped, independientemente del método utilizado para la inserción. Por ejemplo, se incluyen la captación directa, la transducción o el apareamiento f. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido, o alternativamente, puede integrarse en el genoma del huésped.

[0072] “Tratar”, “tratando” o “tratamiento” se utilizan indistintamente en el presente documento para describir la reversión, el alivio o la inhibición del progreso de una enfermedad y/o lesión, o de uno o más síntomas de dicha enfermedad, a los que se aplica dicho término. Dependiendo de la condición del sujeto, el término también se refiere a la prevención de una enfermedad, e incluye la prevención de la aparición de una enfermedad, o la prevención de los síntomas asociados con una enfermedad. Un tratamiento puede realizarse de forma aguda o crónica. El término también se refiere a la reducción de la gravedad de una enfermedad o de los síntomas asociados a dicha enfermedad antes de padecerla. Dicha prevención o reducción de la gravedad de una enfermedad antes de la afección se refiere a la administración de una composición farmacéutica a un sujeto que no está afectado por la enfermedad en el momento de la administración. “Prevenir” también se refiere a la prevención de la reaparición de una enfermedad o de uno o más síntomas asociados a dicha enfermedad. “Tratamiento” y “terapéuticamente” se refieren al acto de tratar, tal y como se ha definido anteriormente “tratar”.

[0073] “Variante” se utiliza aquí para describir un péptido o polipéptido que difiere en su secuencia por la inserción, supresión o sustitución conservadora de aminoácidos, pero que conserva al menos una actividad biológica. Ejemplos representativos de “actividad biológica” incluyen la capacidad de unirse a un anticuerpo específico o de promover una respuesta inmunitaria. Variante también se utiliza aquí para describir una proteína con una secuencia que es sustancialmente idéntica a una proteína de referencia con una secuencia que conserva al menos una actividad biológica. Una

sustitución conservadora de un aminoácido, es decir, la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de propiedades similares (por ejemplo, hidrofilia, grado y distribución de las regiones cargadas) se reconoce en la técnica como algo que típicamente implica un cambio menor. Estos cambios menores pueden identificarse, en parte, considerando el índice hidropático de los aminoácidos, tal como se entiende en la técnica. Kyte *et al.*, *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982). El índice hidropático de un aminoácido se basa en una consideración de su hidrofobicidad y carga. Es conocido en el arte que los aminoácidos de similar hidropatía pueden ser sustituidos y seguir conservando la función de la proteína. En un aspecto, se sustituyen los aminoácidos que tienen índices hidrofílicos de ± 2 . La hidrofilia de los aminoácidos también puede utilizarse para revelar las sustituciones que darían lugar a que las proteínas retuvieran la función biológica. Una consideración de la hidrofilia de los aminoácidos

en el contexto de un péptido permite calcular la mayor hidrofilia media local de ese péptido, una medida útil que se ha informado que se correlaciona bien con la antigenicidad e inmunogenicidad. Patente de EE. UU. Nº 4,554,101, incorporada íntegramente aquí por referencia. La sustitución de aminoácidos que tienen valores de hidrofilia similares puede dar lugar a que los péptidos conserven la actividad biológica, por ejemplo, la inmunogenicidad, como se entiende en la técnica. Las sustituciones pueden realizarse con aminoácidos que tengan valores de hidrofiliidad dentro de un margen de ± 2 entre sí. Tanto el índice de hidrofobicidad como el valor de hidrofilia de los aminoácidos están influidos por la cadena lateral particular de ese aminoácido. En consonancia con esa observación, se entiende que las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica dependen de la similitud relativa de los aminoácidos, y en particular de las cadenas laterales de esos aminoácidos, tal y como revelan la hidrofobicidad, la hidrofilia, la carga, el tamaño y otras propiedades. “Variante” también puede utilizarse para describir un polipéptido o un fragmento del mismo que ha sido procesado de forma diferente, como por ejemplo mediante proteólisis, fosforilación u otra modificación postraducciona, pero que conserva su reactividad al antígeno.

[0074] Un “vector” es un replicón al que se adjunta otro segmento polinucleotídico, con el fin de provocar la replicación y/o la expresión del segmento adjunto.

[0075] Salvo que se definan de otro modo, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente divulgación tendrán el significado que comúnmente entienden los de la habilidad ordinaria en el arte. Por ejemplo, cualquier nomenclatura utilizada en relación con, y técnicas de cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y

química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos que se describen en el presente documento son los que se conocen y utilizan habitualmente en la técnica. El significado y el alcance de los términos deben ser claros; sin embargo, en caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en el presente documento prevalecen sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. Además, a menos que el contexto exija lo contrario, los términos singulares incluirán los plurales y los plurales incluirán los singulares.

2. Nuevo Picobirnavirus

[0076] En algunos aspectos, se proporciona una nueva cepa de picobirnavirus. La nueva cepa de picobirnavirus descrita en el presente documento se denomina indistintamente ABT- PBV, el inde. En algunas realizaciones, la cepa puede estar presente en muestras respiratorias. En algunas realizaciones, la cepa puede causar una enfermedad respiratoria.

[0077] El PBV comprende dos segmentos (FIG. 1A-1B). El segmento 1 tiene una longitud aproximada de 2.5 kb y codifica una proteína hipotética e hidrofílica (ORF1) de ~200 aa en un marco de lectura, y la proteína de la cápside en otro (~500 aa). El segmento 2 tiene aproximadamente 1.7 kb de longitud y codifica la RDRP.

[0078] En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona secuencias polinucleotídicas derivadas del PBV y polipéptidos codificados por el mismo. El o los polinucleótidos pueden estar en forma de ARNm o ADN. Los polinucleótidos en forma de ADN, ADNc, ADN genómico y ADN sintético están dentro del alcance de la presente divulgación. En algunos aspectos, el polinucleótido está en forma de ADN. En otros aspectos, el polinucleótido está en forma de ADNc. En otros aspectos, el polinucleótido está en forma de ADN genómico. En otro aspecto más, el polinucleótido está en forma de ADN sintético.

[0079] El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la cadena codificante (sentido) o la no codificante (antisentido). La secuencia codificante que codifica el polipéptido puede ser idéntica a la secuencia codificante aquí proporcionada o puede ser una secuencia codificante diferente cuya secuencia codificante, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, codifica el mismo polipéptido que el ADN aquí proporcionado.

[0080] Los polinucleótidos proporcionados en el presente documento pueden incluir sólo la secuencia codificadora del polipéptido, o la secuencia codificadora del polipéptido y una secuencia codificadora adicional, como una secuencia líder o secretora o una secuencia propeptica, o la secuencia codificadora del polipéptido (y opcionalmente una secuencia codificante adicional) y una

secuencia no codificante, como una secuencia no codificante 5' y/o 3' de la secuencia codificante del polipéptido.

[0081] Además, la divulgación incluye polinucleótidos variantes que contienen modificaciones tales como supresiones, sustituciones o adiciones de polinucleótidos; y cualquier modificación de polipéptidos resultante de la secuencia de polinucleótidos variante. Un polinucleótido de la presente divulgación también puede tener una secuencia codificante que es una variante natural de la secuencia codificante proporcionada en el presente documento.

[0082] Además, la secuencia codificadora del polipéptido puede fusionarse en el mismo marco de lectura con una secuencia polinucleotídica que ayude a la expresión y secreción de un polipéptido de una célula huésped, por ejemplo, una secuencia líder que funcione como secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula. El polipéptido que tiene una secuencia líder es una preproteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula huésped para formar el polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar para

una proproteína, que es la proteína más los 5' residuos de aminoácidos adicionales. Una proteína que tiene una prosequencia es una proproteína y en algunos casos puede ser una forma inactiva de la proteína. Una vez que la prosequencia se escinde, queda una proteína activa. Así, el polinucleótido de la presente divulgación puede codificar para una proteína, o para una proteína que tiene una prosequencia o para una proteína que tiene tanto una prosequencia (secuencia líder) como una prosequencia.

[0083] Los polinucleótidos de la presente divulgación también pueden tener la secuencia codificadora fusionada en el marco a una secuencia marcadora que permite la purificación del polipéptido de la presente divulgación. La secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexahistidina suministrada por un vector pQE-9 para permitir la purificación del polipéptido fusionado al marcador en el caso de un huésped bacteriano, o, por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) cuando se trata de un huésped mamífero, por ejemplo, se utilizan células COS-7. La etiqueta HA corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe. Véase, por ejemplo, I. Wilson et al., *Cell* 37:767 (1984).

[0084] Para el nuevo PBV descrito en el presente documento, la secuencia completa del segmento se proporciona en SEQ ID N°: 1. En algunas realizaciones, se proporcionan aquí polinucleótidos aislados que tienen un 50% o más de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) a la SEQ ID N°: 1 o un fragmento de lo mismos.

[0085] Para el nuevo PBV descrito en el presente documento, la secuencia de nucleótidos de la cápside se proporciona en la SEQ ID N°: 6. En algunas realizaciones, se proporcionan en el presente documento polinucleótidos aislados que tienen un 50% o más de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) a la SEQ ID N°: 6 o un fragmento de los mismos. Por ejemplo, se proporcionan en el presente documento polinucleótidos aislados de SEQ ID N°: 29, SEQ ID N°: 30, SEQ ID N°: 31, SEQ ID N°: 32, SEQ ID N°: 33, SEQ ID N°: 34, SEQ ID N°: 35, SEQ ID N°: 36, SEQ ID N°: 37, SEQ ID N°: 38, SEQ ID N°: 39, SEQ ID N°: 40, SEQ ID N°: 41, SEQ ID N°: 42, SEQ ID N°: 43, SEQ ID N°: 44 y SEQ ID N°: 45.

[0086] La secuencia completa del segmento 2 se proporciona en SEQ ID N°: 9. En algunas realizaciones, se proporcionan aquí polinucleótidos aislados que tienen un 50% o más de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) a la SEQ ID N°: 9 o un fragmento de los mismos.

[0087] La secuencia de nucleótidos de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RDRP) se proporciona en SEQ ID N°: 10. En algunas realizaciones, se proporcionan aquí polinucleótidos aislados que tienen un 50% o más de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) a la SEQ ID N°: 10 o a un fragmento de los mismos. Por ejemplo, se proporcionan en el presente documento polinucleótidos aislados de SEQ ID N°: 46, SEQ ID N°: 47, SEQ ID N°: 48, SEQ ID N°: 49, SEQ ID N°: 50, SEQ ID N°: 51, SEQ ID N°: 52, SEQ ID N°: 53, SEQ ID N°: 54, SEQ ID N°: 55, SEQ ID N°: 56, SEQ ID N°: 57, SEQ ID N°: 58, SEQ ID N°: 59, SEQ ID N°: 60, SEQ ID N°: 61, SEQ ID N°: 62 y SEQ ID N°: 63.

[0088] La presente divulgación se refiere además a polipéptidos del PBV. Los polipéptidos del PBV pueden estar codificados por cualquiera de los polinucleótidos proporcionados en el presente documento. Los polipéptidos del PBV pueden tener la secuencia de aminoácidos deducida que se proporciona en el presente documento, así como fragmentos, análogos y derivados de dichos polipéptidos. Los polipéptidos de la presente divulgación pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales purificados o polipéptidos sintéticos. El fragmento, derivado o análogo de dicho polipéptido puede ser uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos está sustituido por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado) y dicho residuo de aminoácido sustituido puede ser o no uno codificado por

el código genético; o puede ser uno en

el que uno o más de los residuos de aminoácidos incluye un grupo sustituyente; o puede ser una en la que el polipéptido esté fusionado con otro compuesto, como un compuesto para aumentar la vida media del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol); o puede ser una en la que los aminoácidos adicionales estén fusionados al polipéptido, como una secuencia líder o secretora o una secuencia que se emplee para la purificación del polipéptido o una secuencia propeptica. Tales fragmentos, derivados y análogos están dentro del alcance de la presente divulgación. Los polipéptidos y polinucleótidos de la presente divulgación se proporcionan en forma aislada, se purifican o están en forma aislada y purificada.

[0089] Por lo tanto, un polipéptido de la presente divulgación puede tener una secuencia de aminoácidos idéntica a la del polipéptido natural o diferente por variaciones menores debidas a una o más sustituciones de aminoácidos. La variación puede ser un “cambio conservador” típicamente en el rango de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos, en el que el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, la sustitución de leucina por isoleucina o treonina por serina. Por el contrario, las variaciones pueden incluir cambios no conservadores, por ejemplo, la sustitución de una glicina por un triptófano. Otras variaciones menores similares pueden incluir supresiones o inserciones de aminoácidos, o ambas. La orientación para determinar qué y cuántos residuos de aminoácidos pueden sustituirse, insertarse o eliminarse sin cambiar la actividad biológica o inmunológica puede encontrarse utilizando programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison Wis.).

[0090] La secuencia de aminoácidos de la cápside se proporciona en la SEQ ID N°: 7. Por consiguiente, se proporcionan además en el presente documento polipéptidos aislados que tienen una secuencia de aminoácidos con un 80% o más de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) a la SEQ ID N°: 7 o a un fragmento de esta.

[0091] La secuencia de aminoácidos de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RDRP) se proporciona en la SEQ ID N°: 11. Según esto, se proporcionan además polipéptidos aislados que tienen una secuencia de aminoácidos con un 80% o más de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con la SEQ ID N°: 11 o un fragmento de esta.

[0092] Además, se proporcionan aquí polipéptidos aislados que tienen un 80% o más de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) al polipéptido codificado por SEQ ID N°: 1 o un fragmento del mismo.

[0093] Además, se proporcionan aquí polipéptidos aislados que tienen un 80% o más de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) al polipéptido codificado por SEQ ID N°: 9 o un fragmento del mismo.

[0094] En algunos aspectos, se proporcionan además en el presente documento vectores que comprenden un polinucleótido como el descrito en el presente documento. Puede utilizarse cualquier vector adecuado siempre que sea replicable y viable en un huésped. Por ejemplo, en algunas realizaciones proporcionadas en el presente documento hay vectores que comprenden un polinucleótido que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia (por ejemplo, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) a SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de los mismos. Los polinucleótidos de la presente divulgación pueden incluirse en cualquiera de una variedad de vehículos de expresión, en particular vectores o plásmidos para expresar un polipéptido.

[0095] En algunas realizaciones, el vector comprende además una o más secuencias reguladoras, como un promotor. El promotor puede estar unido de forma operativa a la secuencia polinucleotídica. Las regiones promotoras pueden seleccionarse a partir de cualquier gen deseado utilizando vectores CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores adecuados son pKK232-8 y pCM7. Entre los promotores bacterianos especialmente nombrados están lacI, lacZ, T3, SP6, T7, gpt, lambda P sub R, P sub L y trp. Los promotores eucariotas incluyen el citomegalovirus (CMV) temprano inmediato, la timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV), el SV40 temprano y tardío, los LTRs del retrovirus y la metalotioneína-I del ratón. La selección del vector y el promotor apropiados está dentro del nivel de habilidad ordinaria en el arte.

[0096] Por lo general, los vectores incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permitan la transformación de una célula huésped, por ejemplo, el gen de resistencia a la ampicilina de *E. coli* y el gen de resistencia a *S. cerevisiae* TRP1, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural descendente. Tales promotores pueden derivarse de operones que codifican enzimas glicolíticas como la 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), el factor alfa, la fosfatasa ácida o las proteínas de shock térmico, entre otras. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en la fase apropiada con secuencias de iniciación y terminación

de la traducción y, preferiblemente, con una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida al espacio periplásmico o al medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluya un péptido de identificación N-terminal que imparta las características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado.

[0097] Los vectores de expresión útiles para uso bacteriano se construyen insertando una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína deseada junto con señales adecuadas de iniciación y terminación de la traducción en fase de lectura operable con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores fenotípicos seleccionables y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector y para, si es deseable, proporcionar la amplificación dentro del huésped. Huéspedes procariotas adecuados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y varias especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*, aunque también pueden emplearse otros de forma rutinaria.

[0098] Los vectores de expresión útiles para uso bacteriano comprenden un marcador seleccionable y un origen de replicación bacteriano derivados de plásmidos que comprenden elementos genéticos del conocido vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). Otros vectores incluyen, entre otros, el PKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y el GEM1 (Promega Biotec, Madison, Wis.). Estas secciones de “estructura similar” de pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural que se desea expresar. Dichos vectores incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, por ejemplo, derivados de SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fago; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN viral como vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar y pseudorabia. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo. Bacterianos: pINCY (Incyte Pharmaceuticals Inc, Palo Alto, California), pSPORT1 (Life Technologies, Gaithersburg, Md.), pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen) pBs, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pKK2330-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eucariotas: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia).

[0099] En algunas realizaciones, el vector es un vector de mamífero. Los vectores de expresión de mamíferos comprenderán un origen de replicación, un promotor y un potenciador adecuados, y también cualquier sitio de unión a ribosomas necesario, un sitio de poliadenilación, sitios de empalme donante y aceptor, secuencias de terminación de la transcripción, secuencias no transcritas que

flanquean los 5', y marcadores seleccionables como el gen de la neomicina fosfotransferasa. Las secuencias de ADN derivadas del genoma viral del SV40, por ejemplo, el origen del SV40, el promotor temprano, el potenciador, el empalme y los sitios de poliadenilación pueden utilizarse para proporcionar los elementos genéticos no transcritos necesarios. Los vectores representativos y útiles incluyen pRc/CMV y pcDNA3 (disponibles en Invitrogen, San Diego, California).

[00100] El polinucleótido deseado puede insertarse en el vector mediante diversos procedimientos. En general, el polinucleótido se inserta en sitios de endonucleasa de restricción apropiados mediante procedimientos conocidos en la técnica. Tales procedimientos y otros se consideran dentro del alcance de los expertos en la materia. El polinucleótido del vector de expresión puede estar vinculado operativamente a una(s) secuencia(s) de control de la expresión apropiada(s) (promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. El vector de expresión también puede contener un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Además, los vectores de expresión contienen preferentemente un gen para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de las células huésped transformadas, como la dihidrofolato reductasa o la resistencia a la neomicina para el cultivo de células eucariotas, o como la resistencia a la tetraciclina o a la ampicilina en *E. coli*.

[00101] La transcripción puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, normalmente de 10 a 300 pb, y que actúan sobre un prototipo para aumentar su transcripción. Algunos ejemplos son el potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100 a 270), un potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, un potenciador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores del adenovirus.

[00102] En algunas realizaciones, se proporcionan además en el presente documento células huésped que comprenden un polinucleótido o un polipéptido como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se proporcionan en el presente documento células huésped que comprenden un vector como el descrito en el presente documento. Por ejemplo, se proporcionan aquí células huésped que se han transformado con un vector que comprende un polinucleótido que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia (por ejemplo, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) a la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos del mismo. El vector que contiene la secuencia de polinucleótidos apropiada, así como un promotor o secuencias de control apropiadas, puede

emplearse para transformar un huésped apropiado para permitir que el huésped exprese un polipéptido como se describe en el presente documento.

[00103] En algunas realizaciones proporcionadas en el presente documento hay células huésped que comprenden un polipéptido como el descrito en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones proporcionadas en el presente documento hay células huésped que expresan un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) a la SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 11, o fragmentos del mismo. En otras realizaciones proporcionadas en el presente documento hay células huésped que expresan un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica codificada por SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 9, o fragmentos de esta.

[00104] La célula huésped utilizada aquí puede ser una célula eucariota superior, como una célula de mamífero, o una célula eucariota inferior, como una célula de levadura, o la célula huésped puede ser una célula procariota, como una célula bacteriana. La introducción de la construcción en la célula huésped puede realizarse mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-Dextrano o electroporación (L. Davis et al., “Basic Methods in Molecular Biology”, 2ª edición, Appleton and Lang, Paramount Publishing, East Norwalk, Conn. [1994]). Como ejemplos representativos de hospedadores apropiados, se pueden mencionar: células bacterianas, como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*; *Streptomyces* sp.; células fúngicas, como la levadura; células de insecto, como *Drosophila* y Sf9; células animales, como ovario de hámster chino (CHO), COS o melanoma de Bowes; células vegetales, etc. En algunas realizaciones, las células huésped son células de mamífero. También pueden emplearse diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar la proteína recombinante. Los ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono descritas por Gluzman, *Cell* 23:175 (1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, como las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. La selección de un huésped apropiado se considera dentro del alcance de los expertos en la materia a partir de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

[00105] Los vectores en células huésped pueden utilizarse de manera convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia polinucleotídica. Alternativamente, los polipéptidos de la divulgación pueden producirse sintéticamente mediante sintetizadores de péptidos convencionales.

[00106] Los polipéptidos pueden expresarse en células de mamíferos, levaduras, bacterias u otras

células bajo el control de promotores adecuados. También pueden emplearse sistemas de traducción sin células para producir dichas proteínas utilizando ARN derivados de las construcciones de ADN de la presente divulgación. Los vectores de clonación y expresión adecuados para su uso con huéspedes procariotas y eucariotas se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), que se incorpora por referencia.

[00107] Tras la transformación de una cepa huésped adecuada y el crecimiento de la cepa huésped hasta una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se suprime por medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o inducción química), y las células se cultivan durante un período adicional. Las células se cosechan típicamente por centrifugación, se desbaratan por medios físicos o químicos, y el extracto crudo resultante se conserva para su posterior purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden ser desbaratadas por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación- descongelación, sonicación, desbaratamiento mecánico o uso de agentes lisadores de células; tales métodos son bien conocidos por el artesano ordinario.

[00108] Los polipéptidos derivados del PBV pueden recuperarse y purificarse a partir de los cultivos celulares mediante métodos conocidos, como la precipitación con sulfato de amonio o etanol, la extracción con ácidos, la cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, la cromatografía de fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrofóbica, la cromatografía de hidroxipatita o la cromatografía de lectinas. Es preferible tener bajas concentraciones (aproximadamente 0.1-5 mM) de iones de calcio presentes durante la purificación (Price et al., *J. Biol. Chem.* 244:917 [1969]). Para completar la configuración de la proteína se pueden utilizar pasos de replegado de esta, según sea necesario. Por último, puede emplearse la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para los pasos finales de purificación.

[00109] Los polipéptidos de la presente divulgación pueden ser productos purificados naturalmente expresados a partir de una línea celular de alta expresión, o un producto de procedimientos químicos sintéticos, o producidos por técnicas recombinantes a partir de un huésped procariota o eucariota (por ejemplo, por células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos en cultivo). Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente divulgación pueden estar glicosilados con carbohidratos de mamíferos u otros eucariotas o pueden no estar glicosilados. Los polipéptidos de la divulgación también pueden incluir un residuo de aminoácido inicial de metionina.

[00110] La presente divulgación incluye además versiones modificadas de los polipéptidos descritos en el presente documento, tales polipéptidos que comprenden sitios de glicosilación inactivados, eliminación de secuencias tales como residuos de cisteína, eliminación del sitio de procesamiento proteolítico, y similares.

3. Cebadores y Sondas

[00111] En algunos aspectos, se proporcionan aquí cebadores, sondas y conjuntos que comprenden los mismos para detectar el picobirnavirus humano (PBV) en un sujeto.

[00112] En algunas realizaciones, se proporcionan aquí cebadores para amplificar el PBV en una muestra. En algunas realizaciones, el cebador es cualquier cebador adecuado derivado de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de los mismos.

En algunas realizaciones, el cebador es cualquier cebador adecuado que sea un complemento derivado de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, el cebador tiene un 80% o más de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con la secuencia de SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, o sus complementos.

[00113] En algunas realizaciones, el cebador tiene una secuencia de SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, o sus complementos. En algunas realizaciones, el cebador tiene una secuencia de SEQ ID N°: 13 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, el cebador tiene una secuencia de SEQ ID N°: 14 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, el cebador tiene una secuencia de SEQ ID N°: 16 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, el cebador tiene una secuencia de SEQ ID N°: 17 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, el cebador tiene una secuencia de SEQ ID N°: 18 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, el cebador tiene una secuencia de SEQ ID N°: 19 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, el cebador tiene una secuencia de SEQ ID N°: 20 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, el cebador tiene una secuencia de SEQ ID N°: 21 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, el cebador tiene una secuencia de SEQ ID N°: 22 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, el cebador tiene una secuencia de SEQ ID N°: 23 o un complemento de esta.

[00114] En algunas realizaciones, el cebador está marcado con una etiqueta detectable. Uno o más cebadores (por ejemplo, los uno o más cebadores pueden ser: (i) derivados de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de los mismos; (ii) un complemento derivado de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de los mismos; o (iii) SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, complementos de los mismos) pueden estar marcados con una etiqueta detectable.

[00115] En algunos aspectos, se proporcionan sondas para detectar el PBV en una muestra. En algunas realizaciones, la sonda es cualquier sonda adecuada derivada de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de esta. En algunas realizaciones, la sonda es un complemento derivado de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos del mismo. En algunas realizaciones, se proporciona una sonda para detectar el PBV en una muestra, la sonda tiene una secuencia que tiene un 80% o más de identidad de secuencia con una secuencia de SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26, SEQ ID N°: 27, SEQ ID N°: 28 o sus complementos. Por ejemplo, la sonda puede tener un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26, SEQ ID N°: 27, SEQ ID N°: 28 o sus complementos. En algunas realizaciones, la sonda tiene una secuencia de SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26, SEQ ID N°: 27, SEQ ID N°: 28 o complementos de esta. En algunas realizaciones, la sonda tiene una secuencia de SEQ ID N°: 15 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, la sonda tiene una secuencia de SEQ ID N°: 24 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, la sonda tiene una secuencia de SEQ ID N°: 25 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, la sonda tiene una secuencia de SEQ ID N°: 26 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, la sonda tiene una secuencia de SEQ ID N°: 27 o un complemento de esta. En algunas realizaciones, la sonda tiene una secuencia de SEQ ID N°: 28 o un complemento de esta.

[00116] En algunas realizaciones, la sonda está marcada con una etiqueta detectable. En algunos aspectos, una o más sondas pueden ser: (i) derivadas de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de las mismas; (ii) un complemento derivado de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de los mismos; o (iii) SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26, SEQ ID N°: 27, SEQ ID N°: 28, o complementos de los mismos) están marcados con una etiqueta detectable.

[00117] En algunos aspectos, se proporcionan aquí composiciones para amplificar el PBV en una muestra. La composición puede comprender dos o más cebadores como los que se describen en el presente documento (por ejemplo, un conjunto de cebadores). En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un cebador directo que tiene una secuencia con al menos 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) a la secuencia de SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18 o un complemento de los mismos, y al menos un cebador inverso que tenga una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) a SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23 o un complemento de los mismos.

[00118] En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un cebador directo que tiene una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con la SEQ ID N°: 13 o un complemento de esta y al menos un cebador inverso que tenga una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con la SEQ ID N°: 14 o un complemento del mismo.

[00119] En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un cebador directo que tiene una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) a la SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, o un complemento del mismo y al menos un cebador inverso que tenga una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con la SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, o sus complementos. En algunas realizaciones, la composición comprende un cebador directo y un cebador inverso. En algunas realizaciones, la composición comprende dos o más cebadores directos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) y dos o más cebadores inversos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más).

[00120] En algunas realizaciones, la composición comprende además al menos una sonda. La composición puede comprender además cualquier sonda descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición comprende además una sonda que tiene una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con SEQ ID N°: 15 o un complemento del mismo. En algunas

realizaciones, la composición comprende además una sonda que tiene una secuencia con al menos 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) a la SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26, SEQ ID N°: 27, SEQ ID N°: 28, o sus complementos. En algunas realizaciones, la composición comprende una sonda. En algunas realizaciones, la composición comprende dos o más sondas (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más).

[00121] En algunos aspectos, se proporcionan composiciones para amplificar y detectar el PBV en una muestra. La composición puede comprender cualquier combinación adecuada de cebadores y sondas descritas en el presente documento (por ejemplo, un conjunto de cebadores y sondas). En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un cebador directo, al menos un cebador inverso y al menos una sonda pueden ser: (i) derivados de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de los mismos; o (ii) un complemento derivado de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de los mismos. La composición puede comprender un cebador directo o más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4 o más). La composición puede comprender un cebador inverso o más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más). La composición puede comprender una sonda o más de una (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más) sondas. Cualquiera o todos los al menos un cebador directo, al menos un cebador inverso y al menos una sonda pueden estar marcados con una o más etiquetas detectables.

[00122] En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un cebador directo que tiene una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) a la SEQ ID N°: 13 o un complemento de esta, al menos un cebador inverso que tenga una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con la SEQ ID N°: 14 o un complemento de esta, y una sonda que tenga una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con la SEQ ID N°: 15 o un complemento de esta. Por ejemplo, la composición puede comprender un cebador directo que tenga la secuencia de la SEQ ID N°: 13 o un complemento de esta, el cebador inverso que tenga la secuencia de la SEQ ID N°: 14 o un complemento de esta, y la sonda que tenga la secuencia de la SEQ ID N°: 15 o un complemento de esta. Dichas composiciones serían útiles para detectar la cápside del PBV. Los cebadores y/o sondas pueden estar marcados con una o más etiquetas detectables.

[00123] En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un cebador directo que tiene

una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) a la SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, o complementos de esta, al menos un cebador inverso que tenga una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% (por ejemplo, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%) con la SEQ ID N°: 19, la SEQ ID N°: 20, la SEQ ID N°: 21, la SEQ ID N°: 22, la SEQ ID N°: 23, o complementos de esta, y una sonda que tenga una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con la SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26, SEQ ID N°: 27, SEQ ID N°: 28, o sus complementos. La composición puede comprender un cebador directo o más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4 o más). La composición puede comprender un cebador inverso o más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más). La composición puede comprender una sonda o más de una (por ejemplo, 2,3,4,5, o más) sonda. Dicha composición sería útil para detectar la RDRP del PBV.

[00124] Pueden prepararse uno o más análogos de oligonucleótidos basados en los cebadores y sondas de la presente divulgación. Dichos análogos pueden contener estructuras alternativas tales como ácidos nucleicos peptídicos o “PNAs” (por ejemplo, moléculas con una espina dorsal similar a la de los péptidos en lugar de la espina dorsal del azúcar fosfato de los ácidos nucleicos naturales) y similares. Estas estructuras alternativas también se incluyen en los cebadores y sondas de la presente divulgación. Del mismo modo, se entiende que los cebadores y sondas de la presente divulgación pueden contener supresiones, adiciones y/o sustituciones de bases de ácido nucleico, en la medida en que dichas alteraciones no afecten negativamente a las propiedades de estas secuencias. En particular, las alteraciones no deben dar lugar a una disminución significativa de las propiedades de hibridación de los cebadores y sondas descritos en el presente documento. Los cebadores y las sondas de la presente divulgación pueden prepararse mediante cualquiera de los diversos métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., “Molecular Cloning. A Laboratory Manual”, 1989, 2. Supp. Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press: Nueva York, NY; “PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications ,” 1990, M. A. Innis (Ed.), Academic Press: Nueva York, NY; P. Tijssen “Hybridization with Nucleic Acid Probes- Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Parts I and II),” 1993, Elsevier Science; “PCR Strategies,” 1995, M. A. Innis (Ed.), Academic Press: Nueva York, NY; y “Short Protocols in Molecular Biology ’,” 2002, F. M. Ausubel (Ed.), 5. Supp. Ed., John Wiley & Sons: Secaucus, NJ). Por ejemplo, los cebadores y sondas descritos en el presente documento pueden prepararse mediante síntesis química

y polimerización a partir de un molde como se describe, por ejemplo, en Narang et al., *Meth. Enzymol*, 1979, 68: 90-98; Brown et al., *Meth. Enzymol*, 1979, 68: 109-151 y Belousov et al., *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25: 3440-3444).

[00125] Las síntesis pueden realizarse en sintetizadores de oligo, como los disponibles comercialmente en Perkin Elmer/ Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA), DuPont (Wilmington, DE) o Milligen (Bedford, MA). Alternativamente, los cebadores y las sondas de la presente divulgación pueden hacerse a medida y pedirse a una variedad de fuentes comerciales bien conocidas en el arte, incluyendo, por ejemplo, Midland Certified Reagent Company (Midland, TX), ExpressGen, Inc. (Chicago, IL), Operon Technologies, Inc. (Huntsville, AL), BioSearch Technologies, Inc. (Novato, CA), y muchas otras.

[00126] La purificación de los cebadores y las sondas de la presente divulgación, cuando sea necesario o se desee, puede llevarse a cabo por cualquiera de una variedad de métodos bien conocidos en la técnica. La purificación de los cebadores y las sondas puede realizarse mediante electroforesis en gel de acrilamida nativa, mediante HPLC de intercambio aniónico, como se describe, por ejemplo, en Pearson et al., *J. Chrom.*, 1983, 255: 137-149 o por HPLC de fase inversa (Véase, McFarland et al., *Nucleic Acids Res.*, 1979, 7: 1067- 1080).

[00127] Como se ha mencionado anteriormente, los cebadores y sondas modificados pueden prepararse utilizando cualquiera de los diversos medios conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones incluyen la metilación, la sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, y las modificaciones de los internucleótidos como, por ejemplo, aquellos con enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), o enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.). Los cebadores y las sondas pueden contener una o más partes adicionales enlazadas covalentemente, como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), quelantes (por ejemplo, para quelar metales, metales radiactivos, metales oxidantes, etc.), y alquiladores. Los cebadores y las sondas también pueden derivarse mediante la formación de un metil o etil fosfotriéster o un enlace de fosforamidato de alquilo. Además, los cebadores y/o sondas de la presente divulgación pueden modificarse con una etiqueta detectable.

[00128] Como se ha discutido brevemente en el presente documento, en algunas realizaciones, los cebadores y/o las sondas pueden ser marcados con una etiqueta o fracción detectable antes de ser

utilizados en uno o más métodos de amplificación/detección. Preferiblemente, para su uso en los métodos descritos en el presente documento, una o más sondas se etiquetan con una etiqueta o fracción detectable. La función de una etiqueta detectable es permitir la visualización y/o detección de las secuencias diana amplificadas (por ejemplo, amplicones). Preferiblemente, la etiqueta detectable se selecciona de manera que genere una señal que pueda medirse y cuya intensidad esté relacionada (por ejemplo, proporcionalmente) con la cantidad de producto de amplificación en la muestra de ensayo que se está analizando.

[00129] La asociación entre una o más sondas marcadas y la etiqueta detectable puede ser covalente o no covalente. Las sondas marcadas pueden prepararse mediante la incorporación o conjugación de una fracción detectable. Las etiquetas pueden unirse directamente a la secuencia de ácido nucleico o indirectamente (por ejemplo, a través de un enlazador). Los enlazadores o brazos espaciadores de varias longitudes son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente, y pueden seleccionarse para reducir el impedimento estérico, o para conferir otras propiedades útiles o deseadas a las moléculas marcadas resultantes (Véase, por ejemplo, Mansfield et al., *Mol. Cell. Probes*, 1995, 9: 145-156).

[00130] Los métodos para etiquetar oligonucleótidos, como cebadores y/o sondas, son bien conocidos por los expertos en la materia. Se pueden encontrar revisiones de protocolos de marcado y técnicas de detección de etiquetas en, por ejemplo, L. J. Kricka, *Ann. Clin.*

Biochem., 2002, 39: 114-129; van Gijlswijk et al, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2001, 1: 81-91; y Joos et al, *J. Biotechnol.*, 1994, 35: 135- 153. Los métodos estándar de marcado de ácidos nucleicos incluyen: la incorporación de agentes radiactivos, la fijación directa de tinciones fluorescentes (véase Smith et al., *Nucl. Acids Res.*, 1985, 13: 2399-2412) o enzimas (véase Connolly et al., *Nucl. Acids Res.*, 1985, 13: 4485-4502); las modificaciones químicas de las moléculas de ácidos nucleicos que las hacen detectables inmunológicamente o mediante otras reacciones de afinidad (véase Broker et al., *Nucl. Acids Res.*, 1978, 5: 363-384; Bayer et al., *Methods of Biochem. Analysis*, 1980, 26: 1-45; Langer et al., *Proc. Acad. Sci. USA*, 1981, 78: 6633-6637; Richardson et al., *Nucl. Acids Res.*, 1983, 11 : 6167-6184; Brigati et al., *Virology*, 1983, 126: 32-50; Tchen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81 : 3466-3470; Landegent et al., *Exp.*

Cell Res., 1984, 15: 61-72; y A. H. Hopman et al., *Exp. Cell Res.*, 1987, 169: 357-368); y los métodos de marcado mediado por enzimas, como el cebado aleatorio, la traducción en fragmentos (nick translation), la PCR y el tailing con transferasa terminal (Para una revisión del marcado enzimático, véase, por ejemplo, Temsamani et al. *Biotechnol.*, 1996, 5: 223-232). En la presente divulgación

puede utilizarse cualquiera de una amplia variedad de etiquetas detectables.

[00131] Las etiquetas detectables adecuadas incluyen, pero no se limitan a, varios ligandos, radionúclidos o radioisótopos (por ejemplo, ^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I , y similares); tinciones fluorescentes; agentes quimioluminiscentes (por ejemplo, ésteres de acridinio, dioxetanos estabilizados y similares); nanocristales fluorescentes inorgánicos con resolución espectral (por ejemplo, puntos cuánticos), nanopartículas metálicas (por ejemplo, oro, plata, cobre y platino), oro, plata, cobre y platino) o nanoclusters; enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); etiquetas colorimétricas (por ejemplo, tinciones, oro coloidal y similares); etiquetas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™); y biotina y dioxigenina, u otros haptenos y proteínas para antisueros o anticuerpos monoclonales. En ciertas realizaciones, las sondas contempladas están marcadas con fluorescencia.

[00132] Numerosas moléculas de marcado fluorescente conocidas de una amplia variedad de estructuras químicas y características físicas son adecuadas para su uso en la práctica de esta divulgación. Las tinciones fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, los tinciones Quasar® disponibles en Biosearch Technologies, Novato, CA), fluoresceína y tinciones de fluoresceína (por ejemplo, isotiocianina de fluoresceína (FITC), naftofluoresceína, 4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxi-fluoresceína, 6-carboxifluoresceínas (por ejemplo, FAM), VIC, NED, carbocianina, merocianina, tinciones de estireno, tinciones de oxonol, ficoeritrina, eritrosina, eosina, tinciones de rodamina (p. ej, carboxitetrametilrodamina o TAMRA, carboxirodamina 6G, carboxi-X-rodamina (ROX), lisamina rodamina B, rodamina 6G, rodamina verde, rodamina roja, tetrametilrodamina o TMR), tinciones de cumarina y cumarina (por ejemplo, metoxicumarina, dialquilaminocumarina, hidroxycumarina y aminometilcumarina o AMCA), tinciones verdes de Oregón (por ejemplo, verde de Oregón 488, verde de Oregón 500, verde de Oregón 514), rojo de Texas, rojo de Texas-X, rojo de Spectrum™, verde de Spectrum™, tinciones de cianina (por ejemplo, Cy-3™, Cy- 5™, Cy-3.5™, Cy-5.5™), tinciones Alexa Fluor (por ejemplo, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660 y Alexa Fluor 680), tinciones BODIPY (por ejemplo, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, BODIPY TR, BODIPY 530/550, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665), tinciones IRD (por ejemplo, IRD40, IRD 700, IRD

800), y similares. Los ejemplos de otras tinciones fluorescentes adecuados que pueden utilizarse y

los métodos para enlazar o incorporar tinciones fluorescentes a los oligonucleótidos, como las sondas, pueden encontrarse en RP Haugland, “The Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals”, Publisher, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg. (junio de 1992)). Las tinciones fluorescentes, así como los kits de marcado, están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Amersham Biosciences, Inc. (Piscataway, N. J.), Molecular Probes Inc. (Eugene, OR), y New England Biolabs Inc. (Beverly, MA). En lugar de ser directamente detectables, algunos grupos fluorescentes (donantes) transfieren energía a otro grupo fluorescente (aceptor) en un proceso de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), y el segundo grupo produce la señal fluorescente detectable. En estas realizaciones, la sonda puede, por ejemplo, ser detectable cuando se hibrida con una secuencia diana amplificada.

Entre los ejemplos de pares aceptor/donante de FRET adecuados para su uso en la presente divulgación se incluyen, por ejemplo, fluoresceína/tetrametilrodamina, IAEDANS/FITC, IAEDANS/5-(yodoacetomido)fluoresceína, B-ficoeritrina/Cy-5, y EDANS/Dabcyl, entre otros.

[00133] Los pares FRET también incluyen el uso de pares reportero/apagador fluorescente vinculados físicamente. Por ejemplo, una etiqueta detectable y una fracción quencher pueden estar unidas individualmente al extremo 5’ o al extremo 3’ de una sonda, colocando así la etiqueta detectable y la fracción quencher en extremos opuestos de la sonda, o separadas entre sí a lo largo de la longitud de la sonda. Durante el tiempo en que la sonda no está unida a su secuencia diana, la etiqueta detectable y la fracción quencher se mantienen reversiblemente dentro de una proximidad tal que el quencher bloquea la detección de la etiqueta detectable. Cuando la sonda se une a la secuencia diana, la etiqueta detectable y la fracción quencher se separan, lo que permite la detección de la etiqueta detectable en las condiciones adecuadas.

[00134] El uso de estos sistemas en los ensayos TaqMan® (como se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses N° 5,210,015; 5,804,375; 5,487,792 y 6,214,979) o como Molecular Beacons (como se describe, por ejemplo, en Tyagi et al, Nature Biotechnol, 1996, 14: 303- 308; Tyagi et al, Nature Biotechnol, 1998, 16: 49-53; Kostrikis et al., Science, 1998, 279: 1228- 1229; Sokol et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1998, 95: 11538-11543; Marras et al., Genet. Anal, 1999, 14: 151-156; y Patente EE. UU. N° 5,846,726; 5,925,517; 6,277,581 y 6,235,504) es bien conocido por los expertos en la materia. Con el formato de ensayo TaqMan®, los productos de la reacción de amplificación pueden detectarse a medida que se forman en “tiempo real”: los híbridos producto de amplificación/sonda se forman y detectan mientras la mezcla de reacción está en condiciones de amplificación.

[00135] En algunas realizaciones de la presente divulgación, las sondas de detección de la PCR son sondas tipo TaqMan® que están marcadas en el extremo 5' con una fracción fluorescente y en el extremo 3' con una fracción atenuadora o, alternativamente, la fracción fluorescente y la fracción de atenuadora están en orden inverso, o además pueden colocarse a lo largo de la secuencia para proporcionar una separación adecuada cuando la sonda se hibrida con una secuencia objetivo para permitir la detección satisfactoria de la fracción fluorescente. Los fluoróforos y los atenuadores adecuados para su uso con las sondas TaqMan® se describen en las patentes estadounidenses nº 5.210.015, 5.804.375, 5.487.792 y 6.214.979, y en el documento WO 01/86001. Entre los ejemplos de atenuadores se incluyen, pero no se limitan, al DABCYL (p. ej, ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)-benzoico) éster de succinimidilo, ácido carboxílico de diarilrhodamina, éster de succinimidilo (o QSY-7), y ácido carboxílico de 4',5'-dinitrofluoresceína, éster de succinimidilo (o QSY-33) (todos ellos disponibles en Molecular Probes (que forma parte de Invitrogen, Carlsbad, CA)), atenuador 1 (Q1; disponible en Epoch Biosciences, Bothell, WA), o los “Black hole quenchers” BHQ-I, BHQ-2 y BHQ-3 (disponibles en BioSearch Technologies, Inc. , Novato, CA). En ciertas realizaciones, las sondas de detección de PCR son sondas similares a TaqMan® que están marcadas en el extremo 5' con FAM y en el extremo 3' con un Black Hole Quencher® o Black Hole Quencher® plus (Biosearch Technologies, Novato, CA).

[0136] También se puede añadir una “cola” de nucleótidos normales o modificados a las sondas con fines de detectabilidad. Una segunda hibridación con ácido nucleico complementario a la cola y que contenga uno o más rótulos detectables (como, por ejemplo, fluoróforos, enzimas o bases que hayan sido marcadas radioactivamente) permite la visualización de los híbridos amplicón/sonda.

[0137] La selección de una técnica de etiquetado particular puede depender de la situación y puede ser gobernada por varios factores, tales como la facilidad y el costo del método de etiquetado, el espaciamiento espectral entre las diferentes etiquetas detectables utilizadas, la calidad del etiquetado de la muestra deseada, los efectos de la fracción detectable en la reacción de hibridación (por ejemplo, en la tasa y/o eficiencia del proceso de hibridación), la naturaleza del método de amplificación utilizado, la naturaleza del sistema de detección, la naturaleza e intensidad de la señal generada por la etiqueta detectable, y similares.

4. Métodos de detección del PBV

[0138] En algunos aspectos, se proporcionan aquí métodos de detección del PBV en una muestra.

[0139] En algunas realizaciones, se proporcionan en el presente documento métodos de detección del PBV en una muestra, que comprenden el contacto de la muestra con al menos un cebador y/o al

menos una sonda. En algunas realizaciones, los métodos se llevan a cabo mediante PCR. En algunas realizaciones, los métodos se llevan a cabo mediante hibridación fluorescente in situ (FISH). Por ejemplo, los cebadores y/o las sondas pueden ser adecuados para las técnicas de PCR o FISH. El al menos un cebador y/o la al menos una sonda pueden estar marcados con al menos una etiqueta detectable. En algunas realizaciones, el PBV comprende la secuencia de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, o una combinación de estas.

[0140] Los métodos comprenden el contacto de la muestra con cualquier combinación adecuada de cebadores y sondas como se describe en el presente documento. La presente divulgación proporciona métodos para detectar la presencia de PBV en una muestra de ensayo. Además, los niveles de PBV pueden cuantificarse por muestra de ensayo comparando los valores de detección de la muestra de ensayo con curvas estándar generadas utilizando diluciones en serie de suspensiones previamente cuantificadas de una o más secuencias de PBV u otros perfiles de PBV estandarizados.

[0141] En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra con una composición descrita en el presente documento. Por ejemplo, el método puede comprender poner en contacto la muestra con un conjunto de cebadores y sondas descrito en el presente documento. Por ejemplo, el método puede comprender poner en contacto la muestra con al menos un cebador directo, al menos un cebador inverso, y al menos una sonda, puede ser: (i) derivada de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de estos; o (ii) un complemento derivado de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de los mismos. Cualquiera o todos los al menos un cebador directo, al menos un cebador inverso y al menos una sonda pueden estar etiquetados con una o más etiquetas detectables.

[0142] En algunas realizaciones, el método puede comprender el contacto de la muestra con un conjunto de cebadores y sondas adecuado para detectar la cápside del PBV. Por ejemplo, el método puede comprender poner en contacto la muestra con un cebador directo que tenga una secuencia con al menos 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con SEQ ID N°: 13 o un complemento de esta, un cebador inverso que tenga una secuencia con al menos 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con la SEQ ID N°: 14 o un complemento de esta, y una sonda que tenga una secuencia con al menos 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con la SEQ ID N°: 15 o un complemento de esta.

[0143] En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra con un conjunto

de cebadores y sondas adecuado para detectar la RDRP del PBV. Por ejemplo, el método puede comprender poner en contacto la muestra con al menos un cebador directo que tenga una secuencia con al menos 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, o complementos de los mismos, al menos un cebador inverso que tenga una secuencia con al menos 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) con la SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, o sus complementos, y una sonda que tenga una secuencia con al menos 80% de identidad de secuencia (por ejemplo 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con la SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26, SEQ ID N°: 27, SEQ ID N°: 28 o sus complementos. El método puede comprender el contacto de la muestra con un cebador directo o más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4 o más). El método puede comprender el contacto de la muestra con un cebador inverso o más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más) cebadores inversos. El método puede comprender el contacto de la muestra con una sonda o más de una (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más) sondas.

[0144] En algunas realizaciones, los métodos para detectar el PBV en una muestra comprenden poner en contacto la muestra con al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso en condiciones de amplificación para generar una primera secuencia objetivo, y detectar la hibridación entre la primera secuencia objetivo y al menos una sonda como indicación de la presencia del PBV en la muestra. Las condiciones de amplificación pueden comprender someter la muestra a una reacción de amplificación llevada a cabo en presencia de reactivos de amplificación adecuados. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación comprende PCR, PCR en tiempo real o PCR de transcriptasa inversa.

[0145] El uso de los cebadores o conjuntos de cebadores de la presente divulgación para amplificar las secuencias diana del PBV en las muestras de ensayo no se limita a ninguna técnica de amplificación de ácidos nucleicos en particular ni a ninguna modificación particular de esta. De hecho, los cebadores y conjuntos de cebadores de la presente divulgación pueden emplearse en cualquiera de una variedad de métodos de amplificación de ácido nucleico que se conocen en la técnica (Véase, por ejemplo, Kimmel et al., *Methods Enzymol.*, 1987, 152: 307-316; Sambrook et al., “*Molecular Cloning. A Laboratory Manual*”, 1989, 2.Supp. Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press: Nueva York, NY; “*Short Protocols in Molecular Biology*”, F. M. Ausubel (Ed.), 2002, 5.Supp. Ed. Supp. Ed., John Wiley & Sons: Secaucus, NJ).

[0146] Tales métodos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se describe en un número de referencias, tales como, pero no limitadas a, “PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications”, M. A. Innis (Ed.), 1990, Academic Press: Nueva York; “PCR Strategies”, M. A. Innis (Ed.), 1995, Academic Press: Nueva York; “Polymerase chain reaction: basic principles and automation in PCR. A Practical Approach”, McPherson et al. (Eds.), 1991, IRL Press: Oxford; Saiki et al., *Nature*, 1986, 324: 163; y las patentes estadounidenses nº 4.683.195, 4.683.202 y 4.889.818. También se incluyen variaciones de la PCR, como los ensayos basados en TaqMan® (véase Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1991, 88: 7276-7280), y la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (o RT-PCR, descrita, por ejemplo, en las patentes estadounidenses nº 5.322.770 y 5.310.652).

[0147] Generalmente, en la PCR, un par de cebadores se añade a una muestra de prueba obtenida de un sujeto (y por lo tanto se pone en contacto con la muestra de prueba) en exceso para hibridar con las hebras complementarias del ácido nucleico objetivo. Cada uno de los cebadores es extendido por una ADN polimerasa utilizando la secuencia diana como plantilla. Los productos de extensión se convierten en objetivos tras la disociación (desnaturalización) de la cadena objetivo original. A continuación, la polimerasa hibrida y extiende nuevos cebadores, y el ciclo se repite para aumentar exponencialmente el número de amplicones. Ejemplos de ADN polimerasas capaces de producir productos de extensión de cebadores en reacciones de PCR incluyen, pero no se limitan a, la ADN polimerasa I de *E. coli*, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, la ADN polimerasa T4, las ADN polimerasas termoestables aisladas de *Thermus aquaticus* (Taq), disponibles en una variedad de fuentes (por ejemplo, Perkin Elmer, Waltham, MA), *Thermus thermophilus* (USB Corporation, Cleveland, OH), *Bacillus stearothermophilus* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), AmpliTaq Gold® Enzyme (Applied Biosystems, Foster City, CA), ADN polimerasa recombinante de *Thermus thermophilus* (rTth) (Applied Biosystems, Foster City, CA) o *Thermococcus litoralis* (polimerasa “Vent”, New England Biolabs, Ipswich, MA). Las secuencias diana de ARN pueden amplificarse primero mediante la transcripción inversa (RT) del ARNm en ADNc y, a continuación, realizando la PCR (RT-PCR), como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, puede usarse una sola enzima para ambos pasos, como se describe en la Patente de EE. UU. nº 5.322.770.

[0148] Además de los métodos de amplificación térmica enzimática descritos anteriormente, pueden emplearse reacciones de amplificación enzimática isotérmica para amplificar secuencias de PBV utilizando cebadores y conjuntos de cebadores de la presente divulgación (Andras et al., *Mol. Biotechnol.*, 2001, 19: 29-44). Estos métodos incluyen, entre otros, la Amplificación Mediada por

Transcripción (TMA; la TMA se describe en Kwoh et al., Proc. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 1173-1177; Giachetti et al., J. Clin. Microbiol, 2002, 40: 2408-2419; y Patente de EE. UU. Nº 5,399,491); Replicación de Secuencia Autosustentable (3SR; 3SR se describe en Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87: 1874-1848; y Fahy et al., PCR Methods and Applications, 1991, 1 : 25-33); Amplificación de Ácidos Nucleicos Basado en Secuencia (NASBA; NASBA se describe en, Kievits et al., J. Virol. Methods, 1991, 35: 273-286; y Patente de EE. UU. Nº 5,130,238) y Amplificación de Desplazamiento de Cadena (SDA; SDA se describe en Walker et al., PNAS, 1992, 89: 392-396; EP 0 500 224 A2).

[0149] En ciertas realizaciones de la presente divulgación, las sondas aquí descritas se utilizan para detectar los productos de amplificación generados por la reacción de amplificación. Las sondas descritas en el presente documento pueden emplearse utilizando una variedad de metodologías homogéneas o heterogéneas bien conocidas.

[0150] Los métodos de detección homogéneos incluyen, pero no se limitan a, el uso de etiquetas de FRET que se unen a las sondas y que emiten una señal en presencia de la secuencia objetivo, Balizas Moleculares (Ver, Tyagi et al., Nature Biotechnol., 1996, 14: 303-308; Tyagi et al., Nature Biotechnol, 1998, 16: 49-53; Kostrikis et al., Science, 1998, 279: 1228- 1229; Sokol et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 11538-11543; Marras et al., Genet. Anal, 1999, 14: 151-156; y Patente de EE. UU. Nº 5,846,726, 5,925,517, 6,277,581 y 6,235,504), y los ensayos TaqMan® (Ver, Patente de EE. UU. Nº 5,210,015; 5,804,375; 5,487,792 y 6,214,979 y WO 01/86001). Mediante estas técnicas de detección, los productos de la reacción de amplificación pueden detectarse a medida que se forman, es decir, en tiempo real. Como resultado, los híbridos producto de amplificación/sonda se forman y detectan mientras la mezcla de reacción está bajo condiciones de amplificación.

[0151] En ciertas realizaciones, las sondas de la presente divulgación se utilizan en un ensayo TaqMan®. En un ensayo TaqMan®, el análisis se realiza junto con el ciclo térmico mediante la monitorización de la generación de señales de fluorescencia. El sistema de ensayo tiene la capacidad de generar datos cuantitativos que permiten determinar el número de copias del objetivo. Por ejemplo, se pueden generar curvas estándar utilizando diluciones en serie de suspensiones previamente cuantificadas de una o más secuencias de PBV, con las que se pueden comparar muestras desconocidas. El ensayo TaqMan® se realiza convenientemente utilizando, por ejemplo, la ADN polimerasa AmpliTaq Gold™, que tiene actividad de nucleasa 5' endógena, para digerir una sonda marcada tanto con un colorante reportero fluorescente como con una fracción atenuadora,

como se ha descrito anteriormente. Los resultados del ensayo se obtienen midiendo los cambios de fluorescencia que se producen durante el ciclo de amplificación a medida que se digiere la sonda, desacoplando las moléculas fluorescentes y atenuadoras y provocando un aumento de la señal de fluorescencia que es proporcional a la amplificación de la secuencia objetivo.

[0152] Otros ejemplos de métodos de detección homogéneos incluyen ensayos de protección de hibridación (HPA). En dichos ensayos, las sondas se marcan con éster de acridinio (AE), una molécula altamente quimioluminiscente (Véase, Weeks et al, CHn. Chem., 1983, 29: 1474-1479; Berry et al., CHn. Chem., 1988, 34: 2087-2090), utilizando una química de brazo enlazador no basada en nucleótidos (Véase, Patente de EE. UU. nº 5.585.481 y 5.185.439). La quimioluminiscencia se desencadena por la hidrólisis del AE con peróxido de hidrógeno alcalino, que produce una N-metil acridona excitada que posteriormente se desactiva con la emisión de un fotón. En ausencia de una secuencia objetivo, la hidrólisis de AE es rápida. Sin embargo, la velocidad de hidrólisis del AE se reduce considerablemente cuando la sonda está unida a la secuencia diana. Así, las sondas hibridadas y no hibridadas marcadas con AE pueden detectarse directamente en la solución sin necesidad de separación física.

[0153] Los sistemas de detección heterogéneos también son bien conocidos en la técnica y generalmente emplean un agente de captura para separar las secuencias amplificadas de otros materiales en la mezcla de reacción. Los agentes de captura comprenden típicamente un material de soporte sólido (por ejemplo, pozos de microtitulación, perlas, chips y similares) recubierto con una o más secuencias de unión específicas. Una secuencia de unión puede ser complementaria a una secuencia de cola añadida a las sondas de oligonucleótidos de la divulgación. Alternativamente, una secuencia de unión puede ser complementaria a una secuencia de un oligonucleótido de captura, que a su vez comprende una secuencia complementaria a una secuencia de cola de una sonda. Tras la separación de los híbridos del producto de amplificación/sonda unidos a los agentes de captura de la mezcla de reacción restante, los híbridos del producto de amplificación/sonda pueden detectarse utilizando cualquier método de detección, como los descritos en el presente documento.

[0154] En algunas realizaciones, los métodos comprenden además administrar una terapia apropiada al sujeto si se detecta el PBV en la muestra. Por ejemplo, el método puede comprender además administrar un agente antiviral apropiado al sujeto si se detecta el PBV en la muestra.

5. Kits

[0155] En otra realización, la presente divulgación proporciona kits que incluyen materiales y

reactivos útiles para la detección del PBV según los métodos descritos en el presente documento. La descripción de los cebadores, las sondas y las composiciones del presente documento también son aplicables a esos mismos aspectos de los métodos para detectar el PBV descritos en el presente documento. Los kits pueden ser utilizados por laboratorios de diagnóstico, laboratorios experimentales o profesionales. En ciertas realizaciones, los kits comprenden al menos uno de los conjuntos de cebadores o conjuntos de cebadores y sondas descritos en el presente documento y, opcionalmente, reactivos de amplificación. Cada kit comprende preferentemente reactivos de amplificación para un método de amplificación específico. Así, un kit adaptado para su uso con NASBA contiene preferentemente cebadores con un promotor de ARN polimerasa unido a la secuencia de unión a la diana, mientras que un kit adaptado para su uso con SDA contiene preferentemente cebadores que incluyen un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción 5' a la secuencia de unión a la diana. De forma similar, cuando el kit está adaptado para su uso en un ensayo de nucleasa 5', como el ensayo TaqMan®, las sondas de la presente divulgación pueden contener al menos una fracción reportera fluorescente y al menos una fracción atenuadora.

[0156] En algunas realizaciones, el kit comprende al menos un cebador directo, al menos un cebador inverso, al menos una sonda, y reactivos de amplificación e instrucciones para amplificar y detectar el PBV en una muestra. Cualquiera de los cebadores y/o sonda contenidos en el kit puede comprender una etiqueta detectable.

[0157] En algunas realizaciones, el kit comprende al menos un cebador directo, al menos un cebador inverso, y al menos una sonda puede ser: (i) derivada de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de los mismos; o (ii) un complemento derivado de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de los mismos. El kit puede comprender un cebador directo o más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4 o más). El kit puede comprender un cebador inverso o más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más). El kit puede comprender una sonda o más de una (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) sondas. Uno o más cebadores y/o sondas pueden estar marcados con una etiqueta detectable.

[0158] En algunas realizaciones, el kit comprende al menos un cebador directo que tiene un 80% o más de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con la SEQ ID N°: 13 o un complemento de esta, y al menos un cebador inverso que tiene un 80% o más (por ejemplo un cebador inverso (i) derivado de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de los mismos; (ii) complemento derivado de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de los mismos; o (iii)

que tengan 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 14 o un complemento de los mismos. En algunas realizaciones, el kit puede comprender además al menos una sonda que tenga un 80% o más de identidad de secuencia (por ejemplo una sonda (i) derivada de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de esta; (ii) un complemento derivado de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, o fragmentos de los mismos; o (iii) que tengan un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) de SEQ ID N°: 15 o un complemento de los mismos. Uno o más cebadores y/o sonda pueden estar marcados con una etiqueta detectable. El kit puede comprender un cebador directo o más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4 o más). El kit puede incluir un cebador inverso o más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más). El kit puede comprender una sonda o más de una (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) sondas. Uno o más cebadores y/o sondas pueden estar marcados con una etiqueta detectable.

[0159] En algunas realizaciones, el kit comprende al menos un cebador directo que tiene una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con la SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, o complementos de los mismos, al menos un cebador inverso que tiene una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) con la SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, o sus complementos. El kit puede comprender además al menos una sonda que tenga una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) con la SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26, SEQ ID N°: 27, SEQ ID N°: 28, o complementos de esta. El kit puede comprender un cebador directo o más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4 o más). El kit puede comprender un cebador inverso o más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más). El kit puede incluir una sonda o más de una (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) sondas. Uno o más cebadores y/o sondas pueden estar marcados con una etiqueta detectable.

[0160] Los reactivos de amplificación adecuados incluyen, además, por ejemplo, uno o más de los siguientes: tampones, reactivos, enzimas con actividad de transcriptasa inversa y/o polimerasa o actividad de exonucleasa, cofactores enzimáticos como magnesio o manganeso; sales; desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) adecuados para llevar a cabo la reacción de amplificación. Dependiendo del procedimiento, los kits pueden comprender además uno o más de: tampones de lavado, tampones de hibridación, tampones de etiquetado, medios de detección y otros reactivos. Los

tampones y/o reactivos están preferentemente optimizados para la técnica de amplificación/detección particular a la que está destinado el kit. También pueden incluirse en el kit protocolos para utilizar estos tampones y reactivos para realizar diferentes pasos del procedimiento. Además, los kits pueden incluir un control interno para comprobar la eficacia de la amplificación, para evitar que se produzcan resultados falsos negativos debido a fallos en la amplificación, para comprobar la adecuación de las células, la extracción de la muestra, etc. Una secuencia de control interno óptima se selecciona de manera que no compita con la secuencia de ácido nucleico objetivo en la reacción de amplificación. Tales secuencias de control interno son conocidas en la técnica. Los kits también pueden contener reactivos para el aislamiento de los ácidos nucleicos de las muestras de ensayo antes de la amplificación antes de la extracción de los ácidos nucleicos.

[0161] Los reactivos pueden suministrarse en forma sólida (por ejemplo, liofilizada) o líquida. Los kits de la presente divulgación pueden comprender opcionalmente diferentes contenedores (por ejemplo, vial, ampolla, tubo de ensayo, frasco o botella) para cada tampón y/o reactivo individual. Cada componente será generalmente adecuado como alícuota en su respectivo contenedor o proporcionado en una forma concentrada. También pueden proporcionarse otros recipientes adecuados para llevar a cabo determinados pasos del ensayo de amplificación/detección. Los contenedores individuales se mantienen preferentemente en estrecho confinamiento para su venta comercial.

[0162] Los kits también pueden comprender instrucciones para utilizar los reactivos de amplificación y los conjuntos de cebadores o cebadores y sondas descritos en el presente documento: para procesar la muestra de la prueba, extraer las moléculas de ácido nucleico y/o realizar la prueba; y para interpretar los resultados obtenidos, así como un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental. Dichas instrucciones pueden estar opcionalmente en forma impresa o en CD, DVD u otro formato de soporte grabado. A modo de ejemplo, y no de limitación, se darán ahora ejemplos de la presente divulgación.

[0163] La presente divulgación tiene múltiples aspectos, ilustrados por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Descubrimiento de un Nuevo Picobirnavirus

[0164] Muestras: Se obtuvo un panel de 24 muestras de MRN Diagnostics, consistente en esputo, lavados broncoalveolares (BAL) y aspirados endotraqueales (ETA). Se confirmó que los pacientes

que proporcionaron esputo estaban hospitalizados y enfermos con síntomas respiratorios. Los participantes en el estudio se inscribieron en un centro de Colombia, América del Sur, a partir de individuos de 4 ciudades diferentes, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1.

ID de la Muestra	ID del Donante	Edad	Género	País de Origen	Ciudad	Fecha de Colecta	Tipo de Muestra	Temp. de Almacenamiento en Grados Celsius	Número de Alicuotas				Volumen Enviado (mL)
08853670	5918	86	F	COLOMBIA	BARRANQUILLA	11/16/2016	BAL	≤ -20 °C	1	x	3	ml	3
08853737	B140307	50	M	COLOMBIA	CUCUTA	8/14/2016	Espuito	≤ -20 °C	1	x	3	ml	3
08853405	5788	74	M	COLOMBIA	BARRANQUILLA	10/11/2016	Espuito	≤ -20 °C	1	x	2	ml	2
08853406	5789	29	M	COLOMBIA	BARRANQUILLA	10/11/2016	Espuito	≤ -20 °C	1	x	1	ml	1
08864939	51673	51	F	COLOMBIA	BARRANQUILLA	1/10/2017	BAL	≤ -20 °C	1	x	1	ml	1
08864937	51674	65	F	COLOMBIA	BARRANQUILLA	1/8/2017	BAL	≤ -20 °C	1	x	3	ml	3
08864946	51868	62	M	COLOMBIA	BARRANQUILLA	2/9/2017	Espuito	≤ -20 °C	1	x	1	ml	1
08864944	51873	86	M	COLOMBIA	BARRANQUILLA	2/9/2017	Espuito	≤ -20 °C	1	x	1	ml	1
08864941	51888	46	F	COLOMBIA	BARRANQUILLA	2/9/2017	Espuito	≤ -20 °C	1	x	2	ml	2
08864942	423	91	M	COLOMBIA	Medellin	Dic, 2016	Espuito	≤ -20 °C	1	x	1	ml	1
08864940	531	77	F	COLOMBIA	Medellin	Ene, 2017	Espuito	≤ -20 °C	1	x	1	ml	1
08864938	544	63	F	COLOMBIA	Medellin	Ene, 2017	Aspirado endotraqueal	≤ -20 °C	1	x	2	ml	2
08864945	545	65	F	COLOMBIA	Medellin	Ene, 2017	Aspirado endotraqueal	≤ -20 °C	1	x	5	ml	5
08864947	550	72	M	COLOMBIA	Medellin	Ene, 2017	Aspirado endotraqueal	≤ -20 °C	1	x	2	ml	2
08864242	51941	48	M	COLOMBIA	BARRANQUILLA	2/16/2017	Espuito	≤ -20 °C	1	x	1	ml	1
08864246	51945	66	M	COLOMBIA	BARRANQUILLA	2/16/2017	Espuito	≤ -20 °C	1	x	1	ml	1
08864256	51955	48	M	COLOMBIA	BARRANQUILLA	2/16/2017	Espuito	≤ -20 °C	1	x	1	ml	1
08864279	51978	45	F	COLOMBIA	BARRANQUILLA	2/16/2017	Espuito	≤ -20 °C	1	x	2	ml	2
08864352	52051	23	M	COLOMBIA	BARRANQUILLA	2/20/2017	Espuito	≤ -20 °C	1	x	1	ml	1
08864365	52064	74	M	COLOMBIA	VALLEDUPAR	2/16/2017	Espuito	≤ -20 °C	1	x	3	ml	3
08864366	52065	74	M	COLOMBIA	VALLEDUPAR	2/16/2017	Espuito	≤ -20 °C	1	x	3	ml	3
08864395	52094	49	F	COLOMBIA	BARRANQUILLA	2/21/2017	BAL	≤ -20 °C	1	x	3	ml	3
08864418	52117	94	M	COLOMBIA	BARRANQUILLA	2/19/2017	BAL	≤ -20 °C	1	x	2.5	ml	2.5
08864419	52118	73	M	COLOMBIA	BARRANQUILLA	2/19/2017	BAL	≤ -20 °C	1	x	3.5	ml	3.5

[0165] Extracción: Las muestras de esputo (n=15) se pretrataron con un cóctel de nucleasas y se disolvieron físicamente utilizando morteros desechables. El ácido nucleico total se extrajo en el m2000sp automatizado (Abbott Molecular).

[0166] Preparación de la biblioteca: El ácido nucleico se convirtió en ADNc y en bibliotecas Nextera con código de barras.

[0167] Secuenciación mNGS: Se secuenciaron dos conjuntos de bibliotecas. Las concentraciones de las bibliotecas y las métricas de las ejecuciones de MiSeq fueron las siguientes

Corrida 1:

MLP	0% Phix					
Tamaño [bp]	Factor de conversión	Conc. Calibrada [ng/μl]	Molaridad del Pico [nmol/l]	Cargado []	Agrupación/PF	Celda de Flujo
230	0.1518	0.197	1.30	14pM	607K/82%	C3DTN

Corrida 2:

MLP	0% Phix					
Tamaño [bp]	Factor de conversión	Conc. Calibrada [ng/μl]	Molaridad del Pico [nmol/l]	Cargado []	Agrupación/PF	Celda de Flujo
220	0.1452	0.23	1.58	14pM	703K/86.4%	C3DTJ

[0168] Resumen de los resultados de la mNGS: A continuación, se presenta un breve resumen de los patógenos que se encontraron enriquecidos/presentes en las muestras y que se sospecha que juegan un papel en la enfermedad respiratoria. Las lecturas de NGS fueron analizadas por SURPI (Naccache, et al 2104) y un flujo funcional de análisis de datos de Abbott llamado DiVir. Cabe destacar, y tal vez sea lo que se espera de las enterobacterias gramnegativas con un papel conocido en las infecciones nosocomiales, incluidas las infecciones respiratorias, que se encontraron lecturas >10K en ~20% (3/14) de los pacientes. Sin embargo, fue bastante sorprendente la presencia de Aichivirus A en la muestra #9-4352: se trata de un picornavirus causante de gastroenteritis, del que se obtuvo el 80% del genoma por mNGS. El HHV-1 se ha observado en infecciones respiratorias, especialmente en personas inmunodeprimidas. Se detectaron otros virus a niveles bajos, lo que hace difícil argumentar la causalidad, pero se señalan a continuación, con los números de lectura entre paréntesis.

Muestra	Patógeno(s) detectado(s) (# de lecturas virales)
1-Esputo-4279	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
2-Esputo-3406	Picbirnavirus porcino-3 (2)
3-Esputo-4940	Influenza A (8)
4-Esputo-4942	-
5-Esputo-4242	<i>Citrobacter sp</i> , <i>Klebsiella sp</i>

6-Esputo-4246	-
7-Esputo-4256	<i>Citrobacter sp</i> , <i>Klebsiella sp</i> , <i>Acinetobacter sp</i>
8-Esputo-3405_CtRL9	<i>Klebsiella sp</i> , <i>Acinetobacter sp</i> , HHV-4 (15)
8-Esputo-4366	HHV-4 (79)
9-Esputo-4352	Aichivirus A (65), HHV-4 (42), HHV-7 (61)
10-Esputo-4946	-
11-Esputo-4938	<i>Stenotrophomonas sp</i> , HHV-1 (6045)
12-Esputo-4947	HHV-1 (30)
13-Esputo-4395	-
14-Esputo-4418	-
15-Esputo-4419	-

[0169] MRN3406: La muestra #2 estaba enriquecida para bacterias de la familia *Pasteurellaceae*, como *Haemophilus parainfluenzae* y *Haemophilus influenzae*, pero se observaron lecturas <10K para otras bacterias en otros pacientes. *H. parainfluenzae* es la flora normal del tracto respiratorio, pero es un patógeno oportunista que se ha asociado con endocarditis, bronquitis, otitis, conjuntivitis, neumonía, abscesos e infecciones del tracto genital.

[0170] Se identificaron lecturas divergentes de picobirnavirus entre las lecturas sin coincidencia en el NT en la muestra MRN3406.

% de consulta												
puntaje	% de alineación		%		cobertura de espacios del objeto							
de bits	valor e	longitud	id	pos	#mm	aperturas	por hsp	ids de tax	títulos de los sujetos	virus	inicio del objeto	término del objeto
# de Consulta: M00641:16:000000000-C3DTN:1:2107:23091:15568#2/2:F1												
107	9.88E-29	50	70	88	15	0	100	145856	ARN polimerasa dependiente de RNA	Picobirnavirus humano	422	471
105	4.01E-28	50	70	80	15	0	100	442302	ARN polimerasa dependiente de RNA	Picobirnavirus porcino	428	477
# de Consulta: contig_4566_161_394:F1												
106	3.84E-28	53	37.7	64.2	33	0	100	442302	proteína de la cápside	Picobirnavirus porcino	183	235
104	9.16E-28	53	43.4	58.5	30	0	100	145856		Picobirnavirus humano	181	233

[0171] Había 2 lecturas de picobirnavirus-3 porcino detectadas por SNAP a nt (SURPI). Esto se investigó más a fondo, ya que también se detectaron lecturas de PBV relacionadas en los datos de RAPsearch (SURPI) y DiVir 2.0.

ID de la Muestra	ID DONANTE	Edad	Género	País de Origen	Ciudad	Fecha de Colecta	Tipo de Muestra
08853406	5789	29	M	COLOMBIA	BARRANQUILLA	10/11/2016	Espeto

[0172] Esta muestra se obtuvo de un varón de 24 años hospitalizado en Colombia en octubre de 2016 por una enfermedad respiratoria. La tabla de resumen que aparece a continuación ilustra que se detectaron coincidencias con el picobirnavirus en todos nuestros algoritmos de predicción de virus divergentes. Cabe destacar que se formaron contigs que produjeron lecturas extendidas. Después de esta primera corrida de MiSeq, se ensambló más del 50% de la secuencia, con lecturas que mapeaban todo el genoma y cada proteína. Sólo se obtuvieron 462336 lecturas totales para la muestra MRN3406 en esta corrida inicial.

Bacteria	Haemophilus parainfluenzae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae
SNAP a virus	Picobirnavirus porcino 3
RAPsearch viral en nr	Picobirnavirus humano, Picobirnavirus de zorro, Picobirnavirus otarino
RAPsearch no en nr	Picobirnavirus humano, Picobirnavirus de zorro, Picobirnavirus otarino
ARM1 virus a nt virus	Picobirnavirus humano, Picobirnavirus de zorro, Picobirnavirus otarino
ARM2 psi BLAST 49dn	Picobirnavirus humano, Picobirnavirus de zorro, Picobirnavirus otarino
ARM2psiBLAST 50-84	Picobirnavirus humano, Picobirnavirus de zorro, Picobirnavirus otarino
Lecturas extendidas	Picobirnavirus humano, Picobirnavirus de zorro, Picobirnavirus otarino

[0173] Ejemplos de coincidencias detectadas por RAPsearch: Los valores de expectativa (e) muy bajos (negativos) y los puntajes de bits altos indican coincidencias de proteínas de alta confianza con las especies de virus indicadas.

Qlen	Desapareado	Espacios	Valor E	Puntaje de Bits	Especies
45	9	0	-12.8	81.2629	Picobirnavirus de zorro
50	16	0	-11.86	78.1814	Picobirnavirus humano
43	14	0	-7.34	63.1586	Picobirnavirus otarino

[0174] Ejemplos de coincidencias detectadas por DiVir: Los valores e muy bajos y las largas longitudes de consulta indican coincidencias de proteínas de alta confianza con las especies de virus indicadas.

Qlen	Valor-E	Especies
178	8.88E-43	Segmento 2 del ARN del picobirnavirus humano, secuencia completa
59	1.61E-07	Segmento S de cepa de picobirnavirus porcino, secuencia completa

ARM2 (psiBLAST): Los puntajes de bits fueron >100 para la mayoría de las coincidencias, con valores $e < 10^{-24}$. Obsérvese que se detectan fuertes coincidencias tanto con la cápside como con la RDRP.

Puntaje de bits	Valor e	Asociación de Especies	Especies
178	8.88E-43	proteína de la cápside	Picobirnavirus porcino]
59	1.61E-07	ARN polimerasa dependiente de RNA	Picobirnavirus humano]

[0175] Resecuenciación: La biblioteca MRN3406 fue resecuenciada en 2 corridas separadas y cada vez se obtuvieron menos lecturas de las esperadas. No obstante, estos conjuntos de datos adicionales permitieron completar el 95% del genoma. El último espacio en la RDRP se llenó con la RT-PCR, que al reducir la rigurosidad del mapeo, se descubrió que había estado presente en los datos de la NGS todo el tiempo. Un recuento de las lecturas de PBV frente a las lecturas totales de cada corrida arrojó resultados consistentes:

[0176] Corrida 1 (C3DTN) 140 de 462.336 (.03%) = 302 lecturas/millón

[0177] Corrida 2 (C5968) 420 de 1.408.024 (.03%) = 298 lecturas/millón

[0178] Corrida 3 (C7DWY) 116 de 456.878 (.025%) = 253 lecturas/millón

[0179] Corridas combinadas 1-3: 676 de 2.327.238 (.03%) = 290 lecturas/millón

[0180] En general, estas lecturas por millón (rpm) son valores bastante altos para los virus, especialmente de esputo, por lo que es concebible que los títulos sean muy superiores a 105 copias/ml.

[0181] Se ensambló el genoma completo. La longitud total de referencia es de 4119 nt y la profundidad de cobertura media es de 19X. Un gráfico de cobertura lineal de los segmentos 1 y 2 se muestra en la FIG. 2A y la FIG. 2B, respectivamente.

[0182] Utilizando las secuencias del genoma completo como referencias, se evaluó el número de lecturas mapeadas y el porcentaje de cobertura del genoma en el software CLC Bio Genomics Workbench a partir de las predichas por RAPsearch y DiVir 2.0.

ORF1-Cap	RAPsearch viral en nr	RAPsearch no en nr	RAPsearch combinada	DiVir ARM1	DiVira ARM2	DiVir combinada	Datos sin Procesar
Corrida #1	6/37 %	11/31 %	17/47 %	0/0 %	15/44 %	15/44 %	66/83 %
Corrida #2	11/48 %	29/45 %	40/66 %	3/1 %	25/59 %	28/65 %	170/96 %
Corrida #3	1/7 %	7/22 %	8/23 %	0/0 %	2/14 %	2/14 %	53/82 %

RDRP	RAPsearch viral en nr	RAPsearch no en nr	RAPsearch combinada	DiVir ARM1	DiVira ARM2	DiVir combinada	Datos sin Procesar
Corrida #1	51/71 %	13/28 %	64/82 %	22/45 %	29/68 %	51/76 %	74/82 %
Corrida #2	156/85 %	31/55 %	187/88 %	64/77 %	111/77 %	175/79 %	250/90 %
Corrida #3	50/71 %	5/19 %	55/78 %	22/58 %	28/56 %	50/66 %	63/78 %

[0183] Ambas herramientas de predicción de virus divergentes funcionaron bien para identificar números comparables de lecturas y cobertura del genoma. De hecho, la mayoría de las lecturas de RDRP disponibles fueron encontradas por ambas, mientras que se encontraron menos lecturas de la cápside, ya que ésta está menos conservada. Nótese que DiVir elimina los complementos inversos y las lecturas con codones de parada, por lo que se espera que tenga menos lecturas totales.

[0184] Nucleótidos y Secuencias

[0185] La secuencia nucleotídica completa del segmento 1 (2251 nt) fue identificada como:

[0186] AATTTGTACTTTAATGGTTTACAAGAGTTTAAAACCATACAACACTTTCTAC
 ACTCTAAGAACACCAGCTACCGCACATAGTTTAGTGCAAATAGCTAGGATCAGAGAT
 AGTAAAGTGGGATTATCTGAAAGGAGGTTAAATTAATGACAGGTAATCAAATTAAT
 ATGGTGAATTACAAGAAAATATTCGCCATAACACTACAACAGAAGTTGAAACCAATA
 GACACAACGTCGTGACTGAAGGTGAAACCAACAGACATAACGTTGTTACAGAGGTTG
 AAATAATCGACACAATACTGTGACTGAAAGTATTGGATGGTACGATGCTGTATCAAA
 ACGAATCTCAGCAAATGCTTCAATGAGTCAAGCGGGTGCAGCTTGGGCTAATGTTGCA
 ATTAATCAACAAAATGCAGATACAAAGCGATTTGAAGCTGAACGCAATGCTGAAATA
 AATCAGCAAAAATGCGGACACTAGAACATTTAGTGCACGTAGTGAGGATGCAGCTAGA
 TATGCTCATTCTTACAATGAAGATCGTAAACTACAGCTGAAATTGAGCGAATGAACA
 CACAAAATTCGCAAGGATGGGTGAAATCAATCACTGATGCAATCAGCTCACCTATCA
 AAGCATTACCATTATTAGGAGGATAAATTTTATGGTAAAGAATAACAACAAAAAGCG
 TTTTCAGGATAAAAGTGATAAGTATTCTAGAAAACCTAAGTTCAAGTTGAAAAGAA
 AGATATCTTGGACGATGACAAATTGGAAGGATCTAAGTTTGGCAAAGTTAATGACAT
 ATCCTGGTATCAGAAGAATGCTGATTTACTCAGAGCTGCTGGTAACTTGTCTTTTGCTA
 ATGCGTTGGGATCTGGAATTGATCTATCTAACGCAAACCTTAACGTTAAGCTTGCTGC

TGATGAGCAACGTGTTCTTGGTATTGCAACTATACATACTATTACAGGACCTGGACTC
 AGTCGCGACGCACACTCTGGTGTCAACGTGGCAATGCGTAACTTATATTCTTTTGTTCG
 TCATGCAAATAGTGGTCATAGTAACTATGATCCTGTAGATCTAATGTTATATCTACCTG
 CTATGGATGCAGCATACATGCTCTACTACCGTGCTGTTTCGTGCATATGGCGCAATGTT
 CACATTTAATACTGTGAATCGCTATGCTCCAAAAGCTCTTGTGGAAGCGTTAGGTTTT
 GATTATGAAGATGTCAACTCAAACCTTGCTACATTCAGATATGCAATTAACGCATACG
 CTGCAAGAATCAACGCATACGCTGTGCCTACGAATATGCCTATCTTCAAACGACATGC
 ATGGCTCTTTTCATCTATCTATACAGATGAAAACGTATCTAAAGCTCAGATTTATGCAT
 TTAATTCTGATCATTATAGAGTATTTGATGAGAAGTATTCTAAAGGTGGACGCCTTGT
 GGCTAAAGCCTGGAAAACAAAGTTAACTGTTAAAGATTGGATTACAGTAGCAAATGA
 GGTTGCTGATCCAATTACAGTTTCAGAAGATTTAGGTATTATCTCAGGTGACTTAATTA
 AAGCATTTGGTAAGGAAAACCTTACACATGTTAGCTACCTTGGCTGATAACTACGTTGT
 ATTACCAACATATGTACCTGAAGTTATGGATCAAATTCATAACTTGCAAGCAGTAGGT
 CAGATTGATCTAGAAAGTAACAATATTGAACAAGATCCAAACATTGGTAAGGGTAAC
 TTGATTTACAACCCAGTTGTAAGTGTCAATAATAATCCAATGGCTTACGCAAATCGTA
 TTATGGATTTCAAATTGATACACCTACTCCAGATGATGTCGTTGTAGCTTCACGATTA
 GCTGTGGCATTAGAACCAGGCGCTACAACCGGTAAGGCAGTATTCAGTCTATGGGTA
 CAGAATTTGTGACTAAAGTTGGTATTCACACATTCTACAAGGGAAATAATGGATTACT
 TAAGTCTATTGAACAGACTTTCAATACTTTTGATTCTACTGAAGGTGGTCTCACTGACG
 CCGCATCAGTTAGTTTGCACATGTCTGCCTACACAAAGGCCTCTAAGTTTGTACACTTT
 CCAATTCAATATATGTGTATGGGTAGCCCTACTCAACCTGACAAACGTGAAGTCAGAA
 TCTTTGGCGAATTGGGCACGTACACTATTATTAATGGGGTCACTCTTAATAAGTTACA
 CGACGTGTGTGTATTAAGTTTATTTGATGTACCTATTAAGCTTTAGATGCATTAGGG
 (SEQ ID N°: 1).

[0187] La secuencia de la 5'UTR del segmento 1 (longitud 144 nt, coordenadas 1...144) fue identificada como:

AATTTGTAATTTAATGGTTTACAAGAGTTTAAAACCATACAACACTTTCTACACTCTAA
 GAACACCAGCTACCGCACATAGTTTAGTGCAAATAGCTAGGATCAGAGATAGTAAAG
 TGGGATTATCTGAAAGGAGGTAAATTA (SEQ ID N°: 2).

[0188] La longitud de la 5'UTR (144 nt) y la composición de las bases (66% ricas en AT) son consistentes con otros informes que describen 5'UTRs de 44-169 bases y secuencias con sólo 22-38% de contenido G+C.

[0189] En Woo PCY et al., los autores describen un marco de lectura abierto corto (ORF1) en un subconjunto de los PBV otarinos secuenciados, que precede a lo que todos los demás llaman ORF1 y ORF2 (cápside)⁸. Esta es la única publicación conocida que afirma que hay 3 ORFs en el segmento 1. La secuencia divulgada aquí también posee un codón de inicio de metionina en el nt 14 en la supuesta 5'UTR que produce una proteína de 61 aa (SEQ ID N°: 3). Tiene una identidad mínima de aa con la secuencia del PBV de otarina y el PBV humano de Wakuda, et al⁹.

[0190] La secuencia del ORF1 (longitud 132 nt, coordenadas 14...145), 61 aa (marco +2) fue identificada como MVYKSLKPYNTFYTLRTPATAHSLVQIARIRDSKVGLSERRLN (SEQ ID N°: 3).

[0191] La secuencia de nucleótidos del ORF1 (longitud 507 nt, coordenadas 145...651), 169 aa (marco +1) se identificó como:

ATGACAGGTAATCAAATTAAATATGGTGAATTACAAGAAAATATTCGCCATAACACT
ACAACAGAAGTTGAAACCAATAGACACAACGTCGTGACTGAAGGTGAAACCAACAGA
CATAACGTTGTTACAGAGGTTGAAACTAATCGACACAATACTGTGACTGAAAGTATTG
GATGGTACGATGCTGTATCAAAACGAATCTCAGCAAATGCTTCAATGAGTCAAGCGG
GTGCAGCTTGGGCTAATGTTGCAATTAATCAACAAAATGCAGATACAAAGCGATTTGA
AGCTGAACGCAATGCTGAAATAAATCAGCAAAAATGCGGACACTAGAACATTTAGTGC
ACGTAGTGAGGATGCAGCTAGATATGCTCATTCTTACAATGAAGATCGTAAACTACA
GCTGAAATTGAGCGAATGAACACACAAAATTCGCAAGGATGGGTGAAATCAATCACT
GATGCAATCAGCTCACCTATCAAAGCATTACCATTATTAGGAGGATAA (SEQ ID N°: 4).

[0192] La proteína ORF1 tiene un peso molecular previsto de 18.7 kDa y un pI ácido de 5.93

[0193] Secuencia ORF1_aa

[0194] MTGNQIKYGELQENIRHNTTTEVETNRHNVVTEGETNRHNVVTEVETNRHNT
VTESIGWYDAVSKRISANASMSQAGAAWANVAINQQNADTKRFEAERNAEINQQNADTR
TFSARSEDAARYAHSYNEDRKTTAEIERMNTQNSQGWVKSITDAISSPIKALPLLGG (SEQ
ID N°: 5)

[0195] El motivo repetido ExxRxxNxxxE subrayado arriba se ha observado en otros picobirnavirus (Da Costa, et al)¹⁰.

[0196] El resultado más alto (BLASTp vs vvrsaa) muestra un 33% de identidad del PBV porcino, 47% positivo (parcial: 132/168 aa alineados).

[0197] La secuencia de la cápside (ORF2), longitud de 1563 nt, coordenadas (657...2219), 521 aa (marco +3) fue identificada como:

[0198] >2_PBVMRN3406 Posiciones de la Cápside V2 703 a 2304

[0199] ATGGTAAAGAATAACAACAAAAAGCGTTTTTCAGGATAAAAGTGATAAGTATTCTAGAAAACCTAAGTTCAAGGTTGAAAAGAAAGATATCTTGGACGATGACAAATTGGAAGGATCTAAGTTTGGCAAAGTTAATGACATATCCTGGTATCAGAAGAATGCTGATTTACTCAGAGCTGCTGGTAACTTGTCTTTTGCTAATGCGTTGGGATCTGGAATTGATCTATCTAACGCAAACCTTTAACGTTAAGCTTGCTGCTGATGAGCAACGTGTTCTGGTATTGCAACTATACATACTATTACAGGACCTGGACTCAGTCGCGACGCACACTCTGGTGTCAACGTGGCAATGCGTAACTTATATTCTTTTGTTCGTCATGCAAATAGTGGTCATAGTAAC TATGATCCTGTAGATCTAATGTTATATCTACCTGCTATGGATGCAGCATACTGCTCTACTACCGTGCTGTTTCGTGCATATGGCGCAATGTTTCACATTTAATACTGTGAATCGCTATGCTCCAAAAGCTCTTGTGGAAGCGTTAGGTTTTGATTATGAAGATGTCAACTCAAACCTTGCTACATTCAGATATGCAATTAACGCATACGCTGCAAGAATCAACGCATACGCTGTGCCTACGAATATGCCTATCTTCAAACGACATGCATGGCTCTTTTCATCTATCTATACAGATGAAAACGTATCTAAAGCTCAGATTTATGCATTTACTTCTGATCATTATAGAGTATTTGATGAGAAGTATTCTAAAGGTGGACGCCTTGTGGCTAAAGCCTGGAAAACAAAGTTAACTGTTAAAGATTGGATTACAGTAGCAAATGAGGTTGCTGATCCAATTACAGTTTCAGAGATTTAGGTATTATCTCAGGTGACTTAATTAAGCATTGTTGGTAAGGAAAACCTTACACATGTTAGCTACCTTGGCTGATAACTACGTTGTATTACCAACATATGTACCTGAAGTTATGGATCAAATTCATAACTTGCAAGCAGTAGGTCAGATTGATCTAGAAAGTAACAATATTGAACAAGATCCAAACATTGGTAAGGGTAACCTGATTTACAACCCAGTTGTAACCTGTCAATAATAATCCAATGGCTTACGCAAATCGTATTATGGATTTCAAATGATACACCTACTCCAGATGATGTCGTTGTAGCTTCACGATTAGCTGTGGCATTAGAACCAGGCGCTACACCGGTAAGGCAGTATTCAGTCTATGGGTACAGAATTTGTGACTAAAGTTGGTATTCACACATTCTACAAGGGAAATAATGGATTACTTAAGTCTATTGAACAGACTTTCAATAC TTTTGATTCTACTGAAGGTGGTCTCACTGACGCCGCATCAGTTAGTTTGCACATGTCTGCCTACACAAAGGCCTCTAAGTTTGTACACTTTCCAATTCAATATATGTGTATGGGTAGCCCTACTCAACCTGACAAACGTGAAGTCAGAATCTTTGGCGAATTGGGCACGTACACTATTATTAATGGGGTCACTCTTAATAAGTTACACGACGTGTGTGTATTAAGTTTATTTGATGTACCTATTAAGCTT (SEQ ID N°: 6).

[0200] La proteína de la cápside tiene un peso molecular previsto de 57.8 kDa y un pI básico de 8.42.

[0201] La secuencia de la cápside fue identificada como:

[0202] >2_PBVMRN3406 Posiciones de la Cápside V2 703 a 2304

[0203] MVKNNKKRFQDKSKYSRKPKSREKKDILDDDKLEGSKFGKVNDISWYQKNA
DLLRAAGNLSFANALGSGIDLSNANFNVKLAADEQRPVPGIATIHTITGPGLSRDAHSGVNV
AMRNLYSFVRHANSNGHSNYDPVDLMLYLPAMDAAAYMLYYRAVRAYGAMFTFNTVNR
YAPKALVEALGFDYEDVNSNLATFRYAINAYAARINAYAVPTNMPIFKRHAWLFSSITDE
NVSKAQIYAFTSDHYRVFDEKYSKGGRLVAKAWKTKLTVKDWITVANEVADPITVSEDL
GIISGDLIAFGKENLHMLATLADNYVVLPTYVPEVMDQIHNQLQAVGQIDLESNNIEQDPN
IGKGNLIYNPVVTNNPMAYANRIMDFKIDTPDDVVVASRLA VALEPGATTGKAVFT
AMGTEFVTKVGIHTFYKGNNGLLKSIEQTFNTFDSTEGGLTDAASVSLHMSAYTKASKFV
HFPIQYMCMGSPTQPKREVRIFGELGTYTIINGVTLNKLHDVCVLSLFDVPIKL (SEQ ID
Nº: 7).

[0204] El primer resultado (BLASTp vs nrVirusX) mostró el PBV de Marmota con un 37% de identidad, 55% positivo (entero). Este bajo grado de identidad de aminoácidos comparado con otras proteínas de la cápside es esperado dada la diversidad observada reportada en la literatura.

[0205] La secuencia de la 3'UTR (longitud 8 nt, coordenadas 2220...2227) fue identificada como TGATGCGG (SEQ ID Nº: 8).

[0206] La secuencia completa de nucleótidos (1892 nt) para el segmento 2 fue identificada como:

[0207] CTAAATGAATAGAAAAGTAGTCAAGTTAGGTAATTATTTTAAATTACCGAA
TCCCGGATTGAAGACCTATCTATTGAAAACCTAAGAGAGGTAACGATGAAGAGTATCG
TACTCCATTTTTCAAAGATAAATCTTTGTCCGATGTATTACAAGGCTGGTTAGTGCACC
TAGCCCCCTCTCAAGAGTGAGTGGCCTGGTTTACACCAGTTTGAATTAGACCTAGCGGA
AAAGGTCGGGCCTTTAAGCATCCAGAAACCTTTAGATGAGCGGTTTAAGGATATTGAG
GCTTATTACAAAGGTATTCTCCTACCTTCCAAACCAATCAGTGAAACAGCAATCCGAT
CTGTTTTAACTGAATGGAATAGGGCACGTGGCTTGTTCGGTACGCAGTGTCTCCAAAAC
GTGGGATAACATGAAGAAATCTACATCTTCAGGTTCTCCATTCTTTACTAAACGTAAA
GCAGTCGGAAAATATACGATGTATATGGAGCCATGTTTTGACAAAAGAACGCAAGAA
GTTCATTTTAAGAACTCAAACCGTTGGGATCCAATTGCGGTCTTAGGTTGGCGTGGAC
AAGAAGGTGGACCTGATTTTGAGGATGTAAAGCAAAGGGTTGTATGGATGTTCCCTGC
TTCGGTAAACCTACAAGAGTTACGTGTTTACCAACCTCTAATCGAAACAGCGCAACGT
TTCAACTTAGTTCCTGCTTGGGTTGGCATGGATAGTGTTGATTTGCACATCACACGTAT
GTTTGATACGAAAGGCGAAGACGATGTCGTAATATGTACAGATTTCTCAAAATTTGAC
CAACATTTTAATGCTGATATGGCTCGCGGTGCATCCGAAATATTGGATGGCCTCTTTA

ACGGGAGCAGAGATTTTGTACAATGGATGTGGGATATATATCACATCAAATACACGA
TACCTCTATTAGACTCAGAAGATCATGCCTGGTTTGGCAGACATGGTATGGGCTCTGG
TT

CAGGTGGAACCAATGCCGATGAAACATTAGCTCATAGAGCTTTGCAGTACGAAGCTG
CTTTATCACAGAACCAAACATTAAACCCTTATTCACAATGTCTAGGTGATGATGGAGT
ACTAACATATCCTGGAATTAAAGTGGATGATGTAATGCGATCATATACTGCACATGGT
CAAGAGATGAATGAGTCAAAACAGTATGTGAGCAAACATGAATGCATATATCTTCGT
AGATGGCATCATATTAATTATCGTGTTCGATGATGTATGTGTCTGGAGTTTACGCAACAA
CTCGTGCTTTGGGTAGATTGTGTGAACAAGAGAGATATTTTGACCCAGAGATATGGTC
AAAAGAAATGGTAGCTTTACGTCAGCTATCGATACTTGAGAATGTGAAATACCACCCCT
CTCAAGGAAGAATTTGTTAAATATTGCATGAAAGGGGATAAGTACAGACTGGGACTG
GACTTACCAGGCTTCTTGGAGAACATAGA

TGGACTCGCAAAGCAAGCTACTGATCTAATGCCGGACTTTTTAGGTTACGTTAAATCA
CAACAGAAATCTGTTCGGTGGTATATCAGAATGGTGGATAGTAAAATATCTACGTAGTC
TAAAGTAAAGATTGGGATGGTGCAGTAAACCATTAGAATTCTAACGAATTCTAACTGC
ACCATCCCAATCTTTACTTTAGACTACGTAGATATTTTACTATCCACCACTCTGATATA
CCACCGACAGATTTCTGTTGTGATTAAACGTAACTAAAAAGTCCGGCATCAGATCAG
TAGCTTGCTTTGCGAGTCCATCTATGTTCTCCAAGAAGCCTGGTAAGTCCAGTCCCAGT
CTGTACTTATCCCCTTTCATGCAATATTTAACAAATTCTTCCTTGAGAGGGTGGTATTT
CACATTCTCAAGT (SEQ ID Nº: 9).

[0208] La FIG. 3 muestra una alineación de aminoácidos por pares (ventana deslizante de 50 aa) de la secuencia de codificación de la cápside de ABT_PBV con cepas representativas de picobirnavirus. La media (línea sólida) y la mediana (línea punteada) de las identidades globales son aproximadamente del 35%.

[0209] La secuencia de nucleótidos de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RDRP), longitud 1587 nt, coordenadas (5...1591), 529 aa fue identificada como:

[0210] >Secuencia RDRP_nt

[0211] ATGAATAGAAAAGTAGTCAAGTTAGGTAATTATTTTAAATTACCGAATCCC
GGATTGAAGACCTATCTATTGAAAACCTAAGAGAGGTAACGATGAAGAGTATCGTACT
CCATTTTTCAAAGATAAATCTTTGTCCGATGTATTACAAGGCTGGTTAGTGCACCTAGC
CCCTCTCAAGAGTGAGTGGCCTGGTTTACACCAGTTTGAATTAGACCTAGCGGAAAAG
GTCGGGCCTTTAAGCATCCAGAAACCTTTAGATGAGCGGTTTAAGGATATTGAGGCTT

ATTACAAAGGTATTCTCCTACCTTCCAAACCAATCAGTGAAACAGCAATCCGATCTGT
TTTAACTGAATGGAATAGGGCACGTGGCTTGTCGGTACGCAGTGTCTCCAAAACGTGG
GATAACATGAAGAAATCTACATCTTCAGGTTCTCCATTCTTTACTAAACGTAAAGCAG
TCGGAAAATATACGATGTATATGGAGCCATGTTTTGACAAAAGAACGCAAGAAGTTC
ATTTTAAGAACTCAAACCGTTGGGATCCAATTGCGGTCTTAGGTTGGCGTGGACAAGA
AGGTGGACCTGATTTTGAGGATGTAAAGCAAAGGGTTGTATGGATGTTCCCTGCTTCG
GTAAACCTACAAGAGTTACGTGTTTACCAACCTCTAATCGAAACAGCGCAACGTTTCA
ACTTAGTTCCTGCTTGGGTTGGCATGGATAGTGTTGATTTGCACATCACACGTATGTTT
GATACGAAAGGCGAAGACGATGTCGTAATATGTACAGATTTCTCAAATTTGACCAA
CATTTTAATGCTGATATGGCTCGCGGTGCATCCGAAATATTGGATGGCCTCTTTAACG
GGAGCAGAGATTTTGTACAATGGATGTGGGATATATATCACATCAAATACACGATACC
TCTATTAGACTCAGAAGATCATGCCTGGTTTGGCAGACATGGTATGGGCTCTGGTTCA
GG
TGGAACCAATGCCGATGAAACATTAGCTCATAGAGCTTTGCAGTACGAAGCTGCTTTA
TCACAGAACCAAACATTAAACCCTTATTCACAATGTCTAGGTGATGATGGAGTACTAA
CATATCCTGGAATTAAGTGGATGATGTAATGCGATCATATACTGCACATGGTCAAGA
GATGAATGAGTCAAAACAGTATGTGAGCAAACATGAATGCATATATCTTCGTAGATG
GCATCATATTAATTATCGTGTCGATGATGTATGTGTTCGGAGTTTACGCAACAACCTCGT
GCTTTGGGTAGATTGTGTGAACAAGAGAGATATTTTGACCCAGAGATATGGTCAAAA
GAAATGGTAGCTTTACGTCAGCTATCGATACTTGAGAATGTGAAATACCACCCTCTCA
AGGAAGAATTTGTAAATATTGCATGAAAGGGGATAAGTACAGACTGGGACTGGACT
TACCAGGCTTCTTGGAGAACATAGATGGA
CTCGCAAAGCAAGCTACTGATCTAATGCCGGACTTTTTAGGTTACGTAAATCACAAC
AGAAATCTGTCGGTGGTATATCAGAATGGTGGATAGTAAAATATCTACGTAGTCTAAA
G (SEQ ID N°: 10).

[0212] La proteína RDRP tiene un peso molecular previsto de 61,1 kDa y un pI de 7,69

[0213] La secuencia de la RDRP fue identificada como:

[0213] MNRKVVKLGNFYKLPNPGLKTYLLKTKRGNDDEYRTPFFKDKSLSDVLQGWLV
HLAPLKSEWPGLHQFELDLAEKVGPLSIQKPLDERFKDIEAYYKGILLPSKPISETAIRSVLT
EWNRARGLSVRSVSKTWDNMKKSTSSGSPFFTKRKAVGKYTMYMEPCFDKRTQEVHFK
NSNRWDPIAVLGWRGQEGPDFEDVKQRVVWMFPASVNLQELRVYQPLIETAQRFNLPV
AWVGMDSVLDLHITRMFDTKGEDDVVICTDFSKFDQHFNADMARGASEILDGLFNISRDF

VQWMWDIYHIKYTIPLLDSEDHAWFGRHGMGSGSGGTNADETLAHRALQYEAALSQNQ
 TLNPYSQCLGDDGVLTYPGIKVDDVMRSYTAHGQEMNESKQYVSKHECIYLRWHHINY
 RVDDVCVGVYATTRALGRLCEQERYFDPEIWSKEMVALRQLSILENVKYHPLKEEFVKY
 CMKGDKYRLGLDLPGFLENIDGLAKQATDLMPDFLGYVKSQQKSVGGISEWWIVKYLRS
 LK (SEQ ID N°: 11).

[0215] Los mejores resultados de Blast muestran que el PBV de otarinos/eslizones/dromedarios tiene un 64% de identidad y un 75% de resultados positivos (enteros).

[0216] La longitud de la RDRP es consistente con otros informes (529-539 aa), al igual que la identidad de aminoácidos con otros PBV del grupo I (44-70%).

[0217] La secuencia de nucleótidos de la 3'UTR (longitud 301 nt, coordenadas 1592...1892) fue identificada como:

TAAAGATTGGGATGGTGCAGTAAACCATTAGAATTCTAACGAATTCTAACTGCACCAT
 CCCAATCTTTACTTTAGACTACGTAGATATTTTACTATCCACCACTCTGATATACCACC
 GACAGATTTCTGTTGTGATTAAACGTAACCTAAAAAGTCCGGCATCAGATCAGTAGCT
 TGCTTTGCGAGTCCATCTATGTTCTCCAAGAAGCCTGGTAAGTCCAGTCCCAGTCTGTA
 CTTATCCCCTTTCATGCAATATTTAACAAATTCTTCCTTGAGAGGG
 TGGTATTTACATTCTCAAGT (SEQ ID N°: 12).

[0218] Esta secuencia 3'UTR es mucho más larga que otros informes (30-50 nts) y probablemente representa una secuencia más completa que la que otros han podido obtener.

[0219] La FIG. 4 muestra una alineación de aminoácidos por pares (ventana de deslizamiento de 50 aa) de la secuencia de codificación de ABT_PBVRDRP con cepas representativas de picobirnavirus. La media (línea sólida) y la mediana (línea punteada) de las identidades globales son aproximadamente del 60%.

[0220] Análisis filogenético

[0221] Se realizó un análisis filogenético de las proteínas de la cápside y de la RDRP. Se recuperaron todas las secuencias disponibles de picobirnavirus depositadas en GenBank. Se descargaron 1566 secuencias y se analizaron en archivos separados por anotación. Había 814 secuencias de RDRP, 427 de cápside y 325 de ORF1. Las secuencias ABT_PBV se añadieron a cada archivo y se realizó una alineación de secuencias múltiples con CLUSTAL-W en BioEdit. Los alineamientos para la cápside y RDRP se redujeron al conjunto de secuencias ABT_PBV como máscara; ORF1 es altamente divergente y no se analizó. Las accesiones duplicadas, las del mismo estudio/localización/hospedante que eran altamente idénticas y las que no tenían cobertura en la

región de alineación deseada se eliminaron mediante un proceso iterativo para crear árboles de tamaño manejable.

[0222] Cápside: Para la cápside, el número de referencias se redujo de 427 a 132 secuencias de longitud completa (521 aa) (se eliminó la mayor parte del PBV de la marmota). Los árboles de unión de vecinos de Protdist se enraizaron en el punto medio en Tree Explorer. Se produjeron dos árboles, el primero en el que no se eliminaron los huecos (alineación de 521 aa) y otro en el que se eliminaron los espacios (156 aa). De acuerdo con Knox, et al, los patrones de ramificación de las cepas de picobirnavirus se mantuvieron al comparar estos árboles “completos”¹¹. La cápside del ABT-PBV (rojo) se ramificó sistemáticamente con las secuencias del PBV de marmota (KY928866, KY928801; Himalaya) y del camello dromedario (KM573779; Emiratos Árabes Unidos) (azul). Otras secuencias que se encuentran sistemáticamente en esta rama son los PBV de los leones marinos de California (Otarinos), los gorilas y los humanos (azul), así como los caballos, los cerdos y los pollos (verde). Como se ha señalado anteriormente, las secuencias de la cápside están mucho menos conservadas y no hay una región de análisis estándar para la proteína reportada en la literatura.

[0223] Las cepas que se ramifican con la cápside de ABT_PBV se enumeran a continuación con información reportada de la fuente y cualquier asociación con la enfermedad.

Accesión	Tipo	Fuente	Enfermedad	Huésped	Aislado	País	Fecha de colecta
KY214427	porcino	heces		<i>Sus scrofa</i>	BEL/15V01072605	Bélgica	Enc-15
KY928766	marmota	muestra fecal		<i>Marmota himalayana</i>	c223431_g1_i1_libraryA_2618	China	2013
KY928875	marmota	muestra fecal		<i>Marmota himalayana</i>	c326615_g1_i1_libraryA_2610	China	2013
KY928796	marmota	muestra fecal		<i>Marmota himalayana</i>	c290190_g1_i1_libraryA_2687	China	2013
YP009351840	otarino	hisopado fecal		<i>Zalophus californianus</i>	HKG-PF080915; Sec de ref NC_034160.1	Hong Kong	9/12/2008
KY928801	marmota	muestra fecal		<i>Marmota himalayana</i>	c295860_g1_i1_libraryA_2470	China	2013
KM573779	camello	muestra fecal		<i>Camelus dromedarius</i>	c1591	Emiratos Árabes Unidos	2013
KY928866	marmota	muestra fecal		<i>Marmota himalayana</i>	c324215_g1_i1_libraryA_2566	China	2013
KU729747	otarino	hisopado fecal		<i>Zalophus californianus</i>	PF090303	Hong Kong	2013
KY502846	gorila	heces		<i>Gorilla gorilla</i>	IHU-Con-GPbvs-V12-ContigS6	República del Congo	4-mar-09
KY928773	marmota	muestra fecal		<i>Marmota himalayana</i>	c254432_g1_i1_libraryA_2526	China	ago-15
YP239360	humano	deposiciones;	gastroenteritis aguda	<i>Homo sapiens</i>	Hy005102; Sec de ref NC_007026.1	Tailandia	2013
KR902508	quino	plasma;	febril	<i>Equus caballus</i>	horse 3	EE. UU.	2004
KY502841	gorila	heces		<i>Gorilla gorilla</i>	IHU-Con-GPbvs-V7-ContigS3	República del Congo	10-oct-12
KY928820	marmota	muestra fecal		<i>Marmota himalayana</i>	c307746_g1_i1_libraryA_2693	China	ago-15
LC337997	camello	muestra fecal		<i>Camelus dromedarius</i>	101C/GpI	Emiratos Árabes Unidos	2013
KU892526	humano	heces diarreicas	colitis ulcerativa	<i>Homo sapiens</i>	human/BEL/HPBV945/2010	Bélgica	2010
YP009241385	porcino	heces diarreicas	diarrea	<i>Sus scrofa</i>	221/04-16/ITA/2004	Italia	2004
MG846398	pollo	heces		<i>Gallus gallus</i>	RS/BR/15/4S-1	Brasil	2015

[0224] Los árboles radiales de las mismas alineaciones demuestran más claramente la distancia genética entre las cepas (por ejemplo, las largas longitudes de las ramas) y lo intercambiables que son los huéspedes (FIG. 5A y 5B). Aunque no se aprecia una clara delimitación entre especies o localizaciones, sí parece haber agrupaciones distintas para la cápside. Dado que hay menos entradas de cápside y muchas son del mismo huésped, es muy probable que estas presuntas relaciones estén sesgadas.

[0225] RDRP: Las secuencias de RDRP están más conservadas que las de la cápside y se segregan en los Genogrupos I y II. Ya sea porque el RDRP se utiliza para la clasificación de las cepas o porque este gen es más fácil de detectar en las muestras por similitud, hay en consecuencia muchas más secuencias en la base de datos en comparación con la cápside. Hay una región estándar de 55 aa de la proteína reportada en la literatura para el análisis filogenético que corresponde a los aminoácidos 209-264 en el ABT_RDRP. La FIG. 6 muestra un ejemplo de un árbol RDRP en este segmento de 165 nt de Smits, et al que destaca las secuencias de cerdo y humano obtenidas de las vías respiratorias⁵.

[0226] El árbol mostrado en la FIG. 7A contiene la nueva cepa de PBV identificada aquí. 841 secuencias RDRP en esta región de 55 aa se redujeron a 215, incluyendo una diversidad de cepas y aquellas con implicaciones para la enfermedad respiratoria. Los árboles de unión de vecinos de Protdist se arraigaron en la cepa humana del genotipo II, AF246940 (4-GA-91)⁷. Obsérvese que, al igual que en el caso anterior de la cápside, además de la delimitación de GI y GII, no hay ramificación a lo largo de las líneas del huésped para RDRP.

[0227] La rama con la secuencia ABT_RDRP fue ampliada e incluye 3 notables secuencias de interés. En primer lugar, las dos referencias altamente similares, KM285233 y KM285234, se obtuvieron en 2009 a partir de hisopos respiratorios superiores de dos pacientes en Camboya. Estas secuencias nunca formaron parte de una publicación, pero fueron depositadas en GenBank por Mishra, N. y Lipkin, W.I.

[0228] La otra cepa con la que se ramifica, GU968930, procede de muestras de diarrea obtenidas en los Países Bajos. Lo que es intrigante es que esta secuencia encontrada en la figura anterior de Smits, et al, se ramifica con un valor bootstrap del 99% a la cepa respiratoria humana, VS2000252/20055,12.

[0229] Además, en esta misma rama había varias secuencias de otarinos (león marino), gorila, zorro y aguas residuales crudas no cultivadas que están relacionadas con las muestras de heces.

[0230] De hecho, la abrumadora mayoría de las >800 secuencias de RDRP en GenBank se derivan

de muestras de heces, pero la nueva secuencia identificada aquí se ramifica con el puñado de secuencias depositadas relacionadas con enfermedades respiratorias.

[0231] Lamentablemente, el grupo de Osterhaus no depositó las secuencias respiratorias porcinas o humanas en el GenBank⁵. Del mismo modo, las secuencias de Cummings, et al que describen una asociación del PBV con la enfermedad respiratoria aguda grave (SARI) en Uganda tampoco se depositaron⁶. Sin embargo, las cepas que se ramifican con estas secuencias o las que se indican como más similares se incluyeron en la tabla siguiente.

RDRP 55 aa: 209-264							
Accesión	Tipo	Fuente	Enfermedad	Huésped	Aislado	País	Fecha de colecta
KC692366	zorro	heces		<i>Vulpes vulpes</i>	Fox 5	Holanda	15-mar-12
KJ135927	no cultivado	desechos de agua		n/a	Human_137	China	2012
KU729769	león marino de California	hisopado rectal, heces		<i>Zalophus californianus</i>	PF100408	Hong Kong	25-abr-10
KY502852	gorila	heces		<i>Gorilla gorilla</i>	IHY-Con-GPbvs-V18	República del Congo	ago-15
KU729762	león marino de California	hisopado rectal, heces		<i>Zalophus californianus</i>	PF090206	Hong Kong	17-feb-09
KU729763	león marino de California	hisopado rectal, heces		<i>Zalophus californianus</i>	PF090302	Hong Kong	4-mar-09
KM285233	humano	hisopados de vías respiratorias superiores		<i>Homo sapiens</i>	KS02-CSP-202	Cambodia	5-oct-09
KM285234	humano	hisopados de vías respiratorias superiores		<i>Homo sapiens</i>	KS02-CSP-203	Cambodia	5-oct-09
GU968930	humano	deposiciones en conjunto con respiratorio humano		<i>Homo sapiens</i>	VS22	Holanda	11-feb-07
RDRP 348 aa: 126-473							
GQ 221268	vaca	deposiciones		<i>Bos indicus</i>	RUBV-P	India	ene-05
KM 285233	humano	hisopados de vías respiratorias superiores		<i>Homo sapiens</i>	KS02-CSP-202	Cambodia	5-oct-09
KM 285234	humano	hisopados de vías respiratorias superiores		<i>Homo sapiens</i>	KS02-CSP-203	Cambodia	5-oct-09

[0232] Se ha demostrado que los árboles derivados de la secuencia de 55 aa pueden predecir de forma fiable el patrón de ramificación de la RDRP13 de longitud completa. Sin embargo, se creó un alineamiento mucho más largo de 132 secuencias que cubren 348 aa (coordenadas 126-473) para explorar más las relaciones filogenéticas con la nueva cepa. Se desarrollaron árboles filogenéticos (FIG. 7B), y los resultados se resumen en la tabla siguiente. La tabla muestra que la nueva secuencia sigue ramificándose con las cepas respiratorias camboyanas (KM28523X.1), además de una secuencia bovina de la India (RUBV-P). Estas cepas, junto con unas pocas cepas de referencia de longitud completa, se alinearon mediante CLUSTAL-W en dos programas de software diferentes y arrojaron resultados similares. La nueva cepa sólo tiene un 57% de identidad de aminoácidos con las cepas respiratorias camboyanas. Obsérvese que, como se esperaba por los patrones de ramificación anteriores, las cepas camboyanas son idénticas en un 97%, al igual que las cepas de vaca (AB828072.1) y de mono (JQ710506.1).

	ABT_PBV_RDRP	(KM285233.1)	(KM285234.1)	(GQ221268.1)	YP_239361.1	(AF246939.1)	YP_009351841.1	(KJ495690.1)	YP_009551574.1	YP_009241386.1	(AB828072.1)	(KF823811.1)	(KM573801.1)	(JQ710506.1)
ABT_PBV_RDRP	ID	0.573	0.569	0.509	0.544	0.612	0.567	0.533	0.551	0.506	0.412	0.517	0.564	0.412
AKG92636.1 (KM285233.1) [Picobirnavirus Humano]	0.573	ID	0.975	0.519	0.546	0.585	0.571	0.514	0.524	0.494	0.396	0.527	0.52	0.401
AKG92637.1 (KM285234.1) [Picobirnavirus Humano]	0.569	0.975	ID	0.517	0.546	0.586	0.570	0.516	0.525	0.497	0.396	0.531	0.523	0.397
ACT64131.1 (GQ221268.1) [Picobirnavirus bovino/RUBS-P/IND/2005]	0.509	0.519	0.517	ID	0.503	0.536	0.551	0.509	0.519	0.489	0.432	0.487	0.514	0.435
YP_239361.1 [Picobirnavirus Humano Hy00512]	0.544	0.546	0.546	0.503	ID	0.594	0.604	0.589	0.580	0.545	0.443	0.553	0.564	0.444
AAG53583.1 (AF246939.1) [Picobirnavirus Humano 1-CHN-97]	0.612	0.585	0.586	0.536	0.594	ID	0.621	0.570	0.604	0.550	0.452	0.544	0.591	0.456
YP_009351841.1 [Picobirnavirus otarino]	0.567	0.571	0.570	0.551	0.604	0.621	ID	0.608	0.621	0.586	0.448	0.591	0.668	0.450
AHZ46150.1 (KJ495690.1)[Picobirnavirus GI/PBV/turkey/USA/MN-1/2011]	0.533	0.514	0.516	0.509	0.589	0.570	0.608	ID	0.582	0.55	0.448	0.570	0.557	0.450
YP_009551574.1 [Picobirnavirus de pollo]	0.551	0.524	0.525	0.519	0.580	0.604	0.621	0.582	ID	0.632	0.444	0.617	0.588	0.449
YP_009241386.1 [Picobirnavirus porcino]	0.506	0.494	0.497	0.489	0.545	0.550	0.586	0.550	0.632	ID	0.412	0.633	0.551	0.410
BAN58175.1 (AB828072.1) [Picobirnavirus de vaca/tottori7944/Jap/2013]	0.412	0.396	0.396	0.432	0.443	0.452	0.448	0.448	0.444	0.412	ID	0.406	0.427	0.971
AIB06802.1 (KF823811.1) [Picobirnavirus fecal de zorro]	0.517	0.527	0.531	0.487	0.553	0.544	0.591	0.570	0.617	0.633	0.406	ID	0.571	0.407
AIY31287.1 (KM573801.1) [Picobirnavirus de dromedario]	0.564	0.520	0.523	0.514	0.564	0.591	0.668	0.557	0.588	0.551	0.427	0.571	ID	0.408
AFK81927.1 (JQ710506.1) [Picobirnavirus de mono/CHN-14/2002]	0.412	0.401	0.397	0.435	0.444	0.456	0.450	0.450	0.449	0.410	0.971	0.407	0.428	ID

Resultados de la matriz de identidad de secuencias de BioEdit.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
1		57.8	57.4	54.3	55.8	61.2	59.1	55.4	57.0	53.0	43.9	54.5	61.9	43.9	1	ABT_PBV_RDRP
2	61.3		97.7	54.7	55.6	59.2	59.5	53.3	53.9	51.6	42.4	55.7	56.9	42.9	2	AKG92636.1
3	62.1	2.3		54.5	55.3	59.2	59.7	53.6	53.9	51.8	42.1	56.2	57.1	42.3	3	AKG92637.1
4	69.2	68.1	68.6		53.3	57.5	58.8	54.1	55.3	52.1	46.6	53.1	57.7	47.0	4	ACT64131.1
5	65.6	66.1	66.8	71.5		61.3	62.6	60.1	59.3	55.2	46.6	57.5	61.6	46.8	5	YP_239361.1
6	54.2	58.3	58.3	61.7	54.0		65.1	59.4	62.6	57.3	48.0	57.8	65.3	48.4	6	AAG53583.1
7	58.4	57.5	57.1	59.1	51.4	46.8		63.3	63.6	60.0	47.9	61.6	72.1	48.1	7	YP_009351841.1
8	66.5	71.6	70.6	69.6	56.3	57.7	50.1		59.6	56.7	48.2	60.2	60.9	48.4	8	AHZ46150.1
9	63.0	70.1	70.1	66.8	58.0	51.4	49.6	57.3		63.8	47.2	63.9	63.5	47.7	9	YP_009551574.1
10	72.3	75.7	75.2	74.5	67.0	62.3	56.6	63.6	49.1		44.1	65.2	59.9	43.9	10	YP_009241386.1
11	97.7	102.9	103.8	89.3	89.4	85.3	85.6	84.8	87.7	97.2		44.3	48.1	97.1	11	BAN58175.1
12	68.7	65.9	64.6	72.0	61.7	61.3	53.3	56.2	48.9	46.5	96.5		60.0	44.5	12	AIB06802.1
13	52.7	63.2	62.8	61.3	53.3	46.4	34.8	54.7	49.7	56.7	85.2	56.5		48.3	13	AIY31287.1
14	97.7	101.0	103.2	88.2	88.8	84.2	85.0	84.3	86.1	97.8	2.9	95.9	84.6		14	AFK81927.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		

Resultados de DNASTAR MegAlign para la identidad y divergencia de secuencia (superior = identidad; inferior = divergencia)

[0233] Examinando el alineamiento está claro que una identidad considerable reside en la porción utilizada para el árbol de 55 aa (por ejemplo, aa 209-264) (FIG. 8A). Investigar si los motivos RDRP conservados en otros virus se parecen a esta secuencia, y cuáles, será de interés para entender si estos residuos confieren tropismo respiratorio.

[0234] En consonancia con la nomenclatura actual establecida, la nueva cepa descrita aquí se denomina y se deposita en GenBank como sigue: GI/PBV/human/Colombia/ABT3406/2018.

Ejemplo 2

Detección por PCR de Picobirnavirus

[0235] Los métodos para la detección molecular del nuevo picobirnavirus descrito en el presente documento (por ejemplo, ABT-PBV) fueron diseñados para incluir los medios para detectar todos los picobirnavirus, así como la capacidad de discriminar el nuevo picobirnavirus descrito en el presente documento de otras cepas y confirmar que ambos segmentos genómicos están presentes en una muestra. Por esta razón, los ensayos de PCR descritos en el presente documento utilizan un conjunto de cebadores para amplificar una diana “única” en el segmento 1 para detectar únicamente la secuencia de la cápside presente en cepas muy similares. En una reacción separada, otro conjunto de cebadores amplifica una diana “común” en el segmento 2 para la detección de la RDRP. Dentro

de este amplicón de RDRP, todos los PBV pueden detectarse con una sonda “general” (FAM) y el nuevo PBV y las cepas respiratorias altamente relacionadas pueden detectarse con sondas “específicas” (Cy5 y Cy3). Una alineación de nucleótidos de la región del amplicón de la RDRP muestra la posición de estas sondas y qué cepas detectan (FIG. 8B). Obsérvese que en la FIG. 8B los cebadores directo e inverso están situados fuera de la región mostrada donde hibridan las sondas. En la FIG. 9 se resume el esquema general de qPCR y los resultados esperados según lo descrito anteriormente.

[0236] Las transcripciones *in vitro* de las secuencias de la cápside (n=1, carril 9) y de la RDRP (n=6, carriles 4-8, 10) de ABT-PBV (carriles 9 y 10) y de otras cepas de PBV (carriles 4-8) se generaron como controles positivos para demostrar la detección en cada ensayo de qPCR (FIG. 10). Los transcritos en los carriles 1-3 son para aichivirus y no se describen en esta solicitud.

[0237] Transcripción del promotor T7 - Inserto Aichi/PBV (512 bases) - Hind III = 569 bases

[0238] 1 = AVABT (ABT4352)

[0239] 2 = AVDQ (DQ028632)

[0240] 3 = AVNC (NC_001918)

[0241] 4 = PVABRD (AB517739)

[0242] 5 = PVGQRD (GQ221268)

[0243] 6 = PVKMRD (KM285233)

[0244] 7 = PVKURD(KU729763)

[0245] 8 = PVABTRD (MRN3406/RDRP)

[0246] 9 = PVABTCA (MRN3406/capsid)

[0247] 10 = PVNCRD (NC_007027)

[0248] Se desarrollaron los siguientes cebadores y sondas.

[0249] (A) Cápside

Cebador Directo: CAF1151

5'-CACCTACTCCAGATGATGTC-3' (SEQ ID N°: 13)

Cebador Inverso: CAR1229

5'-CTGTACCCATAGCAGTGAATA (SEQ ID N°: 14)

Sonda: CAP1186

5' FAM-TTAGCTGTGGCATTAGAACCAGGCGC-BHQ1 3' (SEQ ID N°: 15)

[0250] (B) RDRP

Cebadores Directos:

- (1) PVFP1: 5'-TGGCGGICARGAAGG-3' (SEQ ID N°: 16)
- (2) PVFP2: 5'-TGGAGGICAIGARGG-3' (SEQ ID N°: 17)
- (3) PVFP3: 5'-TGGCGIGGICARGAGGG-3' (SEQ ID N°: 18)

Cebadores Inversos:

- (1) PVRP1: 5'-CCATICIAAYCCAIGCAGG-3' (SEQ ID N°: 19)
- (2) PVRP2: 5'-CIAWGCIAACCCAIGCTGG-3' (SEQ ID N°: 20)
- (3) KMRP: 5'-CAIICCGACCCAWGCTGG-3' (SEQ ID N°: 21)
- (4) GQRP: 5'-ATAAACCAATCCATGGCGCTAT-3' (SEQ ID N°: 22)
- (5) MGRP: 5'-ACCICGTCATTRCIWCCCA-3' (SEQ ID N°: 23)

Sondas:

- (1) PVPROF1: 5' FAM-CGTIAARCARIGTIGTITGGATGTTYCC-BHQ1 3' (SEQ ID N°: 24)
- (2) PVPROF2: 5' FAM-CGTIAARAGIGTIGTITGGATGTTCCC-BHQ1 3' (SEQ ID N°: 25)
- (3) PVPROF3: 5' FAM-CGTIAARCAGCGIGTIGTITGGATGTTYCC-BHQ1 3' (SEQ ID N°: 26)
- (4) MRNRPRO: 5' Cy5-CGTTGCGCTGTTTCGATTAGAGGTTGG-BHQ2 3' (SEQ ID N°: 27)
- (5) KMRPRO: 5' Cy3-TGTAGCATATCCATAAACGGCTGRTAGAC-BHQ2 3' (SEQ ID N°: 28)

I = desoxiInosina; R = A+G; W = A+T; Y = C+T

[0251] Se probaron combinaciones de cebadores y sondas para determinar la eficacia en la detección del PBV.

[0252] La FIG. 11A-B muestra los resultados de la qPCR para la IVT de la cápside diluida en serie utilizando los cebadores de la cápside y las sondas que se espera que detecten sólo la nueva cepa de PBV descrita en el presente documento. Se utilizaron los cebadores y sondas de cápside descritos anteriormente (SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14 y SEQ ID N°: 15). Las curvas de amplificación se muestran en la FIG. 11A. El gráfico de regresión lineal se muestra en la FIG. 11B. La nueva cepa ABT-PBV se detecta con un límite de detección igual o inferior a 10 copias/ml y la respuesta es lineal.

[0253] La FIG. 12 muestra los resultados de la PCR para RDRP utilizando los siguientes cebadores y sondas:

Cebadores Directos:

- (1) PVFP1: 5'-TGGCGIGGICARGAAGG-3' (SEQ ID N°: 16)

(2) PVFP2: 5'-TGGAGGICAIGARGG-3' (SEQ ID N°: 17)

(3) PVFP3: 5'-TGGCGIGGICARGAGGG-3' (SEQ ID N°: 18)

Cebadores Inversos:

(1) PVRP1: 5'-CCATICIAAYCCAIGCAGG-3' (SEQ ID N°: 19)

(2) PVRP2: 5'-CIAWGCIAACCCAIGCTGG-3' (SEQ ID N°: 20)

(3) KMRP: 5'-CAIICCGACCCAWGCTGG-3' (SEQ ID N°: 21)

(4) GQRP: 5'-ATAAACCAATCCATGGCGCTAT-3' (SEQ ID N°: 22)

(5) MGRP: 5'-ACCICGTCATTRCIWCCCA-3' (SEQ ID N°: 23)

Sondas:

(1) PVPROF1: 5' FAM-CGTIAARCARIGTIGTITGGATGTTYCC-BHQ1 3' (SEQ ID N°: 24)

(2) PVPROF2: 5' FAM-CGTIAARAGIGTIGTITGGATGTTCCC-BHQ1 3' (SEQ ID N°: 25)

(3) PVPROF3: 5' FAM-CGTIAARCAGCGIGTIGTITGGATGTTYCC-BHQ1 3' (SEQ ID N°: 26)

[0254] Estos conjuntos de cebadores y sondas se probaron primero para determinar la capacidad de detectar transcripciones de IVT de secuencias derivadas de múltiples cepas del PBV. Se incluyeron en la reacción múltiples cebadores directos (SEQ IDs 16-18) e inversos (SEQ IDs 19-23) situados en las mismas posiciones y con bases degeneradas para asegurar la amplificación de cepas genéticamente diversas. Asimismo, se incluyeron tres sondas FAM similares para acomodar los desajustes esperados (SEQ IDs 24-26). Como se muestra en la columna 1 de la FIG. 12A y la FIG. 12B, la combinación fue capaz de detectar la IVT de las seis cepas de PBV que se probaron. En consecuencia, esta combinación se denomina en el presente documento como un conjunto de “cebadores y sondas universales” que es capaz de detectar todas las cepas de PBV, incluida la nueva cepa de PBV descrita en el presente documento (por ejemplo, ABT-PBV). Las curvas de amplificación en el canal FAM ilustran que la detección es dependiente de la dosis con LODs entre 10-100 copias/ml.

[0255] Posteriormente se probaron otras sondas capaces de detectar únicamente la nueva cepa de PBV descrita en el presente documento. Obsérvese que las sondas seleccionadas para dos secuencias RDRP residen en el mismo amplicón descrito anteriormente, y por lo tanto los cebadores directos (SEQ IDs 16-18) e inversos (SEQ IDs 19-23) son los mismos. La combinación fue la siguiente:

[0256] Cebadores directos:

(1) PVFP1: 5'-TGGCGIGGICARGAAGG-3' (SEQ ID N°: 16)

(2) PVFP2: 5'-TGGAGGICAIGARGG-3' (SEQ ID N°: 17)

(3) PVFP3: 5'-TGGCGIGGICARGAGGG-3' (SEQ ID N°: 18)

[0257] Cebadores inversos:

- (1) PVRP1: 5'-CCATICIAAYCCAIGCAGG-3' (SEQ ID N°: 19)
- (2) PVRP2: 5'-CIAWGCIAACCCAIGCTGG-3' (SEQ ID N°: 20)
- (3) KMRP: 5'-CAIICCGACCCAWGCTGG-3' (SEQ ID N°: 21)
- (4) GQRP: 5'-ATAAACCAATCCATGGCGCTAT-3' (SEQ ID N°: 22)
- (5) MGRP: 5'-ACCICGTCATTRCIWCCCA-3' (SEQ ID N°: 23)

[0258] Sondas:

- (4) MRNRPRO: 5' Cy5-CGTTGCGCTGTTTCGATTAGAGGTTGG-BHQ2 3' (SEQ ID N°: 27)
- (5) KMRPRO: 5' Cy3-TGTAGCATATCCATAAACGGCTGRTAGAC-BHQ2 3' (SEQ ID N°: 28)

[0259] Las columnas 2 y 3 de la FIG. 12A y la FIG. 12B muestran los resultados de la qPCR de IVTs diluidas en serie de las mismas seis cepas de PBVs detectadas en la columna 1 en el canal FAM. Estos cebadores y la sonda Cy5 detectaron sólo la nueva cepa de PBV encontrada en el esputo y descrita en este documento; no se detectó ninguna de las otras cepas (FIG. 12A y FIG. 12 B, columna 2). Del mismo modo, estos cebadores y la sonda Cy3 detectaron sólo la cepa respiratoria de Camboya; no se detectó ninguna de las otras cepas (FIG. 12A y FIG. 12B, columna 3).

[0260] A continuación se describe detalladamente la receta de la reacción de qPCR de la Cápside de PBV y las condiciones de ciclado:

[0261] Preparar una mezcla maestra para 1 reacción (volumen final 50 µl)

Agua -----	11.45 µl		
Tampón 2X RT-PCR -----	25.0 µl (1X)		
CAF1151 (100 µM en TE, pH 8.0) -----	0.2 µl	0.55 µl	(0.4 µM)
CAR1229 (100 µM en TE, pH 8.0) -----	0.2 µl		(0.4 µM)
CAP1186 (FAM) (100 µM en TE, pH 8.0) -----	0.15 µl		(0.3 µM)
MgCl ₂ 50 mM -----	1.0 µl (1 mM)		
Mezcla de Enzimas de RT-PCR 25 x -----	2.0 µl (1X)		
	40 µl		
ARN -----	10 µl		
	50 µl por reacción		

[0262] El cebador directo (CAF1151), el cebador inverso (CAR1229) y la sonda FAM (CAP1186) se mezclaron previamente juntos en un tubo; se añadieron 0.55 µl de los cebadores y sondas previamente mezclados por cada reacción de 50 µl.

[0263] Se utiliza ROX como colorante de referencia en el tampón de RT-PCR.

[0264] El kit AgPath-ID One-Step RT-PCR (Life Technologies, cat# 4387424) incluye el tampón RT-PCR 2X, mezcla de enzimas de RT-PCR 25X, Potenciador de Detección (x15) y Agua Libre de Nucleasas. El MgCl₂ de 50 mM se suministra por separado.

[0265] Se añaden por último 10 µl de ARN de muestra (por ejemplo, ARN de IVT, de paciente), se sella la placa y se coloca en el instrumento Abbott m2000rt.

[0266] Condiciones de Ciclado de la PCR en tiempo real

<u>Etapas</u>	<u>Ciclo</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Tiempo</u>
1	1	50 °C	30 minutos
2	1	95 °C	10 minutos
3	45	95 °C	30 segundos
		62 °C	30 segundos
55 °C	90 segundos (señales leídas en los últimos 30 segundos)		

[0267] A continuación, se describe detalladamente la receta de la reacción de qPCR del PBV RDRP y las condiciones de ciclado:

[0268] Preparar una mezcla maestra para 1 reacción (volumen final 50 µl)

Agua-----	9.65 µl	
Tampón de RT-PCR 2 x -----	25.0 µl (1 x)	
PVFP1 (100 µM en TE, pH8.0) -----	0.2 µl	(0.4 µM)
PVFP2 (100 µM en TE, pH 8.0) -----	0.2 µl	(0.4 µM)
PVFP3 (100 µM en TE, pH 8.0) -----	0.2 µl	(0.4 µM)
PVRP1 (100 µM en TE, pH 8.0) -----	0.2 µl	(0.4 µM)
PVRP2 (100 µM en TE, pH 8.0) -----	0.2 µl	(0.4 µM)
KMRP (100 µM en TE, pH 8.0) -----	0.2 µl	(0.4 µM)
GQRP (100 µM en TE, pH 8.0) -----	0.2 µl	(0.4 µM)
MGRP (100 µM en TE, pH 8.0) -----	0.2 µl	(0.4 µM)
PVPROF1 (FAM) (100 µM en TE, pH 8.0) -----	0.15 µl	(0.3 µM)
PVPROF2 (FAM) (100 µM en TE, pH 8.0) ---	0.15 µl	(0.3 µM)
		2.05 µl
PVPROF3 (FAM) (100 µM en TE, pH 8.0) -----	0.15 µl	(0.3 µM)
MRNRPRO (Cy5) (100 µM en TE, pH 7.0) -----	0.15 µl	(0.3 µM)
KMRPRO (Cy3) (100 µM en TE, pH 7.0) -----	0.15 µl	(0.3 µM)
50 mM MgCl ₂ -----	1.0 µl (1 mM)	
Mezcla de Enzimas de RT-PCR 25 x -----	2.0 µl (1 x)	
	40 µl	
ARN -----	10 µl	
	50 µl por reacción	

[0269] Los cebadores directos (PVFP1/2/3), los cebadores inversos (PVRP1/2, KMRP, GQRP y

MGRP) y las sondas FAM (PVPROF1/2/3, dirigidas a todas las cepas del PBV en RdRp) se premezclan juntos en un tubo en TE, pH 8.0; se añaden 2.05 µl de los cebadores y las sondas previamente mezclados para cada reacción de 50 µl.

[0270] La sonda MRNRPRO Cy5 dirigida a la nueva cepa ABT-PBV en RdRp y la sonda KMRPRO Cy3 dirigida a otras cepas respiratorias de PBV en RdRp se mezclan previamente juntas en un tubo en TE, pH 7.0; añadir 0.3 µl de las sondas Cy5/Cy3 previamente mezcladas para cada reacción de 50 µl.

[0271] Se utiliza ROX como colorante de referencia en el tampón de RT-PCR.

[0272] El kit AgPath-ID One-Step RT-PCR (Life Technologies, cat# 4387424) incluye el tampón de RT-PCR 2X, mezcla de enzimas de RT-PCR 25X, Potenciador de Detección (x15) y Agua Libre de Nucleasas. El MgCl₂ de 50 mM se suministra por separado.

[0273] Se añaden por último 10 µl de ARN de muestra (por ejemplo, ARN de IVT, de paciente), se sella la placa y se coloca en el instrumento Abbott *m2000rt*.

[0274] Condiciones de Ciclado de la PCR en tiempo real

<u>Etapas</u>	<u>Ciclo</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Tiempo</u>
1	1	50 °C	30 minutos
2	1	95 °C	10 minutos
3	45	95 °C	30 segundos
		62 °C	30 segundos
		55 °C	90 segundos (señales leídas en los últimos 30 segundos)

Ejemplo 3

Detección de cepas adicionales en muestras de esputo

[0275] Para identificar cepas adicionales relacionadas con el nuevo PBV descrito en el Ejemplo 1 y demostrar simultáneamente la utilidad del ensayo de qPCR descrito en el Ejemplo 2, se examinaron muestras de esputo de pacientes enfermos y/u hospitalizados con síntomas respiratorios graves. Se obtuvieron las siguientes 130 muestras de esputo de tres proveedores comerciales diferentes:

[0276] N=50 de NY Biologics recogidas en un centro ambulatorio (Nueva York, EE. UU.)

[0277] N=30 de Boca Biolistics recogidas en pacientes hospitalizados (EE. UU.)

[0278] N=50 de MRN Diagnostics recogidas recientemente de pacientes hospitalizados (Colombia, América del Sur). Nota: El conjunto original tenía 24 muestras, estas 50 fueron recogidas ~2 años

después en el mismo centro médico.

[0279] Se esperaba que la selección de estas muestras de múltiples sitios proporcionara una indicación de la prevalencia general de picobirnavirus en individuos con enfermedades respiratorias. La detección positiva de cepas altamente similares al nuevo ABT-PBV (Cápside FAM+; RDRP FAM+, y RDRP Cy5+) también indicará si este virus particular está circulando en la población.

[0280] Procedimiento de Extracción

[0281] Las muestras de esputo se resuspendieron en proporción 1:1 (por ejemplo, 500 µl de tampón 2X con ~500 µl de esputo) en tampón de tratamiento previo 2X (abajo) durante 3 horas a 37 °C. Se procesaron 48 muestras a la vez según el procedimiento de extracción de TNA+Proteinasa K requerido por la plataforma automatizada *m2000*. Por lo tanto, se prepararon 25 ml de tampón 2X fresco para cada una de las 3 rondas de preparaciones de muestras realizadas en diferentes puntos de tiempo.

[0282] El procedimiento de tratamiento previo se realizó en una instalación BSL3. Todas las manipulaciones se llevaron a cabo en cabinas de bioseguridad de flujo laminar y el personal se puso el PPE completo y respiradores. Toda la basura (por ejemplo, las puntas, los mazos, etc.) se conservó en frascos de rodillo sellables y se esterilizó en autoclave.

[0283] Tampón de Tratamiento Previo 2X (25 ml):

5 ml de tampón de benzonasa 10X (2X)

5 ml de DTT al 1% en agua (0.2%), [1% = 0.5 g de DTT en 50 ml de agua].

14.8 ml de agua

50 µl de Benzonasa Sigma → 2 µl/ml = 1 µl/muestra = 250U/muestra

50 µl de Turbo DNAsa Sigma → 2 µl/ml = 1 µl/muestra = 200U/muestra

100 µl de DNAsa Roche 1 → 4 µl/ml = 2 µl/muestra = 20U/muestra

[0284] Información sobre las nucleasas

Benzonasa ultrapura Sigma @ 250U/µl	E8263-5KU 20 µl/tubo (x 3 tubos)
Sigma Turbo DNAsa de <i>S. marcescens</i> @ 200U/µl	T4330-50KU 250 µl/tubo
Roche (Sigma) DNAsa 1 recombinante @ 10U/µl	04716728001 1000 µl/tubo

[0285] Procedimiento paso a paso

[0286] Paso 1. Transferir ~500 µl de esputo a un tubo de centrifuga Eppendorf de 2.0 ml etiquetado

utilizando una espátula desechable estéril o un mango Q-tip de madera. Girar brevemente donde sea necesario para alinear el nivel de esputo con la gradación de 500 µl en el tubo.

[0287] Paso 2. Pipetear 500 µl del tampón 2X (arriba) a cada muestra y agitar con vórtex. Girar rápidamente para recoger.

[0288] Paso 3. Utilizar un mortero desechable para disolver mecánicamente el esputo cuando sea necesario. Usar ≥ 10 pasajes dependiendo de la viscosidad. Colocar los tubos en un bloque de calor de 37 °C.

[0289] Paso 4. A intervalos de 45 min, repetir la agitación con vórtex. Volver a colocar las muestras en el bloque de calor de 37 °C e incubar durante 3 h en total.

[0290] Paso 5. Centrifugar las muestras a 10000 rpm durante 2 minutos para sedimentar los restos insolubles. Transferir 800 µl de muestra a un tubo de muestra *m2000* y taparlo.

[0291] Paso 6. Extraer el material en un *m2000* utilizando el protocolo TNA+Proteinasa K (Abbott Molecular, Des Plaines, IL).

[0292] Paso 7. Congelar la placa de pozos profundos del ácido nucleico extraído a -80 °C hasta su uso.

[0293] Selección de muestras de pacientes por qPCR

[0294] La mezcla maestra de qPCR de la cápside (40 µl, como se ha descrito anteriormente) se dispensó en una placa de PCR de 96 pocillos. Se añadieron 10 µl de cada muestra de ARN a la mezcla maestra.

[0295] El transcrito *in vitro*, PVABTCA (cápside de la nueva cepa de PBV, #9), resuspendido en agua a 106, 105 y 104 copias/10 µl sirvió como control positivo y el agua sirvió como control negativo.

[0296] La mezcla maestra de RDRP qPCR (40 µl, como se ha descrito anteriormente) se dispensó en una placa de PCR de 96 pocillos separada. Se añadieron 10 µl de cada muestra de ARN a la mezcla maestra.

[0297] Las transcripciones *in vitro*, PVABTRD (nueva cepa de PBV RdRp, #8), PVKMRD (otra cepa respiratoria de PBV RdRp, #6) y PVGQRD (una cepa representativa de PBV no respiratoria RdRp, #5), se resuspendieron en agua a 106, 105 y 104 copias/10 µl y sirvieron como controles positivos. El agua sirvió como control negativo.

[0298] Las reacciones se realizaron de forma cíclica como se ha descrito anteriormente para la IVT. Los resultados se analizaron en el software MultiAnalyze.

[0299] Resultados:

[0300] Se realizaron qPCRs de cápside y RDRP por separado y los valores de umbral de ciclo se enumeran a continuación. Los resultados de las muestras positivas están resaltados en diferentes colores para representar las diferentes clases de PBVs identificadas.

[0301] El primer conjunto de muestras analizadas (columna 1, n=48) de NY Biologics (EE. UU.) reveló cuatro resultados positivos. Se detectaron dos aciertos por la qPCR de RDRP que representan cualquier cepa de PBV (sólo canal FAM). Dado que se encuentran en el esputo de individuos enfermos, se trata presumiblemente de cepas de PBV respiratorias totalmente nuevas, pero con secuencias de RDRP (y cápside) no relacionadas con la cepa camboyana (CY3-) o la nueva cepa ABT (CY5-) de Colombia descrita en este documento. Además, se detectaron dos resultados que indican que estos individuos tienen cepas de PBV con secuencias RDRP similares a la nueva cepa ABT-PBV (FAM+, CY5+).

[0302] El segundo conjunto de muestras analizadas (columna 2, n=48) procedía de los tres proveedores [NY Biologics (EE. UU.), Boca Biolistics (EE. UU.) y MRN Dx (Colombia)] y reveló seis coincidencias. Se detectaron cinco coincidencias que indican que estas cepas de PBV tienen una RDRP similar a la nueva cepa de ABT-PBV (FAM+, CY5+). Se detectó un único aislado en el que la RDRP es similar a la cepa respiratoria de Camboya (FAM+, CY3+). Hubo señales débiles (en cursiva) que tras un análisis más profundo fueron eliminadas como positivas.

[0303] El tercer conjunto de muestras analizadas (columna 2, n=38) procedía de MRN Dx (Colombia) y reveló 15 resultados positivos. Se detectaron tres coincidencias que representan cualquier cepa del PBV (FAM+); cuatro coincidencias con un RDRP similar a la cepa del ABT-PBV (FAM+, CY5+), y una coincidencia en la que el RDRP es similar a la cepa respiratoria de Camboya (FAM+, CY3+); todas ellas fueron negativas para la cápside. Además, se detectaron 7 resultados positivos para la cápside y la RDRP (FAM+, FAM+, CY5+). Dos de ellos también fueron positivos en el canal Cy3 (FAM+, FAM+, CY3+, CY5+), lo que puede representar una infección mixta o una reactividad cruzada con lo que son sondas muy similares.

Conjunto 1: NY Biologics

	Cápsula - FAM		RDRP - FAM	RDRP - CY3	RDRP - CY5
ID de la Muestra	Ct	ID de la Muestra	Ct	Ct	Ct
564225	-1	564225	-1	-1	-1
564226	-1	564226	-1	-1	-1
564227	-1	564227	-1	-1	-1
564228	-1	564228	-1	-1	-1
564229	-1	564229	-1	-1	-1
564230	-1	564230	-1	-1	-1
564231	-1	564231	-1	-1	-1
564232	-1	564232	-1	-1	-1
564233	-1	564233	-1	-1	-1
564234	-1	564234	-1	-1	-1
564235	-1	564235	-1	-1	-1
564236	-1	564236	-1	-1	-1
564237	-1	564237	-1	-1	-1
564238	-1	564238	-1	-1	-1
564239	-1	564239	-1	-1	-1
564240	-1	564240	-1	-1	-1
564466	-1	564466	29.41	-1	-1
564467	-1	564467	-1	-1	-1
564468	-1	564468	33.36	-1	30.34
564469	-1	564469	-1	-1	-1
564137	-1	564137	-1	-1	-1
564138	-1	564138	26.4	-1	23.87
564139	-1	564139	-1	-1	-1
564140	-1	564140	-1	-1	-1
564141	-1	564141	-1	-1	-1
564142	-1	564142	-1	-1	-1
564143	-1	564143	-1	-1	-1
564144	-1	564144	-1	-1	-1
564221	-1	564221	-1	-1	-1
564222	-1	564222	-1	-1	-1
564223	-1	564223	-1	-1	-1
564224	-1	564224	-1	-1	-1
564475	-1	564475	-1	-1	-1
564476	-1	564476	-1	-1	-1
564477	-1	564477	36.26	-1	-1
564478	-1	564478	-1	-1	-1
564479	-1	564479	-1	-1	-1
564480	-1	564480	-1	-1	-1
564505	-1	564505	-1	-1	-1
564506	-1	564506	-1	-1	-1
564507	-1	564507	-1	-1	-1
564508	-1	564508	-1	-1	-1
564509	-1	564509	-1	-1	-1
564510	-1	564510	-1	-1	-1
564511	-1	564511	-1	-1	-1
NHP	-1	NHP	-1	-1	-1
Ctr 9	-1	Ctr 9	-1	-1	-1
Espuito C	-1	Espuito C	-1	-1	-1
10 ⁶	20.17	10 ⁶	23.9	-1	-1
10 ⁵	26.86	10 ⁵	26.98	-1	-1
10 ⁴	27.8	10 ⁴	30.11	-1	-1
NTC	-1	10 ⁶	27.34	24.82	-1
		10 ⁵	30.18	27.52	-1
		10 ⁴	33.19	30.7	-1
		10 ⁶	28.17	-1	23.43
		10 ⁵	30.34	-1	26.75
		10 ⁴	35.92	-1	31.65
		NTC	-1	-1	-1
		NTC	-1	-1	-1
		NTC	-1	-1	-1

Conjunto 2: NY Biologics
Boca Bio
MRN Dx

	Cápsula - FAM		RDRP - FAM	RDRP - CY3	RDRP - CY5
ID de la Muestra	Ct	ID de la Muestra	Ct	Ct	Ct
564470	-1	564470	34.6	-1	32.28
564471	-1	564471	-1	-1	-1
564472	-1	564472	33.29	-1	-1
564473	-1	564473	-1	-1	-1
564474	-1	564474	-1	-1	-1
D000024297	-1	D000024297	-1	-1	-1
D000030554	-1	D000030554	-1	-1	-1
D000030560	-1	D000030560	-1	-1	-1
D000030566	-1	D000030566	-1	-1	-1
D000046713	-1	D000046713	-1	-1	-1
D000046716	-1	D000046716	-1	-1	-1
D000046720	-1	D000046720	-1	-1	-1
D000046722	-1	D000046722	35.04	-1	33.75
D000047124	-1	D000047124	-1	-1	-1
D000047127	-1	D000047127	-1	-1	-1
D000047140	-1	D000047140	-1	-1	-1
D000047153	-1	D000047153	-1	-1	-1
D000047154	-1	D000047154	-1	-1	-1
D000047157	-1	D000047157	-1	-1	-1
D000047178	-1	D000047178	-1	-1	-1
D000047179	-1	D000047179	-1	-1	-1
D000047262	-1	D000047262	-1	-1	-1
D000047287	-1	D000047287	-1	-1	-1
D000047307	-1	D000047307	34.38	-1	-1
D000052296	-1	D000052296	-1	-1	-1
D000052297	-1	D000052297	-1	-1	-1
D000052300	-1	D000052300	42.1	-1	-1
D000052301	-1	D000052301	-1	-1	-1
D000052314	-1	D000052314	-1	-1	-1
D000052342	-1	D000052342	-1	-1	-1
D000052346	-1	D000052346	-1	-1	-1
D000052348	-1	D000052348	-1	-1	-1
D000052349	-1	D000052349	-1	-1	-1
D000052350	-1	D000052350	-1	-1	-1
D000052351	-1	D000052351	-1	-1	-1
Sptm19-001	26.53	Sptm19-001	30.78	-1	24.06
Sptm19-002	-1	Sptm19-002	-1	-1	-1
Sptm19-003	-1	Sptm19-003	-1	-1	-1
Sptm19-004	-1	Sptm19-004	-1	-1	-1
Sptm19-005	-1	Sptm19-005	-1	-1	-1
Sptm19-006	22.18	Sptm19-006	28.33	-1	20.42
Sptm19-007	-1	Sptm19-007	-1	-1	-1
Sptm19-008	-1	Sptm19-008	-1	-1	-1
Sptm19-009	-1	Sptm19-009	-1	-1	-1
Sptm19-010	-1	Sptm19-010	-1	-1	-1
Sptm19-011	-1	Sptm19-011	-1	-1	-1
Sptm19-012	-1	Sptm19-012	23.36	22.78	-1
Sput Ctrl	35.26	Sput Ctrl	36.34	-1	33.8
10 ⁶	19.85	10 ⁶	22.09	-1	-1
10 ⁵	26.21	10 ⁵	25.82	-1	-1
10 ⁴	26.98	10 ⁴	28.4	-1	-1
NTC	-1	10 ⁶	28.31	27.45	-1
		10 ⁵	32.65	32.03	-1
		10 ⁴	35.59	34.98	-1
		10 ⁶	27.09	-1	23.29
		10 ⁵	29.51	-1	26.85
		10 ⁴	34.7	-1	31.3
		NTC	-1	-1	-1
		NTC	-1	-1	-1
		NTC	-1	-1	-1

Conjunto 3: MRN Dx

	Cápsula - FAM		RDRP - FAM	RDRP - CY3	RDRP - CY5
Pocillo	Ct	ID de la Muestra	Ct	Ct	Ct
Sptm19-013	-1	Sptm19-013	-1	-1	-1
Sptm19-014	-1	Sptm19-014	-1	-1	-1
Sptm19-015	24.69	Sptm19-015	23.1	24.15	25.5
Sptm19-016	-1	Sptm19-016	28.71	-1	25.56
Sptm19-017	-1	Sptm19-017	-1	-1	-1
Sptm19-018	-1	Sptm19-018	-1	-1	-1
Sptm19-019	-1	Sptm19-019	-1	-1	-1
Sptm19-020	-1	Sptm19-020	35.51	-1	-1
Sptm19-021	35.59	Sptm19-021	35.25	-1	31.49
Sptm19-022	-1	Sptm19-022	-1	-1	-1
Sptm19-023	-1	Sptm19-023	25.12	24.22	-1
Sptm19-024	-1	Sptm19-024	-1	-1	-1
Sptm19-025	-1	Sptm19-025	-1	-1	-1
Sptm19-026	-1	Sptm19-026	-1	-1	-1
Sptm19-027	-1	Sptm19-027	-1	-1	-1
Sptm19-028	-1	Sptm19-028	-1	-1	-1
Sptm19-029 A	-1	Sptm19-029 A	-1	-1	-1
Sptm19-029 B	-1	Sptm19-029 B	-1	-1	-1
Sptm19-030	-1	Sptm19-030	-1	-1	-1
Sptm19-031	-1	Sptm19-031	32.26	-1	30.16
Sptm19-032	-1	Sptm19-032	27.69	-1	25.94
Sptm19-033	-1	Sptm19-033	25.35	26.91	34.56
Sptm19-034	-1	Sptm19-034	26.41	27.39	35.75
Sptm19-035	35.84	Sptm19-035	29.3	-1	26.64
Sptm19-036	-1	Sptm19-036	34.19	-1	30.89
Sptm19-037	-1	Sptm19-037	-1	-1	-1
Sptm19-038	26.57	Sptm19-038	30.67	-1	29.08
Sptm19-039	34.43	Sptm19-039	21.56	25.45	29.43
Sptm19-040	-1	Sptm19-040	-1	-1	-1
Sptm19-041	-1	Sptm19-041	-1	-1	-1
Sptm19-042	-1	Sptm19-042	-1	-1	-1
Sptm19-043	-1	Sptm19-043	-1	-1	-1
Sptm19-044	22.58	Sptm19-044	31.48	-1	26.95
Sptm19-045	-1	Sptm19-045	-1	-1	-1
Sptm19-046	19.61	Sptm19-046	27.14	-1	23.29
Sptm19-047	-1	Sptm19-047	-1	-1	-1
Sptm19-048	-1	Sptm19-048	-1	-1	-1
Sptm19-049	-1	Sptm19-049	-1	-1	-1
10 ⁶	19.18	10 ⁶	22.96	-1	-1
10 ⁵	25.81	10 ⁵	26.57	-1	-1
10 ⁴	26.52	10 ⁴	30.18	-1	-1
NTC	-1	10 ⁶	28.23	27.7	-1
		10 ⁵	31.18	31.7	-1
		10 ⁴	33.81	34.75	-1
		10 ⁶	28.95	-1	24.03
		10 ⁵	30.23	-1	27.67
		10 ⁴	36.87	-1	31.98
		NTC	-1	-1	-1
		NTC	35.28	-1	-1
		NTC	40.46	-1	-1

cepa ABT PBV cápsula+ (IVT #9)
Cualquier cepa PBV RdRp+ (IVT #4-8, 10)
cepa respiratoria no ABT PBV RdRp+ (IVT #6)
cepa ABT PBV RdRp+ (IVT #8)
cepa ABT PBV RdRp+ y cápsula+ (IVT #8 y 9)

Caracterización del genoma del PBV y mNGS de los positivos de la qPCR

[0304] En total, 25 muestras (19.2%) fueron positivas para el PBV. En la FIG. 13 se muestra un resumen de los tipos de resultados positivos (perfil qPCR) obtenidos y de qué cohorte proceden. El ácido nucleico total procedente de esta extracción se convirtió en ADNc y en bibliotecas Nextera (n=25) para mNGS y determinación de la secuencia de longitud completa de cada cepa de PBV. El número de lecturas del PBV identificadas en SURPI y DiVir se correlacionó bien con las cargas

virales inferidas a partir de los valores Ct de la qPCR (véase más adelante). Todas las lecturas sin procesar se alinearon primero con la secuencia de referencia MRN3406 como un primer intento de derivar la secuencia consenso de cada nueva cepa. La mayoría de las cepas colombianas (designadas en amarillo: Cap FAM+/RDRP FAM+/Cy3-/Cy5+) y algunas de las cepas estadounidenses tenían una considerable identidad de nucleótidos con el índice, lo que permitió un mapeo eficiente de las lecturas y el ensamblaje del genoma. Para verificar que el consenso final no estaba sesgado por este enfoque, se alinearon los contigs de lecturas de PBV ensambladas de novo en los flujos funcionales RAPsearch y DiVir y las secuencias coincidieron. Del mismo modo, muestras como la 19-012 (designada en naranja: Cap FAM-/RDRP FAM+/Cy3+/Cy5-) fueron mapeadas con la secuencia RDRP de la cepa de referencia camboyana, KM285233. Este enfoque también fue suficiente para compilar las secuencias RDRP de las muestras 19-012, 19-023, 19-039, etc., y se verificaron por comparación con los contigs de novo generados por el pipeline. Sin embargo, las secuencias de la cápside de estas cepas se determinaron completamente por ensamblaje de novo, ya que no se publicaron secuencias de la cápside que acompañaran a la RDRP de la cepa KM285233. Actualmente, se han determinado 12 genomas completos y 5 parciales adicionales de 15 individuos diferentes: 3 están coinfectados con PBV similares a las cepas ABT-PBV y Camboya. La mayoría son de Colombia (n=13) y sólo 2 son de Estados Unidos. Como era de esperar, las muestras con Cts elevadas parecen tener pocas lecturas del PBV en conjunto y probablemente no generen una cobertura considerable del genoma.

ID de NGS	ID de la Muestra	Cápside - FAM	RDRP - FAM	RDRP - CY3	RDRP - CY5	Lecturas de RDRP PBV Segmento 2			ORF1 de Lecturas de PBV/Cápside Segmento 1			lecturas totales de NGS	Referencia
		Ct	Ct	Ct	Ct	Total	Consenso	% de cov	Total	Consenso	% de cov		
1-PBV-4466	564466	-1	29.41	-1	-1	2647	1846	90%	3412	2387	100%	8048648	ABT
2-PBV-4468	564468	-1	33.36	-1	30.34	10	572	30%	19	759	34%	3322400	ABT
3-PBV-4138	564138	-1	26.4	-1	23.87	270	1690	83%	210	2246	94%	7321340	ABT
4-PVB-4477	564477	-1	36.26	-1	-1	0	0	0%	0	0	0%	7597178	ABT
8-PVB-4470	564470	-1	34.6	-1	32.28	3	43	2%	0	0	0%	8063558	ABT
9-PVB-6722	D000046722	-1	35.04	-1	33.75	0	0	0%	0	0	0%	7580048	ABT
10-PBV-19-001	Sptm19-001	26.53	30.78	-1	24.06	345	1689	83%	265	2197	92%	3749428	ABT
11-PBV-19-006	Sptm19-006	22.18	28.33	-1	20.42	2912	1925	94%	2271	2345	98%	3541114	ABT
12-PBV-19-012	Sptm19-012	-1	23.36	22.78	-1	224	261	14%	0	0	0%	9517318	ABT
12-PBV-19-012	Sptm19-012	-1	23.36	22.78	-1	3712	1671	100%	3044	2187	83%	9517318	KM285233
13-PBV-SPTM-C	Control de Espudo	35.26	36.34	-1	33.8	0	0	0%	0	0	0%	2242462	ABT
14-PBV-19-015	Sptm19-015	24.69	23.1	24.15	25.5	8551	1990	98%	28613	2345	99%	4685264	ABT
14-PBV-19-015	Sptm19-015	24.69	23.1	24.15	25.5	14004	1671		15296	2633	100%	4685264	KM285233
15-PBV-19-016	Sptm19-016	-1	28.71	-1	25.56	703684	1986	97%	1019	2223	95%	14733470	ABT
16-PBV-19-020	Sptm19-020	-1	35.51	-1	-1	6	628	33%	17	768	34%	3791602	ABT
17-PVB-19-021	Sptm19-021	35.59	35.25	-1	31.49	4	401	21%	5	381	17%	1759914	ABT
18-PVB-19-023	Sptm19-023	-1	25.12	24.22	-1	163	318	17%	0	0	0%	8746944	ABT
18-PVB-19-023	Sptm19-023	-1	25.12	24.22	-1	4574	1662	99%	3738	2627	100%	8746944	KM285233
19-PVB-19-031	Sptm19-031	-1	32.26	-1	30.16	18	751	40%	0	0	0%	6175024	ABT
20-PVB-19-032	Sptm19-032	-1	27.69	-1	30.16	54	1621	86%	5	164	7%	5853846	ABT
no subido	Sptm19-033	-1	25.35	26.91	34.56	4	160	8%	0	0	0%	374952	ABT
no subido	Sptm19-033	-1	25.35	26.91	34.56	32	1212	64%	16	867	33%	374952	
no subido	Sptm19-034	-1	26.41	27.39	35.75	1	142	8%	0	0	0%	207372	ABT
no subido	Sptm19-034	-1	26.41	27.39	35.75	22	957	51%	6	448	17%	207372	
23-PBV-19-035	Sptm19-035	35.84	29.3	-1	26.64	563	1847	91%	407736	2363	99%	8335936	ABT
24-PBV-19-036	Sptm19-036	-1	34.19	-1	30.89	0	0	0%	0	0	0%	5209118	ABT
25-PBV-19-038	Sptm19-038	26.57	30.67	-1	29.08	325	1831	90%	398	2226	93%	1585992	ABT
26-PBV-19-039	Sptm19-039	34.43	21.56	25.45	29.43	399	1406	74%	0	199	9%	4737986	ABT
26-PBV-19-039	Sptm19-039	34.43	21.56	25.45	29.43	2803	1656	100%	1355	2565	97%	4737986	KM285233
27-PBV-19-044	Sptm19-044	22.58	31.48	-1	26.95	6968	2022	99%	6514	2240	94%	8691792	ABT
27-PBV-19-044	Sptm19-044	22.58	31.48	-1	26.95	340	1202	73%	1307	1009	38%	8691792	KM285233
28-PBV-19-046	Sptm19-046	19.61	27.14	-1	23.29	5919	2001	98%	6227	2240	94%	11745986	ABT

Identidad de la Cepa

[0305] Los nuevos genomas se alinearon con MRN3406 y se determinaron las matrices de identidad para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos en los marcos de lectura abiertos del segmento 1 (ORF1 + cápside) y del segmento 2 (RDRP).

[0306]

[0307] Las secuencias de nucleótidos de los nuevos genomas se muestran a continuación.

>2_PBV-MRN3406 Capsid

AATTTGTACTTTAATGGTTTACAAGAGTTTAAAACCATACAACTTTCTACACTCTAA
GAACACCAGCTACCGCACATAGTTTAGTGCAAATAGCTAGGATCAGAGATAGTAAAGT
GGGATTATCTGAAAGGAGGTTAAATTAATGACAGGTAATCAAATTAATATGGTGAAT
TACAAGAAAATATTCGCCATAACACTACAACAGAAGTTGAAACCAATAGACACAACGT
CGTGACTGAAGGTGAAACCAACAGACATAACGTTGTTACAGAGGTTGAAACTAATCGA

CACAATACTGTGACTGAAAGTATTGGATGGTACGATGCTGTATCAAAACGAATCTCAGC
AAATGCTTCAATGAGTCAAGCGGGTGCAGCTTGGGCTAATGTTGCAATTAATCAACAA
AATGCAGATACAAAGCGATTTGAAGCTGAACGCAATGCTGAAATAAATCAGCAAAATG
CGGACACTAGAACATTTAGTGCACGTAGTGAGGATGCAGCTAGATATGCTCATTCTTAC
AATGAAGATCGTAAAACTACAGCTGAAATTGAGCGAATGAACACACAAAATTCGCAAG
GATGGGTGAAATCAATCACTGATGCAATCAGCTCACCTATCAAAGCATTACCATTATTA
GGAGGATAAATTTTATGGTAAAGAATAACAACAAAAAGCGTTTTTCAGGATAAAAGTGA
TAAGTATTCTAGAAAACCTAAGTTCAAGGTTGAAAAGAAAGATATCTTGGACGATGAC
AAATTGGAAGGATCTAAGTTTGGCAAAGTTAATGACATATCCTGGTATCAGAAGAATG
CTGATTTACTCAGAGCTGCTGGTAACTTGTCTTTTGCTAATGCGTTGGGATCTGGAATTG
ATCTATCTAACGCAAACTTTAACGTTAAGCTTGCTGCTGATGAGCAACGTGTTCTGGT
ATTGCAACTATACATACTATTACAGGACCTGGACTCAGTCGCGACGCACACTCTGGTGT
CAACGTGGCAATGCGTAACTTATATTCTTTTGTTTCGTCATGCAAATAGTGGTCATAGTA
ACTATGATCCTGTAGATCTAATGTTATATCTACCTGCTATGGATGCAGCATACATGCTCT
ACTACCGTGCTGTTTCGTGCATATGGCGCAATGTTTCACATTTAATACTGTGAATCGCTAT
GCTCCAAAAGCTCTTGTGGAAGCGTTAGGTTTTGATTATGAAGATGTCAACTCAAACCT
TGCTACATTCAGATATGCAATTAACGCATACGCTGCAAGAATCAACGCATACGCTGTGC
CTACGAATATGCCTATCTTCAAACGACATGCATGGCTCTTTTCATCTATCTATACAGATG
AAAACGTATCTAAAGCTCAGATTTATGCATTTACTTCTGATCATTATAGAGTATTTGATG
AGAAGTATTCTAAAGGTGGACGCCTTGTGGCTAAAGCCTGGAAAACAAAGTTAACTGT
TAAAGATTGGATTACAGTAGCAAATGAGGTTGCTGATCCAATTACAGTTTCAGAAGATT
TAGGTATTATCTCAGGTGACTTAATTAAGCATTGTTGGTAAGGAAAACCTACACATGTTA
GCTACCTTGGCTGATAACTACGTTGTATTACCAACATATGTACCTGAAGTTATGGATCA
AATTCATAACTTGCAAGCAGTAGGTCAGATTGATCTAGAAAGTAACAATATTGAACAA
GATCCAAACATTGGTAAGGGTAACTTGATTTACAACCCAGTTGTAAGTGTCAATAATAA
TCCAATGGCTTACGCAAATCGTATTATGGATTTCAAATTTGATACACCTACTCCAGATG
ATGTCGTTGTAGCTTCACGATTAGCTGTGGCATTAGAACCAGGCGCTACAACCGGTAAG
GCAGTATTCAGTCTATGGGTACAGAATTTGTGACTAAAGTTGGTATTCACACATTCTA
CAAGGGAAATAATGGATTACTTAAGTCTATTGAACAGACTTTCAATACTTTTGATTCTA
CTGAAGGTGGTCTCACTGACGCCGCATCAGTTAGTTTGCACATGTCTGCCTACACAAAG
GCCTCTAAGTTTGTACACTTTCCAATTCAATATATGTGTATGGGTAGCCCTACTCAACCT
GACAAACGTGAAGTCAGAATCTTTGGCGAATTGGGCACGTACACTATTATTAATGGGGT

CACTCTTAATAAGTTACACGACGTGTGTGTATTAAGTTTATTTGATGTACCTATTAAGCT
TTAGATGCATTAGGG (SEQ ID N°: 64).

>1-PBV-4466 Capsid

TCTTTAAATAAGTCATTACTAGAAAGGAGAAATTTGTACTTTAATGGTTTACAAGAGTT
TAAAACCATACTTCACTTTCTGCACTCTAAGAACACCAGCTACCGCACATAGTTTAGTG
CAAATAGCTAGGATCAGAGACAGATTTGTGAAATTACCTGAAAGGAGGATAAAATATG
ACAGGTAATCAAATTAATATGGCGAATTACAAGAAAACATTCGTCATAATCAAATA
CCGAAGTCGAAACCAATCGACATAACGTTGTGACTGAGGGTGAAACAAACCGACATAA
CGTTGTCACTGAGAATGAGACGAATCGGCACAATGTAGTGACAGAGAGTATTGGATGG
TATGATGCAGTATCAAAGAGAATATCTGCTAATGCCTCAATGAGTCAAGCTGGTGCAGC
TTGGGCTAATGTCGCTATAAATCAGCAGAATGCGGATACTCGTAGATATGAAGCTGAA
AGAAATGCTGAGATTAATCAGCAAAATGCCGACACTAAGAGATTTAGTGCTGAAAGTG
AGGATGCTGCTCGCTATGCGCATTCTTACAATGAAGATCGTAAACTACTGCTGAAATT
GAGAGAATGCAGAATCAAATTCTCAGGGATGGGTGAAAGCTATTACTGATAGTATTA
GCGCACCAATTAAGCTTTACCATTATTAGGAGGATAAGATAAAATGGCAAAATTTAA
AGATAAAGAAAGTTTCCAGAAAAGAAACAAAACAAAGAAATGGGATAAAAAGGATCC
TAAGAAGAATCCTAAACATGATGAACCAACTGAAAAGTTGGACGACGACAAATTGGAA
GGATCTAAGTTTGGCAAAGTTAATGACATATCCTGGTATCAGAAGAACCCTGATTTACT
CAGAGCTGCTGGTAACTTGTCTTTTGCTAATGCGTTGGGATCTGGAATTAACCTATCTA
ACGCTAACTGTAACTTAGTCTTGCTGCTGATGAGCAACGTATTCCTGGCATTGCAACT
ATACATACTATTACAGGACCTGGACTTAGCCGATCAGCTAATTCTGGAGTCAATATTGC
TATGCGTAATTTATATTCATTTGTTTCGTCATGCTAATAGCGGTCATAGTAACTATGATCC
CGTAGATTTAATGTTATATCTCTTAGCTATGGATGAGGCTTATATGGCCTATTTCCGTGC
CGTACGTGCTTATGGCGCTATGTTTACTTTTAATACATTAAATCGATACGCACCTAAGG
CTCTTGTTGAAGCATTAGGATTCGATTATGAAGATATCAACAAGAATCTTGCTACATTC
AGATATGCAATTAACGCATATGCTGCAAGAATCAATGCTTACGCTGTCCCTACGAATAT
GCCTTTGTTTAAGAGACATGCGTGGCTATTCTCATCTATTTATACAGATGAAAATGTATC
TAAAGCTCAGATTTATGCATTTACTACTGATCATTATAGAACATATGATGAAAAGTATT
CTAAAGGTGGACGACTTGTGGCTAAAGCCTGGAAGCCTAACTAAAGGTAGAGGATTG
GATTTCAAGTTGCTAATGAAATTGCGGACCCAATTACTACTTCTGAAGATCTGGGTATTA
TATCGGGCGACTTAATTAAGCGTTCGGTAAAGAAAATTTACACACACTTGCAACATTA

GCTGATAACTATGTTGTGTTACCAACTTACGTACCTGAAGTTATGGACCAAATTCACAA
TTTACAGGCAGTTGGCGATGTTGAATTAGCGAGCAACAACATCGAACAGGACCCTCAA
ATTGGAAAGGGCAACCTAATCTATGATCCAATTCTTAAATCGGGTAAGAATCCGGTATT
ATATGGGGATCGTATTATGGATTTCAAGATTGACACACCAACACCAGAAGATGTAATTG
TTGCATCACGATTGGCTGTATCACTAGAACCATCACCGGATGGTAATAAGGCTCATTTT
GTAGCCATGGGTACAGAGTTTGTGACACATGTTGGAATTCATACACTTTATCAGACAAC
CTCTGGTAATGTTAAATGTCTTGAACAGACTTTTGATACTATTGCAGCTGTTGAGGGTG
GTCTTGCTGATGCCGCATCAGTTAGTTTGTTCCTATCTGGATACACAAAGGCCTCTAAGT
TTGTACATTTTCCTATTCAATATGCTTGTCTGGGTAACGCTAGTGACCCTAATGGACAAT
CAATCAGAATCTTTGGTGAATTGGGGACGTACAGTACTATTAACAGCACTACTCTTAAT
AAATTACACGATGTGTGTGTATTAAGTTTGTAGATGTACCTATCAAATTATAGATACA
TGGGGGAAGTGAGGAG (SEQ ID N°: 29)

>3-PBV-4138 Capsid

GGAGAAATTTGTACTTTAATGGTTTACAAGAGTTTAAAACCATACAATGCTTTTCTCAC
TCTAAGAACACCAGCTAACGCACATAGTCTAGTGCAAATAGCTAGGATCAGAGATGGA
AGAGCAAGATTATCTGAAAGGAGGTTAAATATGAAATGACAGGTAATCAAATTAAGTA
TGGCGAATTACAAGAGAACATACGCCATAACACTACTACCGAAGTTGAGACCAACCGT
CATAACGTTGTTACAGAAGGCGAAACAAATCGTCACAATGTTGTGACTGAGGCTGAAA
CTAATCGGCACAATACTGTAAGTAAAGTATTGGATGGTACGATGCAGTATCAAAGAG
AATCTCAGCTAACGCGTCCATGAGCCAAGCAGGTGCAGCTTGGGCTAATGTTGCTATCA
ATCAACAGAACGCAGACACACGTAAATATGAAGTTGAGAAGAACGTTGAAATCAATCA
ACAAAATGCAGATACTAAAGCATTTAGTGCCAGAAGTGAAGATGCTGCTAGATATGCT
CATTCATATAATGAAGATCGCAAACTACAGCTGAAATTGAGCGAATGAAGACTCAAA
ATTCACAAGGATGGGTGAAATCAATTACTGATGCTATCAGTGCGCCTATCAAAGCATT
CCATTATTAGGAGGATAAATTATATGGTAAAGAAAAATGATAACAACAAACGTTTTCA
GAATAAAAGTGAGAAATATTCTAGAAAACCTAAATTCAAGATTGAAAAGAAAGATATC
TTGGATGATGACAAGCTTGAAGGATCTAAGTTTGGAAAAGTTAATGACATCAGCTGGT
ATCAGAAGAATCCTGATTTACTCAGAGCTGCTGGTAACTTGTCTTTTGCTAACGCTTTGG
GATCTGGAATTAACCTTATCTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGAAC
AACGTATTCCTGGTATTGCAACTATACATACTATCACAGGACCTGGGCTTAGCAGAGAC
GCGCACTCTGGTGTAAACGTCGCAATGCGTAACCTTTATTCTTATGTTTCGTCATGCAAAT

AGCGGTCATAGTAATTATGACCCTGTAGATTTGATGCTTTATCTATTGGCAATGGATGA
GGCTTATATGGTCTACTATCGCGCTGTCCGTGCATATGGAGCAATGTTTACATTTAATAC
AGTAAATAGATATGCGCCTAAAGCTCTTGTTGAAGCATTAGGTTTTGATTATGAAGATG
TCAACGCAAACCTTGCTACATTCAGATATGCAATTAACGCATATGCTGCAAGAATCAAC
GCATACGCTGTTCTACGAATATGCCTATCTTCAAACGACACGCATGGCTCTTTTCATCT
ATCTATACAGATGAAAACGTATCTAAGGCTCAGATTTATGCATTTACTTCTGATCATTAT
AGAATATATGATGAGAAGTATTCTAAAGGTGGACGCCTTGTTGGCTAAAGCCTGGAAAT
CAAAGTTAACTGTACAAGACTGGATCAATGTAGCAAATCAAGTGGCAGATCCAATTAC
TGTCTCAGAGGATTTGGGTATTATATCTGGTGATATAATTAAGCATTGTTGGTAAAGAAA
ATCTACATATGCTGGCTACTTTAGCTGATAACTACATAGTTTTACCAACTTATGTTCTG
AAGTCATGGATCAAATTCATAACTTACAGGCTGTTGGTAACATTACTCTTGAGAGTAAT
AATATTGAACAAGATCCAGCAATTGGTAAAGGTAACCTTAATCTATAATCCAATTGTAAC
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAGCATATGCTGATCGTATTATGGATTTCAAATGACACT
CCGACCCCAGACGATGTAGTCATAGCTTCACGTTTAGCTGTGGCACTTGAACCTGGATC
AACAACCGATAAAGCAGTATTTACTGCAATGGGTACAGAGTTTGTAACAAAAGTTGGA
ATTCACACATTATACCGCACATCTGCGGGATCTATTAAGTGTCTTGAACAGGACTTCAA
TACTTTTGAGTCTACTGAAGGTGGTCTTGTTGACGCCTCATCAGTTAGTTTGCACTTATC
TGCATACACGAAGGCCTCTAAATTTGTACACTTTCCAATTCAATATATGTGTTTGGGTA
GCCCTACTACTCCTGACAAACGTGAAGTCAGAATTTTTGGTGAGTTGGGCACGTACACT
GTTATTAATGGGGTCACTCTTAGTAAGCTTCACGATGTGTGTGTACTGAGTCTATTTGAT
GTACCTATCAAATTATAGATACATGGAAAGTGAGGAG (SEQ ID N°: 30)

>10-PBV-19-001 Capsid

ACACTTTCTACACTCTAAGAACACCAGCTACCGCACATAGTTTAGTGCAAATAGCTAGG
ATCAGAGATAGTAAAGTGGGATTATCTGAAAGGAGGTTAAATTTAAATGACAGGTAAT
CAGATTAAGTATGGCGAATTACAAGAAAATATTCGTCATAATACAACAACAGAAGTTG
AGACTAACAGACACAACGTTGTTACGGAAGGTGAAACAAATCGTCATAATGTTGTAAC
TGAAGTCGAGACTAATCGACACAATACTGTTACTGAAAGTATTGGATGGTACGATGCTG
TATCAAAACGTATCTCAGCGAATGCTTCAATGAGTCAAGCAGGTGCAGCTTGGGCTAAC
GTGGCTATTAATCAGCAAAACGCTGACACTAAGCGCTTTGAAGCCGAACGCAATGCTG
AAATTAATCAGCAGAATGCAGACACTAAAACATTTAGTGCACGCAGTGAGGATGCCGC
TAGATATGCACATTCTTACAATGAAGATCGTAAAACTACAGCAGAAATTGAGCGAATG

AACACACAAAATTCGCAAGGATGGGTGAAATCAATAACTGATTCAATCAGTGCACCTA
TCAGAGCATTACCATTATTAGGAGGATAAATTATATGGTAAAGAATACTAATAAGAAG
CGTTTTTCAGGATAAAAAGTGAGAAATATTCTAGAAAACCTAAGTTCAAGGTTGAAAAGA
AAGATATCTTGGACGATGACAAACTTGAAGGATCTAAGTTTGGAAAAGTTAATGACAT
TTCCTGGTACCAGAAGAACCCTGATTTGCTCAGAGCTGCTGGTAACTTGTCTTTTGCTAA
TGCGTTGGGATCTGGAATTGATCTATCTAACGCAAACCTTAAACGTTAAGCTTGCTGCTG
ATGAGCAACGTGTTCCCTGGTATTGCAACTATACATACTATTACAGGACCTGGACTCAGT
CGCGACGCACACTCTGGTGTTAACGTGGCAATGCGTAACTTATATTCTTTTGTTCGTCAT
GCAAATAGTGGTCATAGTAACTATGATCCTGTAGACCTGATGCTATATCTACTAGCCAT
GGATGAAGCGTATATGGTCTACTACCGTGCTGTTCGTGCATATGGCGCAATGTTCACTT
TCAACACAGTGAATCGCTATGCTCCGAAAGCTCTTGTGGAAGCGTTAGGTTTTGATTAT
GAAGATGTCAACTCAAACCTTGCTACATTCAGATATGCAATTAACGCATACGCTGCAAG
AATCAACGCATACGCTGTGCCTACGAATATGCCTATCTTCAAACGACATGCATGGCTCT
TTTCATCTATCTATACAGATGAAAACGTATCTAAAGCTCAGATTTATGCATTTACTTCTG
ATCATTATAGAGTATTTGATGAGAAGTATTCTAAAGGTGGACGCCTTGTGGCTAAAGCC
TGGAATCAAAATTAAGTGAAGGATTGGATTACGGTAGCGAATGAAGTTGCAGATC
CTATTACAGTGTCTGAGGATTTAGGTATTATATCAGGTGACTTAATTAAGCATTGTTGGT
AAGGAAAACCTTACACATGCTGGCTACTTTAGCCGATAATTATGTCGTATTACCAACATA
TGTACCTGAGGTTATGGACCAGATTCATAACTTACAAGCTGTTGGAACAATTGACTTAG
AAAGTAATAATATTGAACAGGATCCAAACATTGGTAAGGGTAATTTAATTTACAATCCT
ATTGTTACTGTCAATAATAATCCAATAGCTTACGCAAATCGTATTATGGATTTCAAGAT
CGAGACACCTACTCCTGAAGATGTAGTTGTTGCATCGAGATTAGCCGTAGCATTAGAAC
CAGGCGCGACAACCGGTAAAGCGGTATTCAGTCTATGGGTACAGAATTTGTGACAAA
AGTTGGTATTCATACGTTCTATAAAGGAAACAATGGACTACTTACGTCTATTGAACAGA
CTTTCAATACTTTTGATTCTACTGAAGGTGGTCTTGCTGACGCCTCATCAGTTAGTTTGC
ACATGTCTGCCTACACAAAGGCCTCTAAGTTCTTACACTTTTCTATTCAATATATGTGTA
TGGGTAGCCCTACTCAACCTGACAAACGTGCAGTCAGAATCTTTGGCGAATTGGGCACT
TACACTATTGTTAATGGGGTCACTCTTAGTAAGCTTCACGATGTGTGTGTATTAAGTCTA
TTTGATGTACCTATTAACTTTAGATGCATTAGGGGAAACA (SEQ ID N°: 31)

>11-PBV-19-006 Capsid

AGTGGAGAAATTTGTACTTTAATGGTTTACAAGAGTTTAAAACCATACAACACTTTCTA

CACTCTAAGAACACCAGCTACAGCACATAGTTTAGTGCAAATAGCTAGGATCAGAGAT
AGTAAAGTGGGATTATCTGAAAGGAGGTAAATTAATGACAGGTAATCAGATTAAAT
ATGGCGAGTTACAAGAAAATATTCGTCATAACACAACAACAGAAGTCGAAACTAACAG
ACACAATGTTGTTACGGAAGGTGAAACTAACCGACACAATGTTGCTACTGAAGTTGAG
ACAAATCGACACAATACTGTGACTGAAAGTATTGGATGGTACGATGCTGTATCAAAAC
GAATCTCAGCAAATGCTTCAATGAGTCAAGCAGGTGCAGCTTGGGCAAATGTTGCTATT
AATCAGCAAAATGCTGATACAAAACGATTTGAAGCTGAGCGTAATGCTGAAATTAATC
AGCAAAACGCTGACACCAAAAGATTTAGTGACGTAAGTGGATGCCGCTAGATATGC
GCACTCCTACAACGAAGATCGTAAACTACAGCAGAAATTGAGCGAATGCACACACAG
AATTCGCAAGGATGGGTGAAATCAATTACTGATGCAATCAGTGCACCTATCAAAGCATT
ACCATTATTAGGAGGATAAATTATATGGTAAAGAATAACAACAAAAAGCGTTTTTCAGA
ATAAAAGTGAGAAATATTCTCGAAAACCTAAGTTCAAGGTTGAAAAGAAAGATATCTT
GGACGATGACAACTTGAAGGATCTAAATTTGGCAAAGTTAATGACATATCGTGGTAT
CAGAAGAATCCTGATTTACTCAGAGCTGCTGGTAACTTGTCTTTTGCTAATGCGTTGGG
ATCTGGAATTGATCTATCTAACGCAAACCTTAAACGTTAAGCTTGCTGCTGATGAGCAAC
GTATTCCTGGTATTGCAACTATACATACTATTACAGGACCTGGACTCAGTAGAGACGCT
CACTCTGGTGTCAACGTGGCAATGCGTAACTTATATTCTTTTGTTCGTCATGCAAATAGC
GGTCATAGTAATTATGATCCTGTAGATTTAATGCTTTATCTATTAGCTATGGATGAAGC
GTACATGGTCTACTACCGTGCTGTTTCGTGCATATGGCGCAATGTTACATTTAATACGG
TGAACCGCTATGCTCCAAAGGCTCTTGTTGAAGCGTTAGGTTTCGATTATGAAGATGTC
AACTCAAACCTTGCTACATTCAGATATGCAATTAACGCATACGCTGCAAGAATCAACGC
ATACGCTGTGCCTACGAATATGCCTATCTTCAAACGACATGCATGGCTCTTTTCATCTAT
CTATACAGATGAAAACGTATCTAAAGCTCAGATTTATGCATTTACTTCTGATCATTATC
GAGTATATGATGAGAAGTATTCTAAAGGTGGACGCCTTGTGGCTAAAGCCTGGAAAGC
AAAATTAACAGTACAAGATTGGATAACTGTAGCTAATGAAGTTGCAGATCCTATTACA
GTTTCTGAGGATTTAGGCATCATATCTGGTGACTTAATTAAGCGTTTGGTAAGGAAAA
CTTGCAATATGTTAGCTAATTTAGCTGATAACTACGTTGTATTACCAACTTATGTACCTGA
AGTTATGGATCAAATTCATAACTTACAATCAGTAGGAACAATCGATCTAGAGAGTAAC
AATATTGAACAAGATCCAAGTATTGGTAAGGGTAATTTAATTTATAACCCAATTGTTAC
TGTAGATAATAATCCAATGGCATTTCGCTAATCGTATTATGGATTTTAAGATCGATACAC
CTACTCCTGATGATGTAGTTGTAGCATCACGATTGGCTGTAGCATTAGAACCAGGCGCC
ACGACCGGTAAAGCAGTGTTCACTGCTATGGGTACAGAATTTGTGACCAAAATTGGTAT

TCACACATTCTGCAAAGGAAGTAATGGATTACTTAAGTCTATTGAACAGACTTTCAATA
CTTTTGATTCTGTTGAAGGTGGTCTTGCTGACGCCTCATCAGTTAGTTTGCACATGTCTG
CCTACACAAAGGCCTCTAAGTTTGTACACTTTCCTATTCAATATCTGTGTATGGGTAGCT
CTGCTCAACCTGACAAGCGTGAAGTCAGAGTCTTTGGCGAATTGGGCACTTACACTATT
GTTAGTGGGGTCACTCTTAGTAAGTTACACGATGTGTGTGTATTAAGTCTATTTGATGTG
CCTATTAACTTTAGATGCATTAGGGGAAGTG (SEQ ID N°: 32)

>14_PBV-19-015 Capsid

AGAAATTTGTACTTTAATGGTTTACAAGAGTTTAAAACCATACAACACTTTCTACACTC
TAAGAACACCAGCTACCGCACATAGTTTAGTGCAAATAGCTAGGATCAGAGATAGTAA
AGTGGGATTATCTGAAAGGAGGTTAAATTGAATAAATGACAGGTAATCAGATTAAGTA
TGGCGAATTACAAGAGAGTATTCGTCATAATTCAACGACAGAAGTCGAAACCAATAGA
CACAACGTTGTTACTGAGAATGAAACGAATCGTCACAATGTTGTAAGTGAAGTGGAGA
CTAATCGACACAATACTGTTACTGAAAGTATTGGATGGTACGATGCTGTATCAAAACGT
ATCTCAGCTAATGCTTCAATGAGTCAAGCAGGTGCAGCTTGGGCGAATGTCGCTATCAA
TCAGCAAAATGCTGATACCAAACAATTTGAAGCTGAGCGCAATGCTGAAATTAATCAG
CAAAATGCAGACACTAAAGCGTTTAGTGACGTAAGTGAAGATGCTGCGAGATATGCGC
ATTCCTACAATGAAGATCGTAAACTACAGCAGAAATCGAGCGAATGAACGCACAAAA
TTCGCAAGGATGGGTGAAATCAATTACTGATGCAATCAGCGCACCTATCAGAGCATTAC
CATTATTAGGAGGATAAATTATATGGTAAAGAATAACAACAAAAAGCGTTTTTCAGGAT
AAAAGTGATAAGTATTCTAGAAAACCTAAGTTCAAGGTTGAAAAGAAAGATATCTTGG
ACGATGACAAATTTGAAGGATCTAAGTTTGGAAAAGTTAATGACATTAGTTGGTACCA
GAAGAATCCTGATTTACTCAGAGCTGCTGGTAACTTGTCTTTTGCTAATGCGTTGGGAT
CTGGAATTGATCTATCTAACGCAAACCTTTAACGTTAAGCTTGCTGCTGATGAGCAACGT
GTTCTGCTGATTGCAACTATACATACTATTACAGGACCTGGACTCAGTCGCGACGCACA
CTCTGGTGTCAACGTGGCAATGCGTAACTTATATTCTTTTGTTCGTCATGCAAATAGCGG
TCATAGTAACTATGATCCTGTAGACTTAATGCTATATCTATTAGCCATGGATGAAGCGT
ACATGGTCTACTACCGTGCTGTTTCGTGCATATGGCGCAATGTTTCACATTTAATACAGTG
AATCGCTATGCTCCAAAAGCTCTTGTTGAAGCGTTAGGTTTTGATTATGAAGATGTCAA
CTCAAACCTTGCTACATTCAGATATGCAATTAACGCATACGCTGCAAGAATCAACGCAT
ACGCTGTGCCTACGAATATGCCTATCTTCAAACGACATGCATGGCTCTTTTCATCTATCT
ATACAGATGAAAACGTATCTAAAGCTCAGATTTATGCATTTACTTCTGATCATTATAGA

GTATTTGATGAGAAGTATTCTAAAGGTGGACGCCTTGTGGCTAAAGCCTGGAAGTCAA
 AATTGACTGTTAAGGATTGGATTACTGTAGCTAATGAAGTTGCAGATCCTATTACAGTG
 TCTGAGGACCTAGGTATTATATCAGGTGACTTAATTAAGCATTTCGGTAAGGAAAACCT
 ACATATGTTAGCTACATTAGCTGACAATTATGTTGTGTTACCAACTTATGTACCTGAGGT
 TATGGATCAAATCCATAATTTACAAGCAGTTGGAACAATCGATTTGGAAAGTAACAAC
 ATTGAACAGGATCCGACTATCGGTAAAGGGTAATTTAATTTATAACCCAATTGCAACTGT
 CAATAATAATCCATTGGCGTACGCAAATCGTATCATGGATTTCAAGATCGATACACCTA
 CTCCAGATGATGTGGTTGTGGCATCACGATTAGCTGTGGCATTAGAACCAGGCGCTACG
 ACCGGTAAAGCAGTATTTACTGCTATGGGTACAGAATTTGTGACAAAGATTGGTATTCA
 CACATTCTACAAAGGAAGTAATGGACTTATTAAGTCTATTGAACAGACTTTCAATACTT
 TTGATTCTACTGAAGGTGGTCTCACTGACGCCACATCAGTTAGTTTGCACATGTCTGCCT
 ACACAAAGGCCTCTAAGTTTGTACACTTTCCTCTTCAATATATGTGTCTGGGTAGCCCTA
 CTCAACCTGACAAACGTGAAGTCAGAATCTTTGGTGAATTGGGCACTTACACTATTATT
 AATGGGGTCACTCTTAGTAAGTTACACGACGTGTGTGTATTAAGCTTATTTGATGTACC
 TATTAACTTTAGATGCATTAGGGGAAGTG (SEQ ID N°: 33)

>15-PBV-19-016_Capsid

TTCAGTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAATTTGTACTTTAATGGTTTACAAGAGTTTA
 AAACCATACAATGCTTTTCTCACTCTAAGAACACCAGCTACCGCACATAGTTTAGTGCA
 AATAGCTAGGATCAGAGACAGAGAAGCAAGATTATCTGAAAGGAGGTTAAATATGAA
 ATGACAGGTAATCAAATTAAGTATGGCGAATTACAAGAGAACATACGCCATAACACTA
 CTACTGAGGTTGAAACCAATCGTCACAATGTTGTTACTGAAGGTGAAACTAATCGCCAT
 AACGTTGTAAGTGAAGTTGAGACTAATCGACACAATACTGTAAGTGAAGAGTATTGGAT
 GGTACGATGCCGTATCGAAAAGAATTTCTGCGAATGCATCAATGAGTCAAGCAGGTGC
 AGCTTGGGCTAATGTTGCAATTAATCAGCAAAATGCGGATACACGCAGATATGAAGCT
 GAGAGCAATGTTGCAATTAATCAACAGAACGCAGATACAAAGGCATTTAGTGCCAGAA
 GTGAAGATGCTGCTAGATATGCTCATTCATATAACGAAGATCGCAAACTACAGCTGA
 AATTGAGCGAATGAACACTCAAAATTCACAGGGATGGGTGAAATCAATTACTGATGCA
 ATCAGTGCACCTATCAAAGCATTACCATTATTAGGAGGATAAATTATATGGTAAAGAA
 GAATGACAACAACAAACGTTTTTCAGAATAAAAGTGAGAAATATTCTAGAAAACCTAGA
 TTCAAGATTGAGAAGAAAGATATCTTGATGATGACAAGCTTGAGGGATCTAAGTTTG
 GAAAAGTTAATGACATCAGCTGGTATCAGAAGAACCCTGATTTACTCAGAGCTGCTGGT

AACTTGTCTTTTGCTAACGCTTTGGGATCTGGAATTAACCTTATCTAACTCAAACCTTTAAT
 ATTAAGCTTGCTGCTGATGAACAACGTGTTCTGGTATTGCAACTATACATACTATTAC
 AGGACCTGGGCTTAGCAGAGACGCACACTCTGGTGTAAACGTCGCAATGCGTAACCTTT
 ATTCTTATGTTTCGTCATGCAAATAGTGGTCATAGTAATTATGATCCTGTAGATCTAATGC
 TTTATCTCTTAGCCATGGATGAAGCTTATATGGTCTACTATCGTGCCGTTTCGTGCATATG
 GAGCAATGTTTACATTTAACACAGTGAATAGATATGCGCCTAAAGCTCTTGTTGAAGCA
 TTAGGTTTTGATTATGAAGATGTCAACGCAAACCTTGCTACATTCAGATATGCAATTAA
 CGCATACGCTGCAAGAATCAACGCATACGCTGTTCTACGAATATGCCTATCTTCAAAC
 GACACGCATGGCTCTTTTCATCTATCTATACAGATGAAAACGTATCTAAGGCTCAGATT
 TATGCATTTACTTCTGATCATTATAGAACATATGATGAGAAGTATACTAAAGGTGGACG
 CCTTGTTGGCTAAAGCCTGGAAACCAAAGTTAACTGTACGAGATTGGATCGCAGTATCA
 AATGAAGTTGCGGATCCAATTACTGTTTCTGAAGATTTGGGTATTATATCTGGTGATAT
 AATTAAGGCTTTTGGTAAAGAAAATCTGCATATGTTAGCTACACTGGCTGACAATTATG
 TTGTATTACCAAGCTATGTGCCTGAAGTTATGGATCAAATTCATAACCTACAAGCAGTA
 GGTGATGTAGCTCTTGAGAGCAATAACATCGAACAAGATCCAACAATTGGTAAGGGCA
 ATTTAATCTATAACCCAATTGTAACAGTTAACAATAATCCTTTAGCGTACGCTGATCGC
 ATTATGGATTTCAAAATTGACACTCCAACCTCCGGATGATGTAGTCGTAGCTTCTCGTTTA
 GCTGTGGCTCTTGAACCCGGGTCAACAACCGGTAAAGCAGTATTCAGTCTATGGGTAC
 AGAATTTGTAACAAAAGTTGGAATTCACACATTATACCGCACAACTGAGGGATCTATTA
 AGTGTATTGAACAGATTTTCAATACTTTTGAGTCTACTGAAGGCGGTCTTGCTGACGCC
 GCATCAGTTAGTCTGCACCTATCTACATACACGAAGGCCTCTAAGTTTGTACACTTTCC
 AATTCAATATATGTGTCTGGGTAGCCCTACTACTCCTGACAAACGTGAAGTCAGAATCT
 TTGGTGAATTGGGCACGTACACTGTTATTAATGGGGTCACTCTTAATAAGTTACACGAT
 GTGTGTGTATTGAGTCTATTTGATGTACCTATTAACTTTAGATGCATTAGGGGAAGTG
 (SEQ ID Nº: 34)

>23-PBV-19-035_Capsid

TTAGGAGAAAATTTGTACTTTAATGGTTTACAAGAGTTTAAAACCATACAACACTTTCT
 AACTCTAAGAACACCAGCTACAGCACATAGTTTAGTGCAAATAGCTAGGATCAGAGA
 TAGTAAAGTGGGATTATCTGAAAGGAGGTTAAATTAAATGACAGGTAATCAAATTAAG
 TATGGCGAATTACAAGAAAATATTCGTCATAACACTACAACAGAAGTTGAAACTAATA
 GGCACAACGTTGTTACAGAAGGCGAGATTAACCGACACAACATTGTGACTGAAGTGGA

AACGAATCGACACAATACTGTTACTGAAAGTATTGGATGGTACGATGCTGTATCAAAG
CGAATCTCAGCAAACGCTTCAATGAGCCAGGCAGGTGCAGCTTGGGCTAATGTTGCTAT
TAATCAGCAGAATGCTGATACTAAGCGATTTGAAGCAGAACGCAATGCTGAAATTAAT
CAGCAAAATGCAGACACTAAAACATTTAGTGCACGTAGTGAGGACGCCGCTAGATATG
CGCACTCCTACAATGAGGATCGGAAAACCTACAGCAGAAATTGAGCGAATGAACACACA
GAATTCGCAAGGATGGGTGAAATCTATCACTGATGCAATCGGTGCACCTATCAAAGCA
TTACCATTATTAGGAGGATAAATTATATGGTAAAGAATAATAACAAGAAGCGTTTTTCAG
GATAAAAGTGAGAAATATTCTAGAAAACCTAAGTTCAAGGTTGAAAAGAAAGATATCT
TGGACGATGACAAATTGGAAGGATCTAAGTTTGGCAAAGTTAATGACATATCATGGTA
CCAGAAGAATCCTGATTTACTCAGAGCTGCTGGTAACTTGTCTTTTGCTAATGCGTTGG
GATCTGGAATTGATCTATCTAACGCAAACCTTTAACATTAAGCTTGCTGCTGATGAGCAA
CGTATTCCTGGTATTGCAACTATACATACTATTACAGGACCTGGACTCAGTAGAGACGC
ACACTCTGGTGTCAATGTGGCAATGCGTAACTTATATTCTTTTGTTTCGTCATGCAAATAG
TGGTCATAGTAACTATGATCCTGTAGACTTAATGCTTTATCTATTAGCTATGGATGAAG
CGTATATGGTTTACTACCGTGCTGTTTCGTGCATATGGCGCAATGTTACGTTTAATACAG
TGAATCGCTATGCTCCAAAAGCTCTTGTTGAAGCGTTAGGTTTTGATTATGAAGATGTC
AACTCAAACCTTGCTACATTCAGATATGCAATTAACGCATACGCTGCAAGAATCAACGC
ATACGCTGTGCCTACGAATATGCCTATCTTCAAACGACATGCATGGCTCTTTTCATCTAT
CTATACAGATGAAAACGTATCTAAAGCTCAGATTTATGCATTTACTTCTGATCATTATA
GAGTATATGATGAGAAGTATTCTAAAGGTGGACGCCTTGTGGCTAAAGCCTGGAAATC
AAAATTGACTGTAAAAGATTGGATTACTGTAGCAAATGAAGTTGCAGATCCTATTACAG
TTTCTGAAGATTTAGGTATCATTTTCAGGTGACTTAATTAAGGCATTTGGTAAAGAGAAT
TTACACATGCTAGCTACACTAGCTGATAACTATGTAGTGCTACCAACATATGTACCTGA
AGTTATGGACCAAATTCATAACTTACAAGCTGTAGGAGCGATTGACCTAGAAAGTAAC
AATATCGAACAGGATCCAAATATTGGTAAGGGTAATTTAATCTATAACCCGATTGTCAC
TGTTAATAATAATCCTATGGCATAACGCGAATCGTATTATGGATTTCAAGATTGATACAC
CTACCCCTGATGATGTAGTTGTAGCATCCAGATTAGCTGTAGCATTGGAACCAGGCGCA
ACTACCGGTAAAGCAGTATTTACTGCCATGGGTACGGAATTTGTGACAAAAGTTGGTAT
TCACACATTCTTCAAAGGAAGTAATGGATTACTTAAACTATTGAACAGACTTTCAACA
CTTTTGATTCTACTGAAGGTGGTCTCACTGACGCCGCATCAGTTAGTTTGCACATGTCTG
CCTACACAAAGGCCTCTAAGTTTGTACACTTTCCTATTCAATATATGTGTATGGGCAGC
CCTACTCAACCTGACAAACGTGAAGTCAGAGTCTTTGGCGAATTGGGCACGTACACTAT

TGTTAATGGGATCACTCTTAGTAAGTTACACGACGTGTGTGTATTAAGTCTATTTGATGT
ACCTATTAAACTTTAGATGCATTAGGGGAAGTG (SEQ ID N°: 35)

>25-PBV-19-038 Capsid

AATTTGTACTTTAATGGTTTACAAGAGTTTAAAACCATACAACACTTTCTACACTCTAA
GAACACCAGCTACTGCACATAGTATAGTGCAAATAGCTAGGATCAGAGATAGTGAAGT
GGGATTATCTGAAAGGAGGTTAAATTAATGACAGGTAATCAAATTAATATGGTGAAT
TACAAGAGAATATTCGCCATAACACAACAACAGAAGTTGAAACCAATAGACATAACGT
TGTAAGTGAAGGTGAAACTAACAGACATAACGTTGTCACAGAGGTTGAGACTAATCGA
CACAATACTGTGACTGAAAGTATTGGATGGTACGATGCTGTATCAAAACGTATCTCAGC
AAATGCTTCAATGAGCCAAGCCGGTGCAGCTTGGGCTAACGTTGCAATCAATCAACAA
AATGCAGACACGAAACGATTTGAGGCTGAACGTAATGCTGAAATAAATCAGCAAAATG
CGGATACTAAAGCATTTAGTGCACGCAGTGAGGATGCAGCTAGATATGCTCATTCTTAC
AATGAGGATCGTAAGACTACAGCAGAAATTGAGCGAATGAACACACAAAATTCGCAAG
GATGGGTGAAGTCAATCACTGATGCAATTAGCGCACCTATCAAAGCATTACCATTATTA
GGAGGATAAATTTTATGGTAAAGAATAACAACAAGAAGCGTTTTTCAGGATAAAAGTGA
GAAATATTCTAGAAAACCTAAGTTCAAGGTTGAGAAGAAAGATATCTTGACGATGAC
AAATTGGAAGGATCTAAGTTTGGCAAAGTTAATGACATATCCTGGTATCAGAAGAATC
CTGATTTACTCAGAGCTGCTGGTAACTTGTCTTTTGCTAATGCGTTGGGATCTGGAATTG
ATCTATCTAACGCAAACCTTTAACGTTAAGCTTGCTGCTGATGAGCAACGTGTTCCCTGGT
ATTGCAACTATACATACTATTACAGGACCTGGACTCAGTCGCGACGCACACTCTGGTGT
CAACGTGGCAATGCGTAACTTATATTCTTTTGTTTCGTCATGCAAATAGTGGTCATAGTA
ACTATGATCCTGTAGATTTAATGCTATATCTACTTGCTATGGATGAAGCATATATGGTCT
ACTACCGTGCTGTTTCGTGCATATGGCGCAATGTTACATTTAATACCGTGAACCGCTAT
GCTCCAAAAGCTCTTGTGGAAGCGTTAGGTTTTGATTATGAAGATGTCAACTCAAACCT
TGCTACATTCAGATATGCAATTAACGCATACGCTGCAAGAATCAACGCATACGCTGTGC
CTACGAATATGCCTATCTTCAAACGACATGCATGGCTCTTTTCATCTATCTATACAGATG
AAAACGTATCTAAAGCTCAGATTTATGCATTTACTTCTGATCATTATAGAGTATATGAT
GAGAAGTATTCTAAAGGTGGACGCCTTGTGGCTAAAGCCTGGAAATCAAAGTTAACTG
TCAATGATTGGATAACTGTAGCTAATGAAGTTGCGGATCCAATTACAGTCTCTGAGGAT
CTAGGAATCATCTCGGGTGACTTAATCAAGGCATTTGGTAAAGAGAATTTACATATGCT
AGCTACTTTAGCTGACAATTATGTTGTATTACCAACATATGTACCTGAAGTTATGGATC

AGATTCATAACTTACAAGCAGTAGGTCAAATTGATCTAGAAAGTAATAATATTGAACA
GGATCCAAATATTGGAAAGGGTAATTTAATTTACAATCCTATTGTAACGTCAATAATA
ATCCAATGGCATATGCTAACCGCATCATGGATTTCAAGATTGATACACCTACACCAGAT
GATGTTGTTGTAGCTTCACGATTAGCTGTGGCATTAGAACCAGGCGCTACAACCGGTAA
AGCAGTATTCACTGCCATGGGTACAGAGTTTGTGACAAATGTTGGTATTACACATTCT
ACAAAGGAAGTAATGGATTGCTTAAATCTATTGAACAACTTTCAACACTTTTGATTCT
ACTGAAGGTGGTCTTACTGACGCCGCATCAGTTAGTTTGCACATGTCTGCCTACACAAA
GGCCTCTAAGTTTGTACACTTTCCTATTCAATATATGTGTATGGGTAGCTCTACTCAACC
TGACAAGCGTGAAGTCAGAGTCTTTGGCGAATTGGGCACGTACACTATTGTTAATGGGG
TCACTCTTAGTAAGTTACACGATGTGTGTGTATTAAGTCTATTTGATGTACCTATTAAAC
TTTAGATGCATTAGGGGAAGTG (SEQ ID N°: 36)

>27-PBV-19-044_Capsid

TTTCTAGTAAGAACTTAAAAGTTATTTACTAGAAAGGAGAAATTTGTACTTTAATGGTT
TACAAGAGTTTAAAACCATACAACACTTTCTACACTCTAAGAACACCAGCTACTGCACA
TAGTATAGTGCAAATAGCTAGGATCAGAGATAGTGAAGTGGGATTATCTGAAAGGAGG
TTAAATTAATGACAGGTAATCAAATTAATATGGTGAATTACAAGAGAATATTCGCCAT
AACACAACAACAGAAGTTGAAACCAATAGACATAACGTTGTAACGTGAAGGTGAAACTA
ACAGACATAACGTTGTCACAGAGGTTGAGACTAATCGACACAATACTGTGACTGAAAG
TATTGGATGGTACGATGCTGTATCAAAACGTATCTCAGCAAATGCTTCAATGAGCCAAG
CCGGTGCAGCTTGGGCTAACGTTGCAATCAATCAACAAAATGCAGACACGAAACGATT
TGAGGCTGAACGTAATGCTGAAATAAATCAGCAAATGCGGATACTAAAGCATTTAGT
GCACGCAGTGAGGATGCAGCTAGATATGCTCATTCTTACAATGAGGATCGTAAGACTA
CAGCAGAAATTGAGCGAATGAACACACAAAATTCGCAAGGATGGGTGAAGTCAATCAC
TGATGCAATTAGCGCACCTATCAAAGCATTACCATTATTAGGAGGATAAATTTTATGGT
AAAGAATAACAACAAGAAGCGTTTTTCAGGATAAAAGTGAGAAATATTCTAGAAAACCT
AAGTTCAAGGTTGAGAAGAAAGATATCTTGGACGATGACAAATTGGAAGGATCTAAGT
TTGGCAAAGTTAATGACATATCCTGGTATCAGAAGAATCCTGATTTACTCAGAGCTGCT
GGTAACTTGTCTTTTGCTAATGCGTTGGGATCTGGAATTGATCTATCTAACGCAAACCTT
AACGTTAAGCTTGCTGCTGATGAGCAACGTGTTCTGGTATTGCAACTATACATACTAT
TACAGGACCTGGACTCAGTCGCGACGCACACTCTGGTGTCAACGTGGCAATGCGTAACT
TATATTCTTTTGTTCGTCATGCAAATAGTGGTCATAGTAACTATGATCCTGTAGATTTAA

TGCTATATCTACTTGCTATGGATGAAGCATATATGGTCTACTACCGTGCTGTTTCGTGCAT
 ATGGCGCAATGTTACATTTAATACCGTGAACCGCTATGCTCCAAAAGCTCTTGTGGAA
 GCGTTAGGTTTTGATTATGAAGATGTCAACTCAAACCTTGCTACATTCAGATATGCAAT
 TAACGCATACGCTGCAAGAATCAACGCATACGCTGTGCCTACGAATATGCCTATCTTCA
 AACGACATGCATGGCTCTTTTCATCTATCTATACAGATGAAAACGTATCTAAAGCTCAG
 ATTTATGCATTTACTTCTGATCATTATAGAGTATATGATGAGAAGTATTCTAAAGGTGG
 ACGCCTTGTTGGCTAAAGCCTGGAAATCAAAGTTAACTGTCAATGATTGGATAACTGTAG
 CTAATGAAGTTGCGGATCCAATTACAGTCTCTGAGGATCTAGGAATCATCTCGGGTGAC
 TTAATCAAGGCATTTGGTAAAGAGAATTTACATATGCTAGCTACTTTAGCTGACAATTA
 TGTGTATTACCAACATATGTACCTGAAGTTATGGATCAGATTCATAACTTACAAGCAG
 TAGGTCAAATTGATCTAGAAAGTAATAATTGAACAGGATCCAAATATTGGAAAGGG
 TAATTTAATTTACAATCCTATTGTAAGTGTCAATAATAATCCAATGGCATATGCTAACC
 GCATCATGGATTTCAAGATTGATACACCTACACCAGATGATGTTGTTGTAGCTTCACGA
 TTAGCTGTGGCATTAGAACCAGGCGCTACAACCGGTAAAGCAGTATTCAGTCCATGG
 GTACAGAGTTTGTGACAAATGTTGGTATTCACACATTCTACAAAGGAAGTAATGGATTG
 CTTAAATCTATTGAACAAACTTTCAACACTTTTGATTCTACTGAAGGTGGTCTTACTGAC
 GCCGCATCAGTTAGTTTGCACATGTCTGCCTACACAAAGGCCTCTAAGTTTGTACACTTT
 CCTATTCAATATATGTGTATGGGTAGCTCTACTCAACCTGACAAGCGTGAAGTCAGAGT
 CTTTGGCGAATTGGGCACGTACACTATTGTTAATGGGGTCACTCTTAGTAAGTTACACG
 ATGTGTGTGTATTAAGTCTATTTGATGTACCTATTAACTTTAGATGCATTAGGGGAAG
 TG (SEQ ID Nº: 37)

>28-PBV-19-046_Capsid

TGTAAATAACTTTTAAGTTCTTACTAGAAAGGAGAAATTTGTACTTTAATGGTTTACAA
 GAGTTTAAAACCATACAACACTTTCTACACTCTAAGAACACCAGCTACTGCACATAGTA
 TAGTGCAAATAGCTAGGATCAGAGATAGTGAAGTGGGATTATCTGAAAGGAGGTTAAA
 TTAATGACAGGTAATCAAATTAAATATGGTGAATTACAAGAGAATATTCGCCATAACA
 CAACAACAGAAGTTGAAACCAATAGACATAACGTTGTAAGTGAAGGTGAAACTAACAG
 ACATAACGTTGTCACAGAGGTTGAGACTAATCGACACAATACTGTGACTGAAAGTATT
 GGATGGTACGATGCTGTATCAAAACGTATCTCAGCAAATGCTTCAATGAGCCAAGCCG
 GTGCAGCTTGGGCTAACGTTGCAATCAATCAACAAAATGCAGACACGAAACGATTTGA
 GGCTGAACGTAATGCTGAAATAAATCAGCAAAATGCGGATACTAAAGCATTTAGTGCA

CGCAGTGAGGATGCAGCTAGATATGCTCATTCTTACAATGAGGATCGTAAGACTACAG
CAGAAATTGAGCGAATGAACACACAAAATTCGCAAGGATGGGTGAAGTCAATCACTGA
TGCAATCAGCGCACCTATCAAAGCATTACCATTATTAGGAGGATAAATTTTATGGTAAA
GAATAACAACAAGAAGCGTTTTTCAGGATAAAAAGTGAGAAATATTCTAGAAAACCTAAG
TTCAAGGTTGAGAAGAAAGATATCTTGGACGATGACAAATTGGAAGGATCTAAGTTTG
GCAAAGTTAATGACATATCCTGGTATCAGAAGAATCCTGATTTACTCAGAGCTGCTGGT
AACTTGTCTTTTGCTAATGCGTTGGGATCTGGAATTGATCTATCTAACGCCAACTTTAAC
GTTAAGCTTGCTGCTGATGAGCAACGTGTTCTGGTATTGCAACTATACATACTATTAC
AGGACCTGGACTCAGTCGCGACGCACACTCTGGTGTCAACGTGGCAATGCGTAACTTAT
ATTCTTTTGTTTCGTCATGCAAATAGTGGTCATAGTAACTATGATCCTGTAGATTTAATGC
TATATCTACTTGCTATGGATGAAGCATATATGGTCTACTACCGTGCTGTTTCGTGCATATG
GCGCAATGTTACATTTAATACCGTGAACCGCTATGCTCCAAAAGCTCTTGTGGAAGCG
TTAGGTTTTGATTATGAAGATGTCAACTCAAACCTTGCTACATTCAGATATGCAATTAA
CGCATACGCTGCAAGAATCAACGCATACGCTGTGCCTACGAATATGCCTATCTTCAAAC
GACATGCATGGCTCTTTTCATCTATCTATACAGATGAAAACGTATCTAAAGCTCAGATT
TATGCATTTACTTCTGATCATTATAGAGTATATGATGAGAAGTATTCTAAAGGTGGACG
CCTTGTGGCTAAAGCCTGGAAATCAAAGTTAACTGTCAAAGATTGGATAACTGTAGCTA
ATGAAGTTGCGGATCCAATTACAGTCTCTGAGGATCTAGGAATCATCTCGGGTGACTTA
ATCAAGGCATTTGGTAAAGAGAATTTACATATGCTAGCTACTTTAGCTGACAATTATGT
TGTATTACCAACATATGTACCTGAAGTTATGGATCAGATTCATAACTTACAAGCAGTAG
GTCAAATTGATCTAGAAAGTAATAATATTGAACAGGATCCAATATTGGAAAGGGTAA
TTTAATTTACAATCCTATTGTAACTGTCAATAANAATCCAATGGCATATGCTAACCGCA
TCATGGATTTCAAGATTGATACACCTACACCAGATGATGTTGTTGTAGCTTCACGATTA
GCTGTGGCATTAGAACCAGGCGCTACAACCGGTAAAGCAGTATTCACTGCCATGGGTA
CAGAGTTTGTGACAAATGTTGGTATTCACACATTCTACAAAGGAAGTAATGGATTGCTT
AAATCTATTGAACAACTTTCAACACTTTTGATTCTACTGAAGGTGGTCTTACTGACGC
CGCATCAGTTAGTTTGCACATGTCTGCCTACACAAAGGCCTCTAAGTTTGTACACTTTCC
TATTCAATATATGTGTATGGGTAGCTCTACTCAACCTGACAAGCGTGAAGTCAGAGTCT
TTGGCGAATTGGGCACGTACACTATTGTTAATGGGGTCACTCTTAGTAAGTTACACGAT
GTGTGTGTATTAAGTCTATTTGATGTACCTATTAACTTTAGATGCATTAGGGAATGTT
(SEQ ID Nº: 38)

96

GAGCCATTCTTCTCAATCGAAATGGCAGAACAGCTAAATAATGCAGATATTGTGCCTAT
TAAACCATTCCTAAGGATATCACAATAAGGGTTTCACACGTAAAACAGCTACAGACT
TTGATATTATTCAGGATGTAGACAGAAACATTCTGTACAGTGATCCAAATACTTGGCTA
CACTCATCTGTAGATTGGGATAAAGTATTCTACTTACCAACTCTAAGACTAATTAATAC
TAGCGTGGTTAATCCAAATCCAGCTGTAGTCATGGCTTCAACTAGATTAAAAGTGGCTA
TTGNN
NN
NN
NN
NN
NN
NNNNNNNNNAGCAAGAGCGAGGTTTACTACACTTCAGAATCTAGCAAATTTCACTCCAA
TCAGTAACTTCAAGTTAGCTGATTTGCATTCTGTTGCAATAATGGGTGAATTCAATATA
CCNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN (SEQ ID N°: 39)

>14PBVKM-19-015_Capsid

NNNNNNNNTTTATTTATTTCTTTAGAGCATTTCGCTCTTCAAAACAATCCACTTTTAAATC
TTTAGAAAGTTAGATTCTAAACAACTTTTCATATATCTAGAAAGCATTTGTATGATTTA
ACCACAGAAAGGAGGTTAAACACTTATGTTTTATGTGATTTACAATACTCGAAACTGTG
GCACAGACTGGTCATTACGTTTGTGTCCTTTAATCGAGTAGTAACATCCAGAAAGGAGG
TCGATATGACCGAGAACCAATTAATAATTTGGGATTTGCAGGAATTAACACGGCATAA
CCTGCGAACAGAAGAATTGGATCAGTACAGAACTGACAAACAATTCGAAGGAACTAAG
TATAGTGCGGATAAGAATACTACGAAGGTGTAGTTTATTCAGCTAACAAGAATTATGAAG
GAGTGAAATACTCCGCTGATCGACACTATGCTGCAGCGATTGGATCAGCAAGAATACA
TGCTGGTGCTACAGTAGCAGCAGCGAGAATTGGAGCAGGCGCAGCAGTCGCTTCTGCT
CGTATTAATGCTAATGCTGCAATTAGTTCTGCACAAATTGGAGCTGCGTCAAACATGTT
CAATTCACAGAGAATGGCAGCTGCACAACAGTATAGTGCTGATAGACATTATCAAGCA
CAGGTAACAACAACGCGTATGAATAATTACCAGTCGTGGAAGAACACACGTGACACTA
ACGACGCTAGCAACTTCAATGCACTTATTGGTGCATTTGGTAAAGTTGGCGCTGCAGCG
GTTGGATCTGGTATGAGACGCGGAAGATAGAAAGGAGGCCAATAATGGCTAAGAAATC
AAACACTAATTCAAGATCCAAGTTTAAGGGAGAACCAGACTTTAAGTCAAAGGAGGT

AAATTCAATGGTAAAGGTAACAGAAACAGGAGATCAGATGGTAGAAGCGCTAACGGC
ATACCTGAAGAATCAGGAGACAAATTCGAAAAGCAGCGCAACAGTGACAGAACCAAC
TCTGTCAATTGGTATGCTCCTACTGAGCGCATACTTACAGATACAGCAACGATCCCGTT
CAACCACGCGATTGGTAACGTATTTGACGATAGTATTTCTAACGTTTCGTCTTGTTAATGC
TATTCCTGGTATTATGGAAGTCAAGTACATACCCACAATTGGCGTAAGCACTGACTATT
CATCACCAATTAATATTGCAGCTAAGAATATATATTCTAATATTAGGCACAGTATCTCA
GGTACTAGAAAGTATGATGCAAGTGACGTCATGACTTATCTAATAACCAATTACATCAAT
ATTCAATTACTGGGCTTGGTGCTGCAGACTGTACGGAATTCACAAATATTTTCGTACTCA
GGAATAGATATGTACCTGAAGGCATATTCCGTGCTATGCACGTGGATTATGATGATTTT
GTCAATCATCTAGCTGACTTTAGGGCTAAACTAAATCAGATAGCGTTCCGCCTATCTAA
TTACAAGTTACCAAAAGATATTCCACTGATCGATAGACAGATGTTACTTAACGAAGGA
ATATTTGCAGACGGCATGAGTGATCTAGACCAGATCTACTTCTATAATACTATAGGCCA
CTATAAATATCAGCCAGCCATGACTGAAACTGGTGGTTCATGCCAACTAATTCCATCTA
TCACGGAATTATTTACTTACAATAAACCAGCAAAAAGTTTCTGATTTAATCAGCTACTTT
GATCAGTTATTCTTTGATATTAATACGGATAATGATTTTCGATAAGATCGGTGCTGATATT
GAAACTGCATATTCCGATGGAGCACTTATGCATATAGCTGAACTTACAGAAGATTACAG
CATTGCTCCAATCTACTCGTTGGAAATGAATGAACAGCTTAACAACGCTGACATTCTAC
CAATCAATCCATTCCCTAAGGATATCACAATAAGGGATTCACTCGTAAAACAGCAAG
CGTATACGACATAGTGCAAGGATGTTGATAGAAACATTCTATACCATGATCCAGCTTCGT
GGCTATACAATATCAACGGAGATGGAGAAACGTTTGATTTGCCTACTTTACGTATTTTA
AATACTAAAGTATCTGACCCTAATCCTAGTATTATTATGGCAGCCACTCGACTAAAAGT
AGCGATTGATGAAACTGGGAAAATACTAGGTTGCGGAACTGAAATTGTAACAGGTATC
ACTGTGCATAATATGTCACAAGATATTGATACTAAGGGTAAGTGGTACACCGTACCACA
GGAGTGGTCCATTAAATCCAATATTGTATACACTATTAACGGTGAGTTTAAAGTCATTT
ACTCACGTGACGAAAATAGTGGAGAAATTGGAAACCTTATGGGTCTGAAGTATCTACT
AGAATATTTTCAGCAAGTGGGAGTATGCTCCTATGATATACACATATGATGTAGCACCTC
TATTAGATAACGAGGAAACAGTAGCTCAATTTAAGAGCAAGAATAAGGAAGCAAGAG
GTAGATTTACTACGCTCCAGAATTTGGCCAATTTACACCAATTAGTAACTTCAAATA
AGTGATTTACACTCAGTTGCTATCATGGGTGAATTTAACATACCTGGCACAATTAGTTA
TAAAGGTACTAAATAACATTTAGTGTAAGGTATGCAGTAGGGAGAACCCTACTGCAT
ACC (SEQ ID N°: 40)

>18PBVKM-19-023_Capsid

NNNNNNNNNNNTTTATTTTCTTTAGAGCATTCGCTCTTCAAAACAATCCACTAATAAT
CTTTTAGAAGTTAGATTCAAAACAACTTTCTATATCTTAAGAACATTTGTATGATTTAA
CCACAGAAAGGAGGTAAACACTTATGTTTTATGTGATTTACAATACTCGAAACTGTGG
CACAGACTGGTCATTACGTTTGTGTCCTTTAGTCGAGTAGCAACATCCAGAAAGGAGGT
CGATATGACCGAAAACCAATTAAAGTATTGGGATTTGCAGGAAACAAAACGGCATAAC
CTGCGAACAGAGGAATTGGATCAGTATCGAACTGATAAACAATTCGAAGGTACTAAGT
ATAGTGCAGATAAGAACTACGAAGGAGTAGTTTATTCAGCAAACAAGAATTACGAAGG
AGTCAAGTACTCCGCTGACAGACACTATGCAGCAGCAATTGGATCAGCAAGAATACAT
GCTGGTGCTACCGTAGCAGCAGCAAGAATTGGAGCAGGCGCAGCAGTCGCTTCTGCCC
GTATTAGTGCTAACGCTGCAATTAGTTCCGCACAAATTGGAGCAGCTTCAAATATGTTT
AATTCACAAAGAATGGCTGCCGCACAACAGTATAGTGCTGATAGACATTATCAAGCAC
AGATAACAACACTACGCGTATGAATAATGCACAATCCTGGAAGAACACCAGAGATACTAA
CGATGCAAGTAACTTTAATGCCCTCATTGGAGCATTTGGAAAGATAGGAGCATCAGCA
GTTAGTTCAGGCATGAGACGCGGAAGATAGAAAGGAGGCCAAATATGGCTAAGAAAA
CAAACACTAAATCAAGATCCAAGTTTAAGGGAGAACCAGACTTTAAGTCAAAGGAGG
TAAATTTAATGGTAAAAGTGACAGAAACAGGAGATCAAATGGTAGAGGCGCTAACAGC
TTACCTGAAGAATCAGGAGACAAATTCGAAAAGCAGCGCAACAGTGACAGAACCAACT
CTGTCAATTGGTATGCTCCTACTGAGCGCATACTTGCAGATACAGCAACGATCCCGTTC
AACCACGCGATTGGTAACGTATTTGACGATAGTATTTCTAACGTTTCGTCTTGTTAATGCT
ATTCCTGGTATTATGGAAGTCAAGTACATACCCACAGTTGGCGTAAGCACTGACTATTC
ATCACCAATTAATATTGCAGCAAAGAATATTTATTCTACAATTAGACACGAAATTTTCAG
GTACAAGGAAATATGACGCTAGTGACGTCATGACGTACCTAATTCCAATAACATCAATC
TTTAATTATTGGGCTTGGTGCTGCAGACTATATGGAATACATAAATACTTCGTCCTTAG
GAATAGATATGTTCTGAAGGCATTTTCCGTGCTATGCACGTTGATTATGATGATTTTGT
AAATCATCTAGCTGATTTTAGAGCCAAACTAAATCAGATCGCGTTCAGACTATCAAAC
ATAAATTACCAAAGGATATTCCATTAATTGATCGTCAGATGCTTCTAAACGAGGCAATC
TTTGCTGACGGAATGAGTGATCTTGACCAGATCTATTTTTATAATACTATAGGACATTAT
AAGTATCAGCCTGCTATGACAGATACAGGTGGTGCTTGCCAGCTTATTCGTCCATTAC
TGAAGTGTTCACCTACAATAAACCAGCTAAGGTATCCGACTTAATTGAATATTTTGATA
AATTGTTTTTCGATATTAATACAGATAATGATTTTGACAAGATCGGAGCCGATATTGAA
ACTGCTTATTCTGAGAATGCTCTAATGCATATAGCTGAATTAACGGAGGACTATAACAT

NN
NN
NN
NN
NN
NN
NN
NN
NNNACACTAC
GCTGCAGCTATTGGATCTGCTAAAATTCATGCTGGTGCAACAGTAGCAGCTGCTCGCAT
CGGAGCTGGCGCTGCAATCGCTT CAGCAAGAATTGGAGCTAACGCTGCAATTAGTTCTT
CACAAATTNN
NN
NN
NN

[illegible]

[illegible]

AAATTACTACTACCAAGATGAATAATTACCAATCTTGGAAGAATACGCGTGATACTAAT
GACGCGAGCAATTTCAATGCACTGATAGGTGCATTTGGAAAGGTCGGCGCTGCAGCAG
TTGGGAGCGGCTTGAGAGGTTCGCAGATAAGAAAGGAGGCCTACTATGGCTAAGACAAA
CAAACTAATAAAAAGATCCAGGTCTAAGGGAGACTTCAAGAATGACACTAGAGGAGG
AAACAGAAATGGTAAAGGTAACAGAAACAAGCGACCAGATAGTAGAGGCGCTAGCGA
ACTACCTAAAGACGCCCAGGGAAGAGGGGACGAGCAATTTAAGAATGACGGAACCAA
CAATGTCAATTGGTATGCTCCTACTGAACGCATACTTAATGACACAGCAACGATCCCGT
TCAACCACGCGATTGGTAACGTATTTAACGATAGTATTCCTAACGTTTCGTCTTGTTAATG
CTATTCCTGGTATTATGGAAGTCAAGTACATTCCCACAATTGGCATAAGTACAGACTAC
TCCTCACCAATAAACATTGCAGCTAAGAATATTTATTCAACTATACGTCACAGTATCTC
AGGCACAAGAAAATATGATGCTAGTGATGTTATGACTTATCTGATTCCAATTACATCAA
TCTTTAATTATTGGAAGTGGTGCTGCAGGTTATATGGTATTCACAAGTATTTTGTTTTAA
GGAACAGATACGTGCCTGAAGGTATATTCCGTGCTATGCACGTTGATTACGATGATTTC
GTTAATAACCTAGCTGATTTTCAGAGCTAAGCTAAATCAGATTGCTTTTCAGGTTGTCAAA
TTATAAACTACCTAAGGATATACCGCTAATAGATAGACAGACTCTATTAAATGAAGCG
GTATTCAAAGATGGTGATAGTGATCTTGACCAGATTTACTTCTTCAATCCAATTGGCCA
CTATAAGTATCAGCCTGTACTTACTCAAACAGGTGGTGCTTGCCAGCTGGTTCCATCTA
TTACTGAACTGTTCACTTACAATAAGCCAGCTAAGGTAAAGGACCTAATATCCTATTTT
GATACTCTATTCTTTGATATCAATACAGATAATGATTTTCGATAAGATTGGAGCTGATAT
CGAAACTGCGTACTCAGATAATGCACTTATGCATATCGCTGAGCTCACTGAGGATTATA
TGATTGAGCCTTTCTTCTCAATTGAGATGGCTGAACAGTTAAATAACGCAGATATTGTG
CCTATTAAACCATTCCCTAAGGATATCACAATAAGGGATTACACGTAAGAACTGCTAC
GGATTTTCGACATTATTCAGGATGTAGATAGAAATATTCTATATAGCGATCCAAATACTT
GGCTACATTCTGATGTAACTGGGATCAGGTATTTTATTTACCTACACTGAGATTAATCA
ACACAAGCGTGGTTAACCCAAACCCAGCTGTAGTAATGGCTTCGACAAGATTAAAAGT
AGCTATTGATGAAGTTGGTAAAATAGCAGGTTGTGGAAGTGGAGATTGTAAGTGGAAAT
ACCATTCATAATATTTCTCAGGAAGTTGATGATAAAGGGAAATGGGCTACACTTCCACA
AGAGTGGAGTATCAGATCAAACATGGTGTATACATTAAATGGTGTATATCAGCATCTAT
ACTCATCTGACGCAGATAGCGGTGAAATAGTTGATACTATGACAATGAAGTATTTGCTA
GAGTACTTTAGTAAGTGGGAGTATGCTCCAATGGTGTATACATATGATGTAACACCTCT
TTTGAATGAAGACGAAGATATTTCAACGTTTAAACGTGGTAATCGTGTTGCAAGAGCAA
GGTTTACCACACTTCAGAATCTAGCGAATTTACACCAATCAGTAATTTTAAATTAGCT

[illegible]

CTAAATGAATAGAAAAGTAGTCAAGTTAGGTAATTATTTTAAATTACCGAATCCCGGTT
GAAGACCTATCTATTGAAACTAAGAGAGGTAACGATGAAGAGTATCGTACTCCATTTT
TCAAAGATAAATCTTTGTCCGATGTATTACAAGGCTGGTTAGTGCACCTAGCCCCCTCTC
AAGAGTGAGTGGCCTGGTTTACACCAGTTTGAATTAGACCTAGCGGAAAAGGTCGGGC
CTTTAAGCATCCAGAAACCTTTAGATGAGCGGTTTAAGGATATTGAGGCTTATTACAAA
GGTATTCTCCTACCTTCCAAACCAATCAGTGAAACAGCAATCCGATCTGTTTTAACTGA
ATGGAATAGGGCACGTGGCTTGTCGGTACGCAGTGTCTCCAAAACGTGGGATAACATG
AAGAAATCTACATCTTCAGGTTCTCCATTCTTTACTAAACGTAAAGCAGTCGGAAAATA
TACGATGTATATGGAGCCATGTTTTTGACAAAAGAACGCAAGAAGTTCATTTTAAAGAACT

CAAACCGTTGGGATCCAATTGCGGTCTTAGGTTGGCGTGGACAAGAAGGTGGACCTGA
TTTTGAGGATGTAAAGCAAAGGGTTGTATGGATGTTCCCTGCTTCGGTAAACCTACAAG
AGTTACGTGTTTACCAACCTCTAATCGAAACAGCGCAACGTTTCAACTTAGTTCCTGCTT
GGGTTGGCATGGATAGTGTTGATTTGCACATCACACGTATGTTTGATACGAAAGGCGAA
GACGATGTCGTAATATGTACAGATTTCTCAAAATTTGACCAACATTTTAATGCTGATAT
GGCTCGCGGTGCATCCGAAATATTGGATGGCCTCTTTAACGGGAGCAGAGATTTTGTAC
AATGGATGTGGGATATATATCACATCAAATACACGATACCTCTATTAGACTCAGAAGAT
CATGCCTGGTTTGGCAGACATGGTATGGGCTCTGGTTCAGGTGGAACCAATGCCGATGA
AACATTAGCTCATAGAGCTTTGCAGTACGAAGCTGCTTTATCACAGAACCAAACATTAA
ACCCTTATTCACAATGTCTAGGTGATGATGGAGTACTAACATATCCTGGAATTAAAGTG
GATGATGTAATGCGATCATATACTGCACATGGTCAAGAGATGAATGAGTCAAAACAGT
ATGTGAGCAAACATGAATGCATATATCTTCGTAGATGGCATCATATTAATTATCGTGTC
GATGATGTATGTGTCGGAGTTTACGCAACAACCTCGTGCTTTGGGTAGATTGTGTGAACA
AGAGAGATATTTTGACCCAGAGATATGGTCAAAAGAAATGGTAGCTTTACGTCAGCTA
TCGATACTTGAGAATGTGAAATACCACCCTCTCAAGGAAGAATTTGTAAATATTGCAT
GAAAGGGGATAAGTACAGACTGGGACTGGACTTACCAGGCTTCTTGGAGAACATAGAT
GGACTCGCAAAGCAAGCTACTGATCTAATGCCGGACTTTTTAGGTTACGTAAATCACA
ACAGAAATCTGTTCGGTGGTATATCAGAATGGTGGATAGTAAAATATCTACGTAGTCTAA
AGTAAAGATTGGGATGGTGCAGTAAACCATTAGAATTCTAACGAATTCTAACTGCACC
ATCCCAATCTTTACTTTAGACTACGTAGATATTTTACTATCCACCCTCTGATATACCAC
CGACAGATTTCTGTTGTGATTAAACGTAACCTAAAAAGTCCGGCATCAGATCAGTAGCT
TGCTTTGCGAGTCCATCTATGTTCTCCAAGAAGCCTGGTAAGTCCAGTCCCAGTCTGTA
CTTATCCCCTTTTCATGCAATATTTAACAAATTCTTCCTTGAGAGGGTGGTATTTTACA
(SEQ ID N°: 65)

>1-PBV-4466_RDRP

CTAGAAAAGGAGGCTACTAATGAATAGAAAAGTAGTCAAGTTAGGTAATTACTTTAAA
TTACCAAATCCCGGTTGAAGACCTATCTATTGAAAACAGAGAGAGGTAACGATGAAGA
GTATCGTACTCCATTTTTCAAAGGTAAATCTTTGTCCGAAATATTAGAAGGCTGGAAAG
TGCACCTAGCCCCTCTCGAAGTTGAGTGGCCTGGTTTACACCAGTTTGAATTAGACCTA
GCGGAAAAGGTGGGCCATTAAAGTATCCAAAAGCCATTAAAAGATAGACTTAAGGATA
TTGAGGCCTATTACAAAGGTATTCTCCTACCTTCCAAACCCATTGACTCAGACGCAATC

CAAGCGGTTCTTGATGAATGGGAAAAGGCACGCGGTTTGTCACTTCGATCTACTCCCAA
AACGTGGGAAAAGATGAAGAAATCAACTTCATCTGGTAGTCCATTATTTACAAAGAGA
CGCAGTGTAGGTCAATTTACAATGGACTCACAACCGTGTTTTGACTTAGTTACGCGAGA
AGTACATGACGCAAAATATCGTCAGTGGGATCCAATCGCTATACTAGGTTGGCGAGGA
CAAGAAGGCGGTCCTGACTTTGAGGATGTAAAACAGAGGGTTGTATGGATGTTCCCTG
CTGCAGTGAACCTTGCAAGAATTGCGAGTGTATCAACCTCTAGTCGAAGTAGCTCAACGG
TTCAACTTAGTTCCTGCTTGGGTAGCATGGATAGTGTTGATTGGCACATCACACGAAT
GTTTGATACCAAAGGAGCAAATGATGTCGTGATTTGTACTGATTTCTCCAAATTTGACC
AACATTTTAATGTAGATATGGCGCGCGGGCGCATCCGAAATATTGGATGGCCTCTTTAAC
GGGCGCGGAGATTTTATTCAGTGGATGTGGGCAATATTCCACATTAAATACACGATACC
TCTATTAGACTCTGAAAATCATGCCTGGTTTGGCAGACATGGTATGGGTTCCGGATCTG
GTGGAACCTAACGCTGATGAAACATTAGCACATAGAGCGTTACAACATGAAGTAGCGCT
ATCCCATAACCAAACACTTAACCCTTATTCACAATGTCTAGGTGATGATGGAGTACTTA
CTTACCCTGGAATTAAAGTGAATGATGTAATGCGATCATATACTGCACATGGTCAAGAA
ATGAATGAGTCTAAACAGTATGTGAGCAAACATGAGTGCATATATCTTCGTAGATGGC
ATCATGAAAATTATCGTGTCGACGATATATGTGTTGGAGTTTACGCAACCACTAGAGCT
TTGGGTAGATTGTGTGAACAAGAAAGATACTTTGACCCAGGAGTTTGGTCAAAGGAAA
TGGTAGCTTTACGTCAGCTATCGATCCTTGAGAATGTGAAATACCACCCGCTCAAGGAA
GAATTTGTAAAGTATTGCATGAAAGGAGACAAGTATAGACTGGGACTAGACTTGCCAG
GCTTCCTCGAGAACATAGATGGAATCGTTAAGGAAGCTACTGATCTTATGCCGGACTTC
TTAGGTTACGTAAATCACAACAGAAAAAGGTTGGTGGTGCATCAGAATGGTGGATTG
TAAAATATCTGCTTAGTCTAAAGTAACAGATCGGGATGGTGCAGTAAACCATTAGAATT
CTTAATGAATTCTAACTGCACCATCCCGATCTGTTACTTTAGACTAAGCAGATATTTTAC
AATCCACCATTCTGATGCACCACCAACCTTTTTCTGTTGTGATTAAACGTAACCTAAGAA
GTCCGGCATAAGATCAGTAGCTTCCTTAACGATTCCATCTATGTTCTCGAGGAAGCCTG
GCAAGTCTAGTCCCAGTCTATACTTGTCN (SEQ ID N°: 46)

>3-PBV-4138 RDRP

GCAGAAGACGGCATACGAGATGAGCAATCGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGA
CTTAATGAATAGAAAAGTAGTCAGTTTAGGTAATTACTTTAAATTACCAAATCCCGGTT
GAAGACCTATCTATTGAAAATAAGAGAGGTAACGATGAAGAGTATCGTACTCCATTTT
TCAAAGGTAAATCTTTATCCGATGTGTTAAAAGGCTGGGAAGTGCACCTTGCCCCCTCTC

GAATAGAAAAGTAGTCAGTTTAGGTAATTACTTTAAATTACCAAATCCCGGTTGAAGAC
CTATCTATTGAAAATAAGAGAGGTAACGATGAAGAGTATCGTACTCCATTTTTCAAAG
GTAAATCTTTGTCCGAAGTATTAAGGCTGGGAAGTGCACCTTGCCCCTCTCAAAGAG
AAGTGGCCTGGTTTACACCAGTTTGAATTAGACCTAGCGGAAAAGGTCGGGCCGATGA
GTATCCAGAAACCTCTTGATGAGCGTTTCAAGGATATTGAAGCCTATTACAAAGGTATT
CTCCTACCTTCCACTCCAATTAGTGATGCAGCAATCCAATCTGTACTCACTGAATGGAA
CAGGGCTCGCGGATTGTCAGTTCGCAGTACTTCCAAAACATGGGATAAGATGAAGAAG
TCTACTTCTTCAGGCTCTCCATTCTTTACCAAACGTAAACTAATTGGTAAGTATATTATG
GATAGCGAACCATATTTTGACAAAAGAACGCAAGAGGTACATGATAGAAAGTACCGAC
AATGGGATCCAATTGCTGTTCTTGGTTGGCGAGGACAAGAAGGAGGTCCAGAACCAGA
GGATGTAAAGCAAAGGGTTGTATGGATGTTCCCTGCTTCGGTGAACCTGCAAGAATTGC
GGGTATACCAACCTCTGATCGAAACAGCGCAACGTTTCAACTTAGTTCCTGCTTGGGTT
AGCATGGATAGTGTGGATCAGCACATCACACGTATGTTTGATACTAAAGGCGCAGATG
ATGTCGTGATTTGTACAGATTTCTCAAATTTGACCAACATTTCAACTCTGATATGGCTC
GTGGTGCTTCAGAGATATTAGATGGCTTGTTAACGGAAGTCGAGATTTTGTGCAATGG
ATGTGGGATACATAACCACATAAAGTACACGATACCTCTATTAGACTCGGAAAACCATG
CGTGGTTTGGACGTCATGGTATGGGTCCGGTTCAGGCGGAACTAATGCTGATGAGACA
TTAGCTCATCGCGCGCTGCAATATGAAGCAGCGCTTTCTCAACACCAAACACTTAACCC
TTATTACAATGCCTAGGTGATGATGGAGTACTTACGTACCCAGGTATTAAAGTGGATG
ATGTAATGCGATCATATACTGCTCATGGTCAAGAGATGAATGAGTCAAAGCAGTACGT
GAGCACACATGAATGCATATATCTGAGAAGATGGCATCATAAAGATTATCGTGTGTCA
GATGTATGTGTTGGAGTTTATGCAACTACTCGTGCTTTAGGCAGGTTGTGTGAACAAGA
ACGCTACTTTGATCCAGAAGTATGGTCAAAGGAAATGGTAGCTTTACGTCAGCTATCGA
TCCTTGAGAATGTTAAATTCCACCCACTCAAGGAAGAATTCGTGAATTATTGCATGAAA
GGCGACAAGTATAGACTGGGACTAGACTTGCCAGGCTTCTTGAGAAACATTGATGGAC
TCGCAAAGCAAGCTACTGATCTTATGCCGGACTTTTTGGGATACGTTAAGTCCCAACAG
NN
NN
NN
TCCGAATCTTTACTTTAGACTTTTAAGATATTTAACGATCCACCAATTGCTCATTCCTG
ATCTTTCTGCTGGGACTTAACGTATCCCAAAAAGTCCGGCATAAGATCAGTAGCTTGCT
TTGCGAGTCCATCAATGTTCTCCAAGAAGC
NN
NN

N (SEQ ID Nº: 48)

>11-PBV-19-006_RDRP

CGGCAACCACCAAGATCTACACGTTGACCTTCGTCGGCAGCGTCAGATGTTAAATGAAT
AGAAAAGTAGTCAGTTTAGGTAATTACTTTAAATTACCAAATCCCGGTTGAAGACCTAT
CTATTGAAAATAAGAGAGGTAACGATGAAGAGTATCGTACTCCATTTTTCAAAGATA
AATCTTTGTCCGAAGTGTTAAAAGGCTGGGAAGTGCACCTTGCCCCTCTCAAAGAGAAG
TGGCCTGGTCTACACCAGTTTGAATTAGACCTAGCGGAAAAGGTCGGGCCGATGAGTA
TCCAGAAACCTCTTGATGAGCGTTTTAAGGATATTGAAGCCTATTACAAAGGTATTCTC
CTACCTTCCACTCCAATAAGTGATGAAGCAGTCCGATCTGTAATCACTGAATGGAATAG
GGCTCGCGGATTGTCAGTTCGCAGTACTTCCAAAACATGGGATAAGATGAAGAAATCA
ACTTCATCGGGCTCTCCATTCTTTACCAAACGTAAATTGATTGGTAAATATATTATGGAT
AGTCAACCATATTTTGACAAGAGAACGCAACAGGTACATGATAGAAAGTACCCTCAAT
GGGATCCGATTGCTGTTCTTGGTTGGCGAGGACAAGAAGGAGGTCCAGAACCAGAGGA
TGTGAAGCAAAGGGTTGTATGGATGTTCCCTGCTTCAGTGAATCTACAAGAATTGCGGG
TTTACCAAACCTCTGATCGAAACAGCGCAACGTTTCAACTTAGTTCCTGCTTGGGTAGT
ATGGATAGTGTGGATGAGCACATCACACGTATGTTTGACACAAAAGGCGCAGATGATG
TCGTTGTATGTACTGATTTCTCCAAATTTGACCAACATTTCAACTCTGATATGGCTCGCG
GTGCGTCAGAGATATTAGATGGCTTGTTTAACGGAAGTCGAGACTTCGTACAATGGATG
TGGGATACATACCACATAAAATACACGATACCTCTATTAGACTCAGAAAACCATGCGT
GGTTTGGACGACATGGAATGGGTTCCGGTTCAGGCGGAACAAATGCTGATGAAACATT
AGCACATCGCGCGTTGCAGTATGAAGCAGCGCTTTCTCAAACCAAACACTAAACCCTT
ATTCACAATGCCTAGGTGATGATGGAGTACTTACATACCCAGGTATTAAAGTGGATGAT
GTAATGCGATCATATACTGCTCATGGTCAAGAAATGAATGAGTCGAAGCAGTACGTGA
GCAAACATGAATGCATATACTTGAGAAGGTGGCATCACAAAGATTATCGTGTGTCAGG
TATATGTGTCGGAGTTTATGCAACTACTCGTGCTTTAGGACGGTTGTGTGAACAAGAAA
GATACTTTGACCCAGAAGTATGGTCAAAGGAAATGGTAGCCTTACGTCAGCTATCGATC
CTTGAGAATATAAAATACCACCCACTCAAGGAAGAATTCGTGAATTATTGCATGAAAG
GGGACAAGTATAGACTGGGACTAGACTTGCCAGGCTTCTTAGAGAACATAGATGGACT
CGCAAAGCAAGCTACTGATCTTATGCCGGACTTCTTGGGATACGTAAAGTCCCAACAGA
AAGATACAGGAATGAGCGATTGGTGGATCGTTAAGTATCTTAAAAGTCTAAAGTAAAG
ATTTGGATGGTGCAGCAAACCATTAGAATTCATATTGAATTCTAACTGCACCATCCAAA

TCTTTACTTTAGACTTTTAAAGATACTTAACGATCCACCAATCGCTCATTCCTGTATCTTT
CTGTTGGGACTTAACGTATCCCAAGAAGTCCGGCATAAGATCAGTAGCTTGCTTTGCGA
GTCCATCTATGTTCTCTAAGAAGCCTGGCAAGTCTAGTCCCAGTCTATACTTGTCCCCTT
TCATGCAATAATTCACGAATTCTTCCTTGAGTGGGTGGTATTTTCATA (SEQ ID N°: 49)

>14-PBV-19-015_RDRP

CTAAATGAATAGAAAAGTAGTCAAGTTAGGTAATTACTTTAAATTACCAAATCCCGGTT
GAAGACCTATCTATTGAAAACCTCAGAGAGGTAACGATGAAGAGTATCGTACTCCATTTT
TCAAAGATAAATCTTTGTCCGAAGTATTAAATGGCTGGTTAGTGCAACTAGCGCCTCTC
AAAGAGAAGTGGCCTGGTTTACACCAGTTTGAATTAGACCTAGCGGAAAAGGTCGGGC
CTCTAAGCATCCAGAAACCTTTGGAAGAAAGGTTTAAGGATATAGAAGCTTATTACAA
AGGTATTCTCCTACCTTCCAAACCAATTAGTGAGGCGGCAATCCGATCCGTCTTAACTG
AATGGAATAGGGCACGTGGCTTGTCTAGTACGCAGTGTCTCCAAGACATGGGATAACAT
GAAGAAATCGACTTCTTCTGGATCTCCATTCTTTACTAAACGTAAAGCAGTGGGAAAAT
ATACTATGTATATGGAACCATGTTTTGACAAAAGAACGCAAGAAGTTCATTTTAAGAAC
TCAAACCGTTGGGATCCAATTGCGGTCTTAGGTTGGCGTGGACAAGAAGGTGGACCTG
ATTTTGAGGATGTGAAGCAAAGGGTAGTATGGATGTTCCCTGCTTCGGTAAACCTACAA
GAGTTACGTGTTTACCAACCTCTAATCGAAACAGCGCAACGTTTCAACTTAGTTCCTGC
TTGGGTTGGCATGGATAGTGTTGATTTGCACATCACACGTATGTTTGATACGAAAGGCG
CAGATGATGTCGTAATCTGTACAGATTTCTCGAAATTTGACCAACATTTTAACGCTGAT
ATGGCGCGCGGTGCATCCGAGATATTGGATGGCCTCTTTAACGGGCGCAGAGATTTTGT
ACAATGGATGTGGGATATATATCACATCAAATACACGATACCTCTACTCGACTCAGAAG
ATCATGCCTGGTTTGGCAGACATGGGATGGGTTCCGGATCTGGTGGAACCAACGCTGAT
GAAACATTAGCACACAGAGCTTTGCAGTATGAAGCTGCTTTATCACAGAACCAAACATT
AAACCCTTATTCACAATGTCTAGGTGATGATGGAGTACTAACTTACCCTGGTATTAAGG
TGGAGGATGTAATACGAACATATACTGCACATGGTCAAGAGATGAATCCCGATAAGCA
GTATGTGAGTAAACAGGAATGCATATATCTGAGAAGATGGCATCACATTGATTATCGTG
TTAATGATATATGTGTCGGAGTTTACGCAACTACTCGAGCTTTAGGTCGTTTGTGTGAA
CAAGAAAGGTATTTTGATCCAGAGATATGGTCAAAAGAAATGGTAGCTCTTCGTCAGCT
ATCAATACTTGAGAATGTGAAATACCACCCTCTCAAGGAAGAATTTGTAAAGTATTGCA
TGAAAGGGGATAAGTACAGACTGGGACTGGACTTACCAGGCTTTCTCGAGAACATAGA
TGGACTCGCAAAGAAAGCTACCGATCTAATGCCGGACTTTTTAGGTTACGTAAATCAC

AACAGAAATCTGTCGGTGGTATATCAGATTGGTGGATAGTAAAATATCTACGTAGTCTA
 AAGTAATGATTGGGATGGTGCAGTAAACCATTAGAATTCTAACGAATTCTAACTGCACC
 ATCCCAATCATTACTTTAGACTACGTAGATATTTTACTATCCACCAATCTGATATACCAC
 CGACAGATTTCTGCTGTGATTTAACGTAACCTAAAAAGTCCGGCATAAGATCGGTAGCT
 TTCTTTGCGAGTCCATCTATGTTCTCGAGAAAGCCTGGTAAGTCCAGTCCCAGTCTGTAC
 TTATCCCCTTTCATGCAATACTTAACAAATTCTTCCTTGAGAGGGTGGTATTTAC (SEQ
 ID N°: 50)

>15-PBV-19-016_RDRP_

AAAGGAGACGACTTAATGAATAGAAAAGTAGTCAGTTTAGGTAATTACTTTAAATTAC
 CAAATCCCGGTTGAAGACCTATCTATTGAAAATAAGAGAGGTAACGATGAAGAGTAT
 CGTACTCCATTTTTCAAAGGTAAATCTTTATCCGATGTATTAAGGCTGGGAAGTGCA
 CCTTGCCCTCTCAAAGAGAAAGTGGCCTGGTTTACACCAGTTTGAATTAGACCTAGCGG
 AAAAGGTCGGGCCGATGAGTATTCAGAAACCTCTTGATGAGCGTTTCAAGGATATTGA
 AGCCTATTACAAAGGTATTCTCCTACCTTCCACTCCAATAAGTGATGCAGCAATCCGAT
 CTGTAATCACTGAATGGAATAGGGCTCGCGGATTGTCAGTTCGCAGTACTTCCAAAACA
 TGGGATAAGATGAAGAAATCAACTTCATCAGGCTCTCCATTCTTTACCAAACGTAAATT
 GATTGGTAAGTACATTATGGATAGTCAACCATATTTTGACAAAAGAACGCAAGAGGTA
 CATGATAAACAGTACCCACAATGGGATCCAATTGCGGTTCTTGGTTGGCGAGGACAAG
 AAGGTGGTCCAGAACCAGAGGATGTGAAGCAAAGGGTTGTATGGATGTTCCCTGCTTC
 AGTTAACCTGCAAGAATTGCGGGTATACCAACCTCTGATCGAAACAGCGCAACGTTTCA
 ACTTAGTTCTGCTTGGGTTAGCATGGATAGTGTGGATGAGCACATCACACGTATGTTT
 GATACTAAAGGCGCAGATGATGTCGTGATTTGTACTGATTTCTCTAAATTTGACCAACA
 TTTCAATTCTGATATGGCTCGAGGCGCATCAGAGATATTAGATGGCCTATTTAACGGGA
 GTCGAGATTTCTGACAAATGGATGTGGGATACATACCACATAAAGTACACGATACCTCTA
 CTAGACTCAGAAAACCATGCGTGGTTTGGACGTCATGGAATGGGTTCGGGCTCAGGTG
 GAACCAATGCTGATGAAACATTAGCACATCGCGCGTTGCAATATGAAGCAGCGCTTTCT
 CAAAACCAAACACTTAACCCTTATTCACAATGCCTAGGTGATGATGGAGTACTTACGTA
 CCCAGGTATTAAAGTGGATGATGTAATGCGGTCATATACTGCTCATGGTCAAGAGATGA
 ATGAGTCAAAGCAGTACGTGAGCAAACATGAATGCATATATCTGAGAAGATGGCATCA
 CAAAGATTATCGTGTGTCAGATGTATGTGTCGGAGTTTATGCAACAACCCGTGCTTTGG
 GTCGGTTGTGTGAACAAGAACGATACTTTGATCCAGAAGTATGGTCAAAGGAAATGGT

AGCTCTGCGTCAGCTATCGATCCTTGAGAATATCAAATACCACCCACTCAAGGAAGAAT
TCGTGAATTATTGCATGAAAGGAGACAAGTATAGACTGGGACTAGACTTGCCAGGCTT
CTTGGAGAATATTGATGGACTCGCAAAGCAAGCTACTGATCTTATGCCGGACTTCTTGG
GATACGTTAAGTCCCAACAAAAGGATACAGGAATGAGCGATTGGTGGATCGTCAAGTA
TCTTAAAAGTCTAAAGTAAAGATTTGGATGGTGCAGNNNNNNNNNNNTCGTCGGCAG
CGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTAACTGCACCATCCAAATCTTTACTTTAGACTTTT
AAGATACTTGACGATCCACCAATCGCTCATTCCTGTATCCTTTTGTGTTGGGACTTAACGTA
TCCCAAGAAGTCCGGCATAAGATCAGTAGCTTGCTTTGCGAGTCCATCAATATTCTCCA
AGAAGCCTGGCAAGTCTAGTCCCAGTCTATACTTGTCTCCTTTTCATGCAATAATTCACG
AATTCTTCCTTGAGTGGGTGGTATTTGATC (SEQ ID N°: 51)

>23-PBV-19-035_RDRP

TAGGTAATTACTTTAAATTACCAAATCCCGGTTGAAGACCTATCTATTGAAAACCTAAGA
GAGGTAACGATGAAGAGTATCGTACTCCATTTTTCAAAGGTAAATCTTTGTCCGATGTA
TTAAAAGGCTGGGAAGTGCACCTCGCCCCTCTCAAAGAGAAGTGGCCTGGTTTACACC
AGTTTGAATTAGACCTAGCGGCAAAGGTCGGGCCTATGAGTATTCAGAAACCGCTTGAT
GAGCGATTTAAGGATATTGAGGCTTATTACAAAGGTATTCTCCTACCTTCCGAACCAAT
TAGTGATGAAGCAATCCGATCTGTCATCACTGAATGGAACAGGGCTCGCGGATTGTCA
GTTTCGCAGTACTTCCAAAACATGGGATAACATGAAGAAGTCAACTTCTTCAGGCTCTCC
ATTCTTTACCAAACGTAAATTGATTGGTAAGTATATAATGGATAGTCAACCATATTTTG
ACAAAAGAACACAAAAGGTACACGATAGAAAGTACCCACAATGGGATCCAATTGCTGT
TCTTGGTTGGCGTGGACAAGAAGGAGGTCCAGAACCAGAGGATGTGAAGCAAAGGGTT
GTATGGATGTTCCCTGCTTCAGTTAACCTGCAAGAGTTGCGGGTGTACCAACCTCTGAT
CGAAACAGCGCAACGTTTCAACTTAGTTCCTGCTTGGGTAGCATGGATAGTGTGGACG
AGCACATCACACGTATGTTTGATACAAAAGGCGCAGATGATGTCGTGATTTGTACTGAT
TTCTCTAAATTTGACCAACACTTTAATTCTGATATGGCTCGCGGTGCATCTGAGATATTA
GATGGACTATTTAACGGCAGCCGAGATTTTCGTACAATGGATGTGGGATACATACCACAT
TAAATACACGATACCTCTATTAGACTCTGAGAACCATGCGTGGTTTGGACGTCATGGTA
TGGGTTCGGTTCAGGCGGAACCTAATGCTGATGAGACATTAGCTCATCGTGCGCTTCAG
TATGAAGCAGCACTCTCACAAAAACAACTAAACCCTTATTCACAATGCTTGGGAG
ATGATGGAGTACTAACGTACCCAGGTATTAAAGTGGATGATGTAATGCGATCATATACT
GCACATGGTCAAGAGATGAATGAGTCGAAGCAGTACGTGAGCAAACATGAATGCATAT

ATCTGAGAAGATGGCATCACAAGGATTATCGTGTGTCAGGTATATGTGTCGGAGTTTAT
GCAACTACTCGTGCTTTGGGTAGATTGTGTGAACAAGAAAGGTACTTTGACCCAGAAGT
ATGGTCAAAGGAAATGGTAGCTTTACGTCAGCTATCAATCCTTGAGAATATTAAATACC
ACCCACTCAAGGAAGAATTCGTGAATTATTGCATGAAAGGCGACAAGTATAGACTGGG
ACTAGACTTGCCAGGCTTCTTGGAGAACATTGATGGACTCGCAAAGCAAGCTACTGATC
TTATGCCAGACTTTTTTGGGATACGTTAAATCTCAACAGAAAGATACAGGAATGAGCGAT
TGGTGGATCGTGAAGTATCTTAAGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGTGTA
TAAGAGACAGTAACTGCACCATCCAAATCTTTACTTTAGACTCTTAAGATACTTCACGA
TCCACCAATCGCTCATTCTGTATCTTTCTGTTGAGATTTAACGTATCCCAAAAAGTCTG
GCATAAGATCAGTAGCTTGCTTTGCGAGTCCATCAATGTTCTCCAAGAAGCCTGGCAAG
TCTAGTCCCAGTCCATGCTNNNNN (SEQ ID N°: 52)

>25-PBV-19-038 RDRP

TACTTATGAATAGAAAAGTAGTCAGTTTAGGTAATTACTTTAAATTACCAAATCCCGGA
TTGAAGACCTATCTATTGAAAATAAGAGAGGTAACGATGAAGAGTATCGTACTCCATT
TTTCAAAGGTAAATTTTATCCGATGTTTTAAAAGGCTGGGAAGTGCACCTCGCCCCTCT
CAAAGAGAAGTGGCCTGGTTTACACCAGTTTGAATTAGACCTAGCGGAAAAGGTCGGG
CCTATGAGTATTCAGAAACCTCTTGAAGAGCGTTTCACGGATATTGAGGCTTATTACAA
AGGTATTCTCCTACCTTCCGAACCAATTAGTGATGAAGCAATCCGATCTGTCATCACTG
AGTGGAACAGGGCTCGCGGATTGTCAGTTCGCAGTACTTCCAAAACATGGGACAATAT
GAAGAAGTCTACTTCTTCAGGCTCTCCATTCTTTACTAAACGTAAGTTAATTGGTAAAT
ATATAATGGATAGTCAACCATATTTTGACAAAAGAACGCAAGAGGTACATGATAAAAT
GTATCCACATTGGGATCCAATTGCCGTTCTTGGTTGGCGTGGACAAGAAGGAGGTCCAG
AACCAGAGGATGTGAAGCAAAGGGTTGTATGGATGTTCCCTGCTTCAGTTAACTTGCAA
GAATTACGAGTATACCAACCTCTGATCGAAACAGCGCAACGTTTCAACTTAGTTCCTGC
TTGGGTTAGCATGGATAGTGTGGACGAGCACATCACACGTATGTTTGATACTAAAGGCG
CAGATGATGTCGTGATTTGTACTGATTTCTCTAAATTTGACCAACACTTTAATGCTGATA
TGGCTCGCGGCGCATCCGAAATATTGGATGGCATATTTAACGGGGGGCCGAGACTTCATA
CAATGGATGTGGGACATATATCACATCAAATACACGATACCTCTATTAGACTCTGAGAA
CCATGCGTGGTTTGGACGTCATGGTATGGGTTCCGGTTCAGGCGGAACATAATGCTGATG
AGACTTTAGCTCATCGTGCCTTGAATATGAGGCAGCGCTCTCACAAAACCAAACATA
AACCTTATTCACAATGCTTGGGTGATGATGGAGTACTAACATATCCAGGCATCAAAGT

GGATGATGTAATGCGATCATATACTGCTCATGGTCAAGAAATGAATGAGTCGAAGCAG
TACGTGAGCAAACATGAATGCATATATCTGAGAAGATGGCATCACAAAGATTATCGTG
TTGCAGATGTATGTGTCGGAGTTTATGCAACTACCAGAGCTTTGGGTAGGTTGTGTGAA
CAAGAAAGATATTTTGACCCAGAAGTATGGTCAAAAGAAATGGTAGCTTTACGTCAGC
TATCGATCCTTGAGAATGTCAAATACCACCCACTTAAGGAAGAATTCGTGAATTATTGC
ATGAAAGGCGACAAGTATAGACTGGGACTAGACTTGCCAGGCTTCTTGAGAACATTG
ATGGACTCGCAAAGCAAGCTACTGATCTGATGCCGGACTTTTTGGGATACGTTAAGTCC
CAACAGAAAGATACAGGAATGAGCGATTGGTGGATCGTCAAGTATCTTAAGAGTCTAA
AGTAAAGATTTGGATGGTGCAGTAAACCATTAGAATTCATTTGAATTCTAACTGCTGCA
CCATCCAAATCTTTACTTTAGACTCTTAAGATACTTGACGATCCACCAATCGCTCATTCC
TGTATCTTTCTGTTGAGACTTAACGTATCCCAAAAAGTCCGGCATCAGATCAGTAGCTT
CCTTTGCGAGTCCATCAATGTTCTCCAAGAAGCCTGGCAAGTCTAGTNNNNNNNNNNNN
NN
NNN (SEQ ID Nº: 53)

>27-PBV-19-044_RDRP

TCATAAGTAGCCTCCTTTTCTAGTAAACATTTTCGTTAGAATTTATTTACTAGAAAAGGA
GGCTACTTATGAATAGAAAAGTAGTCAGTTTAGGTAATTACTTTAAATTACCAAATCCC
GGATTGAAGACCTATCTATTGAAAACCTAAGAGAGGTAACGATGAAGAGTATCGTACTC
CATTTTTCAAAGGTAAATCTTTATCCGATGTTTTAAAAGGCTGGGAAGTGCACCTCGCC
CCTCTCAAAGAGAAGTGGCCTGGTTTACACCAGTTTGAATTAGACCTAGCGGAAAAGG
TCGGGCCTATGAGTATTCAGAAACCTCTTGAAGAGCGTTTCACGGATATTGAGGCTTAT
TACAAAGGTATTCTCCTACCTTCCGAACCAATTAGTGATGAAGCAATCCGATCTGTCAT
CACTGAGTGGAACAGGGCTCGCGGATTGTCAGTTCGCAGTACTTCCAAAACATGGGAC
AATATGAAGAAGTCTACTTCTTCAGGCTCTCCATTCTTTACTAAACGTAAGTTAATTGGT
AAATATATAATGGATAGTCAACCATATTTTGACAAAAGAACGCAAGAGGTACATGATA
AAATGTATCCACATTGGGATCCAATTGCCGTTCTTGGTTGGCGTGGACAAGAAGGAGGT
CCAGAACCAGAGGATGTGAAGCAAAGGGTTGTATGGATGTTCCCTGCTTCAGTTAACTT
GCAAGAATTACGAGTATACCAACCTCTGATCGAAACAGCGCAACGTTTCAACTTAGTTC
CTGCTTGGGTTAGCATGGATAGTGTGGACGAGCACATCACACGTATGTTTGATACTAAA
GGCGCAGATGATGTCGTGATTTGTACTGATTTCTCTAAATTTGACCAACACTTTAATGCT
GATATGGCTCGCGGCGCATCCGAAATATTGGATGGCATATTTAACGGGGGCCGAGACT

TCATACAATGGATGTGGGACATATATCACATCAAATACACGATACCTCTATTAGACTCT
GAGAACCATGCGTGGTTTGGACGTCATGGTATGGGTTCCGGTTCAGGCGGAACTAATGC
TGATGAGACTTTAGCTCATCGTGC GTTGCAATATGAGGCAGCGCTCTCACAAAACCAAA
CACTAAACCCTTATTCACAATGCTTGGGTGATGATGGAGTACTAACATATCCAGGCATC
AAAGTGGATGATGTAATGCGATCATATACTGCTCATGGTCAAGAAATGAATGAGTCGA
AGCAGTACGTGAGCAAACATGAATGCATATATCTGAGAAGATGGCATCACAAAGATTA
TCGTGTTGCAGATGTATGTGTCGGAGTTTATGCAACTACCAGAGCTTTGGGTAGGTTGT
GTGAACAAGAAAGATATTTTGACCCAGAAGTATGGTCAAAAGAAATGGTAGCTTTACG
TCAGCTATCGATCCTTGAGAATGTCAAATACCACCCACTTAAGGAAGAATTCTGTGAATT
ATTGCATGAAAGGCGACAAGTATAGACTGGGACTAGACTTGCCAGGCTTCTTGAGAA
CATTGATGGACTCGCAAAGCAAGCTACTGATCTGATGCCGGACTTTTTGGGATACGTTA
AGTCCCAACAGAAAGATACAGGAATGAGCGATTGGTGGATCGTCAAGTATCTTAAGAG
TCTAAAGTAAAGATTTGGATGGTGCAGCAAACCATTAGAATTCATTTGAATTCTAACTG
CACCATCCAAATCTTTACTTTAGACTCTTAAGATACTTGACGATCCACCAATCGCTCAT
CCTGTATCTTTCTGTTGGGACTTAACGTATCCCAAAAAGTCCGGCATCAGATCAGTAGC
TTGCTTTGCGAGTCCATCAATGTTCTCCAAGAAGCCTGGCAAGTCTAGTCCCAGTCTAT
ACTTGTCGCCTTTCATGCAATAATTCACGAATTCTTCCTTAAGTGGGTGGTATTTGACC
(SEQ ID Nº: 54)

>28-PBV-19-046_RDRP

TGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTTGCGAAGTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTAT
AAGAGACAGCTTATGAATAGAAAAGTAGTCAGTTTAGGTAATTACTTTAAATTACCAA
ATCCCGGTTGAAGACCTATCTATTGAAAACCTAAGAGAGGTAACGATGAAGAGTATCGT
ACTCCATTTTTCAAAGGTAAATCTTTATCCGATGTTTTAAAGGCTGGGAAGTGCACCT
CGCCCCCTCTCAAAGAGAAGTGGCCTGGTTTACACCAGTTTGAATTAGACCTAGCGGAAA
AGGTCGGGCCTATGAGTATTCAGAAACCTCTTGAAGAGCGTTTCACGGATATTGAGGCT
TATTACAAAGGTATTCTCCTACCTTCCGAACCAATTAGTGATGAAGCAATCCGATCTGT
CATCACTGAGTGGAACAGGGCTCGCGGATTGTCAGTTCGCAGTACTTCCAAAACATGG
GACAATATGAAGAAGTCTACTTCTTCAGGCTCTCCATTCTTTACTAAACGTAAGTTAATT
GGTAAATATATAATGGATAGTCAACCATATTTTGACAAAAGAACGCAAGAGGTACATG
ATAAAATGTATCCACATTGGGATCCAATTGCCGTTCTTGGTTGGCGTGGACAAGAAGGA
GGTCCAGAACCAGAGGATGTGAAGCAAAGGGTTGTATGGATGTTCCCTGCTTCAGTTA

ACTTGCAAGAATTACGAGTATACCAACCTCTGATCGAAACAGCGCAACGTTTCAACTTA
GTTCTGCTTGGGTTAGCATGGATAGTGTGGACGAGCACATCACACGTATGTTTGATAC
TAAAGGCGCAGATGATGTCGTGATTTGTACTGATTTCTCTAAATTTGACCAACACTTTA
ATGCTGATATGGCTCGCGGCGCATCCGAAATATTGGATGGCATATTTAACGGGGGCGG
AGACTTCATACAATGGATGTGGGACATATATCACATCAAATACACGATACCTCTATTAG
ACTCTGAGAACCATGCGTGGTTTGGACGTCATGGTATGGGTTCGGGTCAGGCGGAACT
AATGCTGATGAGACTTTAGCTCATCGTTCGTTGCAATATGAGGCAGCGCTCTCACAAAA
CCAAACACTAAACCCTTATTCACAATGCTTGGGTGATGATGGAGTACTAACATATCCAG
GCATCAAAGTGGATGATGTAATGCGATCATATACTGCTCATGGTCAAGAAATGAATGA
GTCGAAGCAGTACGTGAGCAAACATGAATGCATATATCTGAGAAGATGGCATCACAAA
GATTATCGTGTTGCAGATGTATGTGTCTGGAGTTTATGCAACTACCAGAGCTTTGGGTAG
GTTGTGTGAACAAGAAAGATATTTTGACCCAGAAGTATGGTCAAAGAAATGGTAGCT
TTACGTCAGCTATCGATCCTTGAGAATGTCAAATACCACCCACTTAAGGAAGAATTCGT
GAATTATTGCATGAAAGGCGACAAGTATAGACTGGGACTAGACTTGCCAGGCTTCTTG
GAGAACATTGATGGACTCGCAAAGCAAGCTACTGATCTGATGCCGGACTTTTTGGGATA
CGTTAAGTCCCAACAGAAAGATACAGGAATGAGCGATTGGTGGATCGTCAAGTATCTT
AAGAGTCTAAAGTAAAGATTTGGATGGTGCAGCAAACCATTAGAATTCATTTGAATTCT
AACTGCACCATCCAAATCTTTACTTTAGACTCTTAAGATACTTGACGATCCACCAATCG
CTCATTCCTGTATCTTTCTGTTGGGACTTAACGTATCCCAAAAAGTCCGGCATCAGATCA
GTAGCTTGCTTTGCGAGTCCATCAATGTTCTCCAAGAAGCCTGGCAAGTCTAGTCCCAG
TCTATACTTGTCGCCTTTCATGCAATAATTCACGAATTCTTCCTTAAGTGGGTGGTATTT
GACA (SEQ ID Nº: 55)

>12PBVKM-19-012_RDRP

ACTCGTTAACTAGTTGTAGAGCGCGTACTCCCGCGGTCCGACCAGACCGCTCGCGAC
TTACAGAAAGGAGGTCGATCGTATGCCTAAATACGATAACATCATGGCGGATTATTTTCG
ATCTGCCCAATCCAGCGTTGGGGTCATATTTTCGGTAGAACCCGACATGGCAATCCTGAT
GTATACAGGACCACATTCTTCAAGAATCGTGAGCCTCAGGATGTTTTGTCAGAATGGAT
GAAGTCAGTCCAGGTTCTTAAACAGGATTGGCCTACGCTGTAAACATTTGAGGAAGACC
TTGCTTCCAAAGTAGGTCCACTGTCAGTGCAGAAGCCTTTAGTGGATAGGCTCCCTGAT
ATTCAGGCTTACTATGACTGCATTAACCTGGAGTCAAAACCCCTTGAGAAAGAAGCAGT
TCAAGCTTTCTTGAAGGAGTTAAAAGGTTTAAACACCTTATCGATGCGCGGAATTCCCG

CTACGATAGAAAACATGAAGTTGTCCACTTCCAGCGGTTGTCCATATTTACACAAACGT
AAGAACGATGTTGCGCGTCACAGATACGGGGACGTAAAGTATGACGGAAATCGTATCA
CTGCAAACATAGGTGGCAAGGAATTTAAGATGGCCGCTATTCTTGGATGGAGAGGCCA
GGAAGGAGGACCAAATAATTCGGACGTTAAACAGAGAGTGGTATGGATGTTCCCTTTC
ACTGTTAACCTCCAAGAACTACGTGTCTACCAGCCGTTTATGGATATGTTACAAAAGCA
CAAGATTATACCAGCATGGGTGCGGCTGGATGAGGTAGACAATAAGATCACCAAATTG
TTTGACACCAAAGGTGAAGATGACGTAGTTATATGTACCGACTTTTCTAAGTTTGACCA
GCACTTTAATGAAGATTGCCAGAAAGTAGCCCATGATATCTTAGCTTGGTTGTTTATTG
GTGATAGCCGTATGGAAGGCTGGTTGCGTAATGTATTTCCCTGTCAAATACAATATTCCT
ATAATCTGTGATGACAATATTGTGAAGAATGGTCGTCATGGTATGGGTTCGGGTGCGG
AGGAACAAATCAAGATGAAACGCTACTACACAGAGTATTACAACATGAAGCGGCTCTT
AGTGTAGGACAGGACCTCAATCTTAATTCACAATGCTTAGGTGATGATGGTATACTAAC
TTACCCAGGTATTAAGGTAGAGGATGTAATACGAACATATACTGCACATGGTCAAGAA
ATGAATCCCGATAAGCAGTATGTGAGTAAACAGGACTGCGTATATCTTCGTAGATGGC
ACCATAAAGACTATCGCGAAAACGGCGTATGCGTAGGGGTATATAGTACTGCTCGCGC
TTTAGGGCGTATGATGTACCAAGAACGCTACTACGACCCTGATGAATGGGGTAAAGAG
ATGGTTGCGCTAAGACAACCTGTCTATATTAGAGAACTGCAAACACCACCCTCTCAAAGA
AAAGTTTGTGGACTATTGCATTAAAGGGGATAAATATAGGCTTGGTATAGATATCCCAG
GTTTTCTAGACAATCTGGAAACGTTGTCAGAGAAAGCTATCGAAGTAATGCCTGACTTT
ATGGGCTACACACAATCTCTTGGACATAAAGATGAAAGAGTATCCAAAGGTATTAATG
ATTGGTGGATCGTTAAATACTTAAAGTCA (SEQ ID N°: 56)

>14PBVKM-19-015_RDRP

ACTCGTTAACTAGTTGTAGAGCGCGTACTCCCGTGGTCCGACCAGACCACACGCGAC
TTACAGAAAGGAGGTCGATCGTATGCCTAAATACGATAACATCATGGCAGACTATTTTG
ATCTGCCCAATCCAGCGTTGGGGTCATATTTCCGGTAGAACCCGACATGGCAATCCTGAT
GTATACAGGACCACATTCTTCAAGAATCGTGAGCCTCAGGATGTTCTGTCAGAATGGAT
GAAGTCGATCCAGGTTCTTAAACAGGATTGGCCTACGCTGTAACTTTTGAGGAAGACC
TTGCTTCCAAAGTAGGACCACTGTCCGTTTCAAGAGCCTTTAGTGGATAGGCTCCCTGAC
GTTCAAGCCTACTATGACTGCATTAAACCTGGAGTCAAAACCCCTTGCGAAAGAAGCAGT
TCAAGCTTTCATCAAGGAGTTAAAAGGTTTAAATACCTTATCGATGCGTGGAATTCCCG
CTACGATAGAAAATATGAAGTTGTCCACTTCCAGTGGCTGTCCTTATTTACCAAGCGT

AAAAGCGATGTACGCCGTCATAGATACGGGGACGTAAAATCTGATGGTAATCGTATAA
CCGCTGAGATCGGTGGCAAGGAATTTAAGATGGCCGCTATTCTTGGATGGAGAGGCCA
GGAAGGAGGACCAAAGAATTCGGACGTTAAACAGAGAGTGGTATGGATGTTCCCTTTC
ACTGTTAACCTCCAAGAACTACGTGTCTACCAGCCGTTTATGGATATGCTCCAGAAGCA
TAAAATTGTACCAGCATGGGTTCGGACTGGATGAGGTAGACAATAAGATCACTAAATTG
TTTGACACCAAAGGTGAAGATGACGTAGTTATATGTACCGACTTTTCTAAGTTTGACCA
GCACTTTAATGAAGATTGCCAAAAGGTAGCCCATGATATCTTAGCTTGGTTGTTTATTG
GCGATAGCCGTATGGAAAGCTGGTTGCGTAATGTATTTCTGTCAAATACAATATTCCT
ATAATCTGTGACGACAATATTGTGAAGAATGGACGTCACGGTATGGGTTCGGTTCGGG
AGGAACAAATCAAGATGAAACGCTACTACACAGGGTATTACAACATGAAGCGGCCCTT
AGTGTAGGACAGGACCTAAACCTTAATTCACAATGCCTTGGTGATGATGGTATACTAAC
TTACCCTGGTATTAAGGTGGAGGATGTAATACGAACATATACTGCACATGGTCAAGAG
ATGAATCCCGATAAGCAGTATGTGAGTAAACAGGACTGCGTATATCTTCGTAGATGGC
ACCATAAAGACTATCGCGAAAACGGCGTATGCGTAGGGGTATATAGTACTGCCCCGCGC
TTTAGGGCGTATGATGTATCAAGAACGCTACTATGACCCCGATGAATGGGGTAAAGAG
ATGGTTGCGCTAAGACAACGTCTATATTAGAGAACTGCAAACACCACCCTCTCAAAGA
AAAGTTTGTGGACTATTGCATTAAAGGGGATAAATATAGGCTTGGTATAGATATCCCAG
GTTTTCTAGACAATCTGGAAACGTTGTCTGAGAAAGCTATCGAAGTAATGCCTGACTTT
ATGGGCTACACACAGTCACTTGGACATAAAGATGAAAAGGTATCCAAAGGTATTAATG
ATTGGTGGATCGTTAAGTACTTAAAGTCA (SEQ ID Nº: 57)

>18PBVKM-19-023_RDRP

ACTCGTTAACTAGTTGTAGAGCGCGTACTCCCGTGGTCAGACCAGACCACACGCGAC
TTACAGAAAGGAGGTCGATCGTATGCCTAAATACGATAACATCATGGCAGATTATTTTG
ATCTGCCCAATCCAGCGTTGGGGTCATATTTCTGGTAGAACCCGACATGGCAATCCTGAT
GTATACAGGACCACATTCTTTAAGGATCGTGAGCCTCAGGATGTTCTGTCAGAATGGAT
GAAGTCAGTCCAGGTTCTTAAACAGGATTGGCCTACGCTGTAACTTTTGAGGAAGACC
TTGCTTCCAAAGTAGGACCATTGTCCGTTTCTTGAAGCCTTTAGTGGATAGGCTCCCTGAC
GTACAGGCTTACTATGACTGCATTAAACCTGGAGTCAAAACCTCTTCAGAAAGAAGCAGT
TCAAGCTTTCTTGAAGGAGTTGAAAGGTTTAAACACCTTATCGATGCGTGGTATTCCCG
CAACGATAGAAAACATGAAGTTGTCCACTTCTAGTGGTTGTCCATTCTTCACCAGACGT
AAGAATGATGTTTCGTGTCATCGCTACGGGGACGTAAAGCTTTGATGGAACTACCATTCA

TGCTGAAATAGGTGGCAAGGATTACAAGATGGCAGCCATATTAGGTTGGAGGGGCCAA
 GAAGGAGGACCAAAGAATTTCGGATGTAAACAGAGGGTGGTATGGATGTTCCCATTC
 CTGTTAACCTCCAAGAACTACGTGTCTATCAGCCGTTTATGGATATGCTACAAAAACAC
 AAAGTAGTACCAGCTTGGGTCGGTCTGGATGAGGTAGACAATAAGATTACCAAATTGT
 TTGACACCAAAGGTAAAGATGACGTAGTTATTTGTACCGACTTTTCAAAGTTTGACCAG
 CACTTTAATGAAGATTGCCAAAAGGTAGCCCATGATGTCTTAGCTTGGTTATTTATTGG
 TGATAGCCGTATGGAAAGCTGGTTGCGTAATGTATTTCTGTCAAATACAATATTCCTA
 TAATCTGTGATGATAATATTGTGAAGAATGGTCGTCATGGTATGGGTTCCGGTTCGGGA
 GGAACAAATCAAGATGAAACGCTGCTACACAGGGTATTACAACATGAAGCGGCCCTTA
 GTGTAGGACAGGACCTCAACCTTAATTCACAATGCTTGGGTGATGATGGTATACTAACT
 TATCCAGGTATTAAAGTTGAGGATGTAATACGAACATATACTGCACATGGTCAAGAAA
 TGAATCCCGATAAGCAGTATGTGAGTAAACAGGACTGCGTATATCTTCGCAGATGGCA
 CCATAAAGACTATCGCGAAAACGGCGTATGCGTAGGGGTATATAGTACAGCTCGCGCT
 TTAGGGCGTATGATGTACCAAGAACGCTACTATGACCCTGATGAATGGGGTAAAGAGA
 TGGTTGCGCTAAGACAACTGTCTATATTAGAGAACTGCAAACACCACCCTCTTAAGGAA
 AAGTTTGTGGACTATTGCATGAAAGGGGATAAATACAGGCTAGGTGTAGATATCCCAG
 GTTTTCTGGATAATCTGGAAACGTTATCCGAGAAGGCTATCGAAGTCATGCCCCGATTTC
 ATGGGCTACACACAATCCTTGGGACACAAGGACGAAAAGATATCTAAAGGTATTAATG
 ACTGGTGGATCGTTAAATACNNNNNNNNN (SEQ ID Nº: 58)

>21PBVKM-19-033_RDRP

NN
 NNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNATCCAGCGTTGGGGTCATATTTCCGGTAGAACCCGACATGGC
 AATCCTGATGTATACAGGACCACATTCATTAAGAATCGTGAGCCTCAGCATGTTTTGTC
 AGAATGGATGAAGTCAGTACAGGTTCTTAAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
 NNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAGCCTATTATGACTGCATTAACCTGGAGTCAAAACCCC
 TAGAGAAAGAGGCAGTTCAAGCTTTCTTAAAGGAGTTGAAAGGTTTAAATACCTNNNN
 NNNNNNNNGGTATTCCCGCTACGATAGAAAACATGAAGTTGTCCACTTCCAGTGGCTGTC
 CTTATTTACCAAGCGTAAGAACGATGTACGCCGTCACAGATACGGGGACGTAAAGTTT
 GACGGTACACGTGTGACCGCTGATATAGGTGGCAAGGAATTTAAGATGGCCGCTATAC

TTGGATGGAGAGGCCAGGAAGGAGGACCAAAGAATTCGGACGTTAAACAGAGAGTGG
TATGGATGTTCCCTTTCACTGTTAACCTCCAAGAACTACGTGTCTACCAGCCGTTTATGG
ATATGCTACAGAAACATAAAGTAGTACCAGCATGGGTTCGGAAGTGGATGAGGTAGACAA
TAAGATCACCAAATTGTTTGACACCAAAGGTGAAGATGACGTAGTTATATGTACCGACT
TTTCTAAGTTTGACCAGCACTTTAATGAAGATTGCCAAAAGGTAGCCCATGATATCTTA
GCTTGGTTATTTATTGGTGATAGCCGTATGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGACAGACAATATTGTGAAGTCAGGTCGTCATG
GTATGGGTTCGGTTCGGGAGGAACAAATCAAGATGAAACGCTACTACACAGGGTATT
ACAACATGAGGCGGCCCTTAGTGTAGGACAGGACCTTAATCTTAATTCACAATGCCTAG
GTGACGATGGTATACTAACTTACCCTGGTATTAAGGTTGAGGATGTAATACGAACATAT
ACTGCACATGGTCAAGAAATGAATCCCGATAAGCAGTATGTGAGTAAACAGGACTGCG
TATATCTTCGTAGATGGCACCATAAAGACTATCGCGAAAACGGCGTATGCGTAGGGGT
ATATAGTACAGCCCGCGCTTTGGGGCGTATGATGTACCAAGAACGCTACTATGACCCTG
ATGAATGGGGTAAAGAGATGGTTGCGCTAAGACAACGTCTATATTGGAGAACTGCAA
ACACCATCCTCTCAAAGAGAAGTTTGTGGACTATTGCATTAAAGGGGATAAATATNNN
NN
NN
NN
(SEQ ID Nº: 59)

>22PBVKM-19-034_RDRP

NN
NN
NN
NN
NN
NNNGTCCGTTTCAGAAAC
CGTTAGTGGATCGGTTACCAGACGTTCAAGCCTACTATGACTGCATTAACCTGGAGTCA
AAACCCCTAGAGAAAGAGGCAGTTCAAGCTTTCTTAAAGGAGTTGAAAGGTTTAAATA
CCTTATCGATGCGCGGTATTCCCGCTACGATAGAAAACATGAAGTTGTCCACTTCCAGT
GGCTGTCCTTATTTACCAAGCGTAAGAACGATGTACGCCGTCACAGATACGGGGACGT
AANNN

NNNNNNNNNNNNNGTTGTAGAGCGCGTACTCCCGCGGCCCGACCAGGTCGCACGCGA
CTTACAGAAAGGAGGTCGATCGTATGCCTAAATACGATAACATCATGGCAGATTATTTTC
GATCTGCCCAATCCAGCGTTGGGGTCATATTTTCGGTAGAACCCGACATGGCAATCCTGA
TGTATACAGGACCACATTCTTTAAGAATCGTGAGCCTCAGGATGTTTTGTCAGAATGGA
TGAAGTCAGTCCAGGTTCTTAAACAGGATTGGCCTACGCTGTAACTTTTGAGGAAGAC
CTTGCTTCCAAAGTAGGACCTCTGTCCGTTCAGAAACCGTTAGTGGATCGGTTACCAGA
CGTTCAAGCCTACTATGACTGCATTAACCTGGAGTCAAAACCCCTAGAGAAAGAGGCA
GTTCAAGCTTTCTTAAAGGAGTTGAAAGGTTTAAATACCTTATCGATGCGCGGTATTCC
CGCTACGATAGAAAACATGAAGTTGTCCACTTCCAGTGGCTGTCCTTATTTACCAAGC
GTAAGAACGATGTACGCCGTCACAGATACGGGGACGTAAAGTTTGACGGTACACGTGT
GACCGCTGATATAGGTGGCAAGGAATTTAAGATGGCCGCTATACTTGGATGGAGAGGC

CAGGAAGGAGGACCAAAGAATTCGGACGTTAAACAGAGAGTGGTATGGATGTTCCCTT
TCACTGTTAACCTCCAAGAACTACGTGTCTACCAGCCGTTTATGGATATGCTACAGAAA
CATAAAGTAGTACCAGCATGGGTCGGACTGGATGAGGTAGACAATAAGATCACCAAAT
TGTTTGACACCAAAGGTGAAGATGACGTAGTTATATGTACCGACTTTTCTAAGTTTGAC
CAGCACTTTAATGAAGATTGCCAAAAGGTAGCCCATGATATCTTAGCTTGGTTATTTAT
TGGTGATAGCCGTATGGAAAGCTGGTTGCGTAATGTATTTCTGTCAAATACAATATTC
CTATAATCTGTGACGACAATATTGTGAAGTCAGGTCGTCATGGTATGGGTTCCGGTTCG
GGAGGAACAAATCAAGATGAAACGCTACTACACAGGGTATTACAACATGAGGCGGCCC
TTAGTGTAGGACAGGACCTTAATCTTAATTCACAATGCCTAGGTGACGATGGTATACTA
ACTTACCCTGGTATTAAGGTTGAGGATGTAATACGAACATATACTGCACATGGTCAAGA
AATGAATCCCGATAAGCAGTATGTGAGTAAACAGGACTGCGTATATCTTCGTAGATGG
CACCATAAAGACTATCGCGAAAACGGCGTATGCGTAGGGGTATATAGTACAGCCCGCG
CTTTGGGGCGTATGATGTACCAAGAACGCTACTATGACCCTGATGAATGGGGTAAAGA
GATGGTTGCGCTAAGACAACGTCTATATTGGAGAACTGCAAACACCATCCTCTCAAAG
AGAAGTTTGTGGACTATTGCATTAAAGGGGATAAATATAGGCTTGGTATAGATATCCCA
GGTTTTCTAGATAATCTGGAAACGTTATCTGAGAAAGCTATCGAAGTAATGCCAGACTT
TATGGGCTACACACAATCACTTGGACACCATGAAGATAAGGTGTCAAAGGTATTAAT
GATTGGTGGATCGTTAAATACCTGAAGTCN (SEQ ID N°: 61)

>27PBVKM-19-044_RDRP

NN
NN
NN
NN
NN
NN
NN
NNNGT
TTAAATACCTTATCGATGCGCGGTATTCCCGCTACGATAGAAAACATGAAGTTGTCCAC
TTCCAGTGGCTGTCCTTATTTACCAAGCGTAAGAACGATGTACGCCGTCACAGATACG
GGGACGTAAAGTTTGACGGTACACGTGTGACCGCTGATATAGGTGGCAAGGAATTTAA
GATGGCCGCTATACTTGGATGGAGAGGCCAGGAAGGAGGACCAAAGAATTCGGACGTT

AAACAGAGAGTGGTATGGATGTTCCCTTTCACCTGTTAACCTCCAAGAACTACGTGTCTA
CCAGCCGTTTATGGATATGCTACAGAAACATAAAGTAGTACCAGCATGGGTCGGACTG
GATGAGGTAGACAATAAGATAACCAAATTGTTTGACACCAAAGGTGAAGATGACGTAG
TTATATGTACCGACTTTTCTAAGTTTGACCAGCACTTTAATGAAGATTGCCAAAAAGTA
GCCCATGATATCTTAGCTTGGTTATTTATTGGTGATAGCCGTATCGAAAGCTGGTTGCGT
AATGTATTTCCCTGTCAAATACAATATTCCTATAATCTGTGACGACAATATTGTGAAGTC
AGGTCGTCATGGTATGGGTTCCGGTTCGGGAGGAACAAATCAAGATGAAACGCTACTA
CACAGGGTATTACAACATGAGGCGGCCCTTAGTGTAGGACAGGACCTTAATCTTANTTC
ACAATGCTTGGGTGATGATGGAGTACTAACATATCCAGGCATCAAAGTGGATGATGTA
ATGCGATCATATACTGCTCATGGTCAAGAAATGAATGAGTCGAAGCAGTACGTGAGCA
AACATGAATGCATATATCTGAGAAGATGGCATCACAAAGATTATCGCGAAAACGGCGT
ATGCGTAGGGGTATATAGTACAGCCCGCGCTTTGGGGCGTATGATGTACCAAGAACGC
TACTATGACCCTGATGAATGGGGTAAAGAGATGGTTGCGCTAAGACAACCTGTCTATATT
GGAGAACTGCAAACACCATCCTCTCAAAGAGAAGTTTGTGGACTATTGCATTAAAGGG
GATAAATATAGGCTTGGTATAGATATCCCAGGTTTTCTAGATAATCTGGAAACGTTATC
TGAGAAAGCTATCGAAGTAATGCCAGACTTTATGGGCTACACACAATCACTTGGACAC
CATGAAGATAAGGTGTCAAAAGGTATTAATGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNN (SEQ ID N°: 62)

>28PBVKM-19-046_RDRP

NN
NN
NN
NN
NN
NN
NN
NN
NN
NN
NN
NN

[0308] En el caso de la Cápside, 14 cepas tenían suficiente secuencia para analizar (se eliminaron los espacios en la alineación de nucleótidos). Las nuevas cepas tienen una identidad de nucleótidos del 39-94% con respecto al índice y del 39-100% entre sí. El grupo de la cápside qPCR FAM+/RDRP Cy5+ es muy similar al índice (93,1-94,7%), como se esperaba, mientras que las cepas de la cápside qPCR FAM-/RDRP Cy3+ son sólo un 38-41% similares al índice, pero un 74.6-90.3% entre sí. Nótese que en los individuos como 18-PBVKM-19-023 que tienen el perfil Cy3+, éstos están monoinfectados según mNGS, y por lo tanto parece que la única secuencia de la cápside pertenece a la única secuencia RDRP compilada. Las cepas de EE. UU. y 15-PBV-19-016 que tienen la cápside FAM-/RDRP Cy5± tienen secuencias de la cápside que son mucho más similares a MRN3406 (79-88%) que a las cepas de la cápside FAM-/RDRP Cy3+ (~40%). Esto sugiere que estas secuencias RDRP y de la cápside se segregan en conjunto.

	2_PBV-MRN3406_Capsid	1-PBV-446_CG_Capsid	3-PBV-4138_CG_Capsid	10-PBV-19-001_Capsid	11-PBV-19-006_Capsid	14-PBV-19-015_Capsid	15-PBV-19-016_Capsid	23-PBV-19-035_Capsid	25-PBV-19-038_Capsid	27-PBV-19-044_Capsid	28-PBV-19-046_Capsid	12PBVKM-19-01_Capsid	14PBVKM-19-015_Capsid	18PBVKM-19-023_Capsid	26PBVKM-19-039_Capsid
2_PBV-MRN3406_Capsid	ID	0.789	0.857	0.931	0.93	0.939	0.881	0.935	0.947	0.947	0.947	0.414	0.389	0.407	0.402
1-PBV-446_CG_Capsid	0.789	ID	0.78	0.789	0.792	0.792	0.788	0.798	0.793	0.793	0.793	0.405	0.386	0.386	0.393
3-PBV-4138_CG_Capsid	0.857	0.78	ID	0.854	0.859	0.855	0.916	0.859	0.86	0.86	0.862	0.328	0.381	0.397	0.399
10-PBV-19-001_Capsid	0.931	0.789	0.854	ID	0.923	0.936	0.867	0.933	0.932	0.932	0.932	0.416	0.391	0.414	0.412
11-PBV-19-006_Capsid	0.93	0.792	0.859	0.923	ID	0.933	0.875	0.935	0.935	0.935	0.935	0.416	0.395	0.411	0.406
14-PBV-19-015_Capsid	0.939	0.792	0.855	0.936	0.933	ID	0.876	0.933	0.935	0.935	0.934	0.411	0.39	0.408	0.402
15-PBV-19-016_Capsid	0.881	0.788	0.916	0.867	0.875	0.876	ID	0.878	0.879	0.879	0.879	0.423	0.391	0.398	0.407
23-PBV-19-035_Capsid	0.935	0.798	0.859	0.933	0.935	0.933	0.878	ID	0.944	0.944	0.944	0.424	0.396	0.415	0.414
25-PBV-19-038_Capsid	0.947	0.793	0.86	0.932	0.935	0.935	0.879	0.944	ID	1	0.998	0.422	0.395	0.414	0.407
27-PBV-19-044_Capsid	0.947	0.793	0.86	0.932	0.935	0.935	0.879	0.944	1	ID	0.998	0.422	0.395	0.414	0.407
28-PBV-19-046_Capsid	0.947	0.793	0.862	0.932	0.935	0.934	0.879	0.944	0.998	0.998	ID	0.422	0.395	0.413	0.406
12PBVKM-19-01_Capsid	0.414	0.405	0.328	0.416	0.416	0.411	0.423	0.424	0.422	0.422	ID	0.771	0.77	0.903	
14PBVKM-19-015_Capsid	0.389	0.386	0.381	0.391	0.395	0.39	0.391	0.396	0.395	0.395	0.395	0.771	ID	0.838	0.746
18PBVKM-19-023_Capsid	0.407	0.386	0.397	0.414	0.411	0.408	0.398	0.415	0.414	0.414	0.413	0.77	0.838	ID	0.753
26PBVKM-19-039_Capsid	0.402	0.393	0.399	0.412	0.406	0.402	0.407	0.414	0.407	0.407	0.406	0.903	0.746	0.753	ID

Matriz de identidad de nucleótidos para el marco de lectura abierto de la cápside.

[0309] En el caso de las proteínas de la cápside, no se han eliminado los espacios. Las nuevas cepas tienen un 20-97% de identidad de aminoácidos con respecto al índice y un 18-100% entre sí. Las cepas qPCR FAM+/RDRP Cy5+ de la cápside son todas muy similares al índice (96-97%) y tienen un promedio de 91.9% cuando se incluye FAM-/RDRP Cy5±. Las cepas FAM-/RDRP Cy3+ de la cápside de la qPCR son sólo un 20-22% similares a las cepas del índice y de los EE. UU., pero un 76-93% (media de 82.5%) entre sí

	2_PBV-MRN3406_Capsid	1-PBV-446_CG_Capsid	3_PBV-4138_CG_Capsid	10-PBV-19-001_Capsid	11-PBV-19-006_Capsid	14-PBV-19-015_Capsid	15-PBV-19-016_Capsid	23-PBV-19-035_Capsid	25-PBV-19-038_Capsid	27-PBV-19-044_Capsid	28-PBV-19-046_Capsid	12PBVKM-19-01_Capsid	14PBVKM-19-015_Capsid	18PBVKM-19-023_Capsid	26PBVKM-19-039_Capsid
2_PBV-MRN3406_Capsid	ID	0.786	0.905	0.963	0.943	0.965	0.907	0.965	0.971	0.971	0.971	0.223	0.204	0.204	0.209
1-PBV-446_CG_Capsid	0.786	ID	0.806	0.786	0.784	0.786	0.803	0.789	0.789	0.789	0.789	0.232	0.209	0.214	0.212
3-PBV-4138_CG_Capsid	0.905	0.806	ID	0.911	0.907	0.917	0.95	0.919	0.917	0.917	0.917	0.225	0.209	0.214	0.212
10-PBV-19-001_Capsid	0.963	0.786	0.911	ID	0.95	0.963	0.905	0.965	0.969	0.969	0.969	0.227	0.198	0.202	0.207
11-PBV-19-006_Capsid	0.943	0.784	0.907	0.95	ID	0.948	0.893	0.96	0.963	0.963	0.962	0.229	0.209	0.209	0.218
14-PBV-19-015_Capsid	0.965	0.786	0.917	0.963	0.948	ID	0.912	0.963	0.967	0.967	0.967	0.225	0.205	0.209	0.212
15-PBV-19-016_Capsid	0.907	0.803	0.95	0.905	0.893	0.912	ID	0.91	0.91	0.91	0.909	0.236	0.209	0.211	0.218
23-PBV-19-035_Capsid	0.965	0.789	0.919	0.965	0.96	0.963	0.91	ID	0.982	0.982	0.982	0.227	0.202	0.209	0.212
25-PBV-19-038_Capsid	0.971	0.789	0.917	0.969	0.963	0.967	0.91	0.982	ID	1	0.996	0.225	0.205	0.209	0.212
27-PBV-19-044_Capsid	0.971	0.789	0.917	0.969	0.963	0.967	0.91	0.982	1	ID	0.996	0.225	0.205	0.209	0.212
28-PBV-19-046_Capsid	0.971	0.789	0.917	0.969	0.962	0.967	0.909	0.982	0.996	0.996	ID	0.227	0.205	0.209	0.214
12PBVKM-19-01_Capsid	0.223	0.232	0.187	0.227	0.229	0.225	0.236	0.227	0.225	0.225	0.227	ID	0.781	0.786	0.933
14PBVKM-19-015_Capsid	0.204	0.209	0.209	0.198	0.209	0.205	0.209	0.202	0.205	0.205	0.205	0.781	ID	0.916	0.766
18PBVKM-19-023_Capsid	0.204	0.214	0.205	0.202	0.209	0.209	0.211	0.209	0.209	0.209	0.209	0.786	0.916	ID	0.768
26PBVKM-19-039_Capsid	0.209	0.212	0.216	0.207	0.218	0.212	0.218	0.14	0.212	0.212	0.214	0.933	0.766	0.768	ID

Matriz de identidad de aminoácidos para el marco de lectura abierto de la cápside.

[0310] Para la RDRP, 14 cepas tenían suficiente secuencia para analizar (no se eliminaron los espacios en la alineación de nucleótidos). Las nuevas cepas tienen una identidad de nucleótidos del 59-93.6% con respecto al índice y del 59-100% entre sí. Las cepas de la cápside qPCR FAM+/RDRP Cy5+ son todas muy similares al índice (84-93.6%), mientras que las cepas de la cápside qPCR FAM-/RDRP Cy3+ son sólo 59-61% similares al índice, pero 87-95% entre sí. Las cepas de EE. UU. y 15-PBV-19-016, que son FAM-/RDRP Cy5± de la cápside, tienen secuencias RDRP mucho más similares a MRN3406 (85%) que a las cepas FAM-/RDRP Cy3+ de la cápside (59%).

Sec->	2_PBV-MRN3406	1-PBV-446	3-PBV-4138	10-PBV-19-001	11-PBV-19-006	14-PBV-19-015	15-PBV-19-016	23-PBV-19-035	25-PBV-19-038	27-PBV-19-044	28-PBV-19-046	KM285233.1	12PBVKM-19-012	14PBVKM-19-015	18PBVKM-19-023	26PBVKM-19-039	27PBVKM-19-044
2_PBV-MRN3406	ID	0.852	0.853	0.866	0.853	0.936	0.856	0.843	0.862	0.863	0.863	0.598	0.595	0.588	0.592	0.592	0.611
1-PBV-446	0.852	ID	0.837	0.843	0.832	0.84	0.834	0.817	0.836	0.837	0.837	0.588	0.586	0.581	0.583	0.583	0.6
3-PBV-4138	0.853	0.837	ID	0.934	0.923	0.844	0.937	0.936	0.957	0.957	0.958	0.592	0.596	0.591	0.593	0.59	0.623
10-PBV-19-001	0.866	0.843	0.934	ID	0.947	0.957	0.956	0.928	0.928	0.928	0.929	0.599	0.602	0.601	0.597	0.595	0.631
11-PBV-19-006	0.853	0.832	0.926	0.947	ID	0.851	0.953	0.919	0.922	0.923	0.924	0.598	0.598	0.597	0.586	0.591	0.621
14-PBV-19-015	0.936	0.84	0.844	0.857	0.851	ID	0.852	0.835	0.85	0.851	0.851	0.608	0.61	0.605	0.602	0.605	0.61
15-PBV-19-016	0.856	0.834	0.937	0.956	0.953	0.852	ID	0.923	0.935	0.936	0.936	0.594	0.592	0.593	0.587	0.592	0.622
23-PBV-19-035	0.843	0.817	0.936	0.928	0.919	0.835	0.923	ID	0.929	0.93	0.931	0.588	0.595	0.591	0.588	0.589	0.63
25-PBV-19-038	0.862	0.836	0.957	0.928	0.922	0.85	0.935	0.929	ID	0.999	0.998	0.596	0.6	0.596	0.595	0.595	0.631
27-PBV-19-044	0.863	0.837	0.957	0.928	0.923	0.851	0.936	0.93	0.999	ID	0.999	0.596	0.6	0.596	0.595	0.595	0.631
28-PBV-19-046	0.863	0.837	0.958	0.929	0.924	0.851	0.936	0.931	0.998	0.999	ID	0.596	0.6	0.596	0.595	0.595	0.631
KM285233.1	0.598	0.588	0.592	0.599	0.598	0.608	0.594	0.588	0.596	0.596	0.596	ID	0.942	0.94	0.924	0.94	0.875
12PBVKM-19-012	0.595	0.586	0.596	0.602	0.598	0.61	0.592	0.595	0.6	0.6	0.6	0.942	ID	0.953	0.922	0.943	0.887
14PBVKM-19-015	0.588	0.581	0.591	0.601	0.597	0.605	0.593	0.591	0.596	0.596	0.596	0.94	0.953	ID	0.917	0.952	0.893
18PBVKM-19-023	0.592	0.583	0.593	0.597	0.586	0.602	0.587	0.588	0.595	0.595	0.595	0.924	0.922	0.917	ID	0.921	0.872
26PBVKM-19-039	0.592	0.583	0.59	0.595	0.591	0.605	0.592	0.589	0.595	0.595	0.595	0.94	0.943	0.952	0.921	ID	0.931
27PBVKM-19-044	0.611	0.6	0.623	0.631	0.621	0.61	0.622	0.63	0.631	0.631	0.631	0.875	0.887	0.893	0.872	0.931	ID

Matriz de identidad de nucleótidos para el marco de lectura abierto de la RDRP.

[0311] Para la alineación de la proteína RDRP, no se eliminaron los espacios. Las nuevas cepas tienen una identidad de aminoácidos del 57-96% con respecto al índice y del 56-100% entre sí. Las cepas qPCR FAM+/RDRP Cy5+ son todas similares al índice (88-96%; promedio 92.6%), mientras que las cepas qPCR FAM-/RDRP Cy3+ son sólo 57-61% similares al índice y a las cepas estadounidenses, pero 91-98% (promedio 94.8%) entre sí.

Sec->	2_PBV-MRN3406	1-PBV-446	3-PBV-4138	10-PBV-19-001	11-PBV-19-006	14-PBV-19-015	15-PBV-19-016	23-PBV-19-035	25-PBV-19-038	27-PBV-19-044	28-PBV-19-046	KM285233.1	12PBVKM-19-012	14PBVKM-19-015	18PBVKM-19-023	26PBVKM-19-039	27PBVKM-19-044
2_PBV-MRN3406	ID	0.867	0.907	0.915	0.9	0.96	0.911	0.883	0.905	0.907	0.909	0.573	0.569	0.569	0.571	0.573	0.611
1-PBV-446	0.867	ID	0.85	0.866	0.85	0.856	0.854	0.83	0.849	0.85	0.852	0.567	0.565	0.567	0.563	0.571	0.603
3-PBV-4138	0.907	0.85	ID	0.954	0.966	0.9	0.971	0.954	0.977	0.979	0.981	0.567	0.563	0.567	0.563	0.569	0.606
10-PBV-19-001	0.915	0.866	0.954	ID	0.966	0.903	0.974	0.95	0.949	0.95	0.952	0.564	0.562	0.56	0.566	0.568	0.62
11-PBV-19-006	0.9	0.85	0.966	0.966	ID	0.892	0.981	0.962	0.956	0.958	0.96	0.565	0.561	0.565	0.563	0.567	0.603
14-PBV-19-015	0.96	0.856	0.9	0.903	0.892	ID	0.898	0.871	0.896	0.898	0.9	0.586	0.582	0.582	0.586	0.586	0.599
15-PBV-19-016	0.911	0.854	0.971	0.974	0.981	0.898	ID	0.96	0.969	0.971	0.973	0.565	0.561	0.565	0.561	0.567	0.606
23-PBV-19-035	0.883	0.83	0.954	0.95	0.962	0.871	0.96	ID	0.943	0.945	0.947	0.565	0.561	0.565	0.565	0.571	0.608
25-PBV-19-038	0.905	0.849	0.977	0.949	0.956	0.896	0.969	0.943	ID	0.998	0.996	0.567	0.563	0.567	0.563	0.569	0.606
27-PBV-19-044	0.907	0.85	0.979	0.95	0.958	0.898	0.971	0.945	0.998	ID	0.998	0.567	0.563	0.567	0.563	0.569	0.606
28-PBV-19-046	0.909	0.852	0.981	0.952	0.96	0.9	0.973	0.947	0.996	0.998	ID	0.567	0.563	0.567	0.563	0.569	0.606
KM285233.1	0.573	0.567	0.567	0.564	0.565	0.586	0.565	0.565	0.567	0.567	0.567	ID	0.973	0.975	0.964	0.979	0.926
12PBVKM-19-012	0.569	0.565	0.563	0.562	0.561	0.582	0.561	0.561	0.563	0.563	0.563	0.973	ID	0.979	0.95	0.971	0.917
14PBVKM-19-015	0.569	0.567	0.567	0.56	0.565	0.582	0.565	0.565	0.567	0.567	0.567	0.975	0.979	ID	0.956	0.973	0.924
18PBVKM-19-023	0.571	0.563	0.563	0.566	0.563	0.586	0.561	0.565	0.563	0.563	0.563	0.964	0.95	0.956	ID	0.958	0.907
26PBVKM-19-039	0.573	0.571	0.569	0.568	0.567	0.586	0.567	0.571	0.569	0.569	0.569	0.979	0.97	0.973	0.958	ID	0.948
27PBVKM-19-044	0.611	0.603	0.606	0.62	0.603	0.599	0.606	0.608	0.606	0.606	0.606	0.926	0.917	0.924	0.907	0.948	ID

Matriz de identidad de proteínas para el marco de lectura abierto de la RDRP.

[0312] Si bien las secuencias consenso de la RDRP y de la cápside son prácticamente idénticas para los modelos 19-038, 19-044 y 19-046, estos son de diferentes individuos. Los Cts para cada qPCR fueron diferentes, así como el número de PBV y el total de lecturas NGS obtenidas. La composición de otras lecturas virales y bacterianas determinadas por mNGS ilustra que son muestras distintas y que la 19-044 está coinfectada con la cepa KM285233, mientras que las otras están mono infectadas. Es posible, dada su edad, que 19-044 y 19-046 sean cónyuges

ID DE LA MUESTRA	EDAD	GÉNERO	ETNIA	RAZA	FECHA DE COLECTA	HORA DE COLECTA (MILITAR)	HORA DE CONGELACIÓN (MILITAR)	PAÍS	DIAGNÓSTICO	MÉTODO DE DIAGNÓSTICO	SÍNTOMAS QUE REQUIERAN HOSPITALIZACIÓN	# DE TUBOS
Sptm19-038	69	Masculino	Hisp	Mestizo	7/2/19	11:15	11:30	Colombia	EPOC BARR (-)	UNK	Fatiga, Sudoración nocturna	1
Sptm19-044	72	Masculino	Hisp	Mestizo	7/2/19	14:35	14:50	Colombia	EPOC BARR (-)	UNK	Sudoración nocturna, Escalofríos, Fatiga	1
Sptm19-046	72	Masculino	Hisp	Cau	7/2/19	15:30	15:45	Colombia	Pneumonía (-)	UNK	Dolor de pecho al toser, Pérdida de peso, Escalofríos	1

Análisis Filogenético de las nuevas cepas

[0313] Las secuencias de proteínas de los nuevos genomas se fusionaron en alineamientos para generar nuevos árboles de la cápside (aa 91-333; ampliado desde aa 110-250), mostrados previamente en la FIG. 5B, y de la RDRP (aa 126-473; como antes) mostrados previamente en la FIG. 7B.

El árbol filogenético de la cápside (FIG. 14) muestra que las nuevas cepas FAM+ de la cápside de Colombia se agrupan estrechamente con el caso índice MRN3406 y con longitudes de rama cortas, consistentes con su ~97% de identidad. Un poco más abajo están las cepas FAM-/RDRP Cy5+ de la cápside (en verde) y FAM-/RDRP Cy5- (en azul). Estas comparten una rama con las secuencias de camello y gorila. Las cepas de la cápside FAM-/RDRP Cy3+ (en naranja) se agrupan entre sí en una rama larga separada que indica su significativa distancia genética entre sí, siendo las secuencias de marmota las más estrechamente relacionadas. Curiosamente, estas cápsides comparten un ancestro

común muy distante con las otras secuencias nuevas, pero sólo tienen una identidad de aminoácidos del ~20%.

[0314] El árbol filogenético (FIG. 15) de la RDRP muestra un patrón muy similar al de la cápside. Las proteínas RDRP de las cepas de cápside FAM+/RDRP Cy5+ se agrupan con el caso índice con longitudes de rama cortas, aunque no exactamente de esta manera que la cápside. Mientras que 14PBV-19-015 es muy similar a MRN3406, las otras son ligeramente más distantes, lo que refleja la identidad del 86-90%. También, a diferencia de la cápside, las secuencias RDRP estadounidenses y colombianas se ramifican independientemente de la geografía. Como se esperaba, las proteínas RDRP de las cepas FAM-/RDRP Cy3+ de la cápside se ramificaron estrechamente con las cepas respiratorias camboyanas, KM285233 y KM285234. Estos dos tipos de virus respiratorios comparten un ancestro común reciente y, a diferencia de la cápside, no hay secuencias derivadas de las heces en esta rama.

[0315] En resumen, los perfiles de qPCR y la posterior secuenciación del genoma completo de 17 individuos confirmaron que hay dos grupos de cepas que se parecen al MRN3406 o a otro PBV respiratorio encontrado originalmente en Camboya. Las secuencias de aminoácidos de la cápside (91.9%/82.5%) y de la RDRP (92.6%/94.8%) son muy similares dentro de cada grupo, respectivamente, y éstas segregan con el mismo patrón para los individuos, lo que demuestra que las secuencias de la cápside y de la RDRP están vinculadas. Sin embargo, la gran distancia genética que separa a estas cápsides (20% de identidad) que se ramifican junto con las cepas del PBV derivadas del tracto gastrointestinal se contrasta con la relación monofilética de las secuencias de la RDRP (60% de identidad) para indicar que la proteína RDRP determina el tropismo respiratorio.

Metagenómica

[0316] Se abordó además si el picobirnavirus es simplemente un transeúnte no patógeno (por ejemplo, como el TTV o el GBV-C), una infección oportunista que siempre es secundaria a una infección respiratoria primaria viral, bacteriana o fúngica, pero que quizás exacerba la enfermedad, o es el único patógeno presente en las muestras de esputo y la causa de la enfermedad.

Para todas las 25 coincidencias PBV+ secuenciadas, el número aproximado de lecturas de patógenos de infección conjunta se tabula a continuación:

	Cápside - FAM	RDRP - FAM	RDRP - CY3	RDRP - CY5	Infección viral conjunta		Infección bacteriana conjunta		Infección fúngica conjunta	
ID de la Muestra	Ct	Ct	Ct	Ct	virus	lecturas	bacteria	lecturas	hongos	lecturas
564466	-1	29.41	-1	-1	HHV-4, fago de Strep	54901	Stenotrophomonas, Strep	89000	ninguno	-
564468	-1	33.36	-1	30.34	Influenza, fago de Strep	251	Strep pneumonia	340000	ninguno	-
564138	-1	26.4	-1	23.87	fago de Klebsiella	3000000	Klebsiella pneumonia	76340	ninguno	-
564477	-1	36.26	-1	-1	fago de Strep	3500	ninguno	-	ninguno	-
564470	-1	34.6	-1	32.28	HHV-1	1674	ninguno	-	ninguno	-
D000046722	-1	35.04	-1	33.75	ninguno	-	ninguno	-	ninguno	-
Sptm19-001	26.53	30.78	-1	24.06	ninguno	-	Prevotella, (TB+)	40000	ninguno	-
Sptm19-006	22.18	28.33	-1	20.42	ninguno	-	ninguno, (TB+)	-	ninguno	-
Sptm19-012	-1	23.36	22.78	-1	Respirovirus 3, de fago Strep	16299	Strep, (TB+)	25000	ninguno	-
Control de Espudo	35.26	36.34	-1	33.8	ninguno	-	ninguno	-	ninguno	-
Sptm19-015	24.69	23.1	24.15	25.5	ninguno	-	ninguno, (TB+)	-	ninguno	-
Sptm19-016	-1	28.71	-1	25.56	fago de Pseudomonas	5700	Pseudomonas aeruginosa, (TB+)	100000	ninguno	-
Sptm19-020	-1	35.51	-1	-1	ninguno	-	Strep	80000	ninguno	-
Sptm19-021	35.59	35.25	-1	31.49	Enterovirus D	72	ninguno	-	ninguno	-
Sptm19-023	-1	25.12	24.22	-1	fago de Strep	1500	Strep, Haemophilus parainflu	100000	ninguno	-
Sptm19-031	-1	32.26	-1	30.16	Rinovirus A, fago de Strep	600	Strep pneumonia	75000	ninguno	-
Sptm19-032	-1	27.69	-1	30.16	Rinovirus A, virus de Haemophilus	333	Haemophilus influenzae	100000	ninguno	-
Sptm19-033	-1	25.35	26.91	34.56						
Sptm19-034	-1	26.41	27.39	35.75						
Sptm19-035	35.84	29.3	-1	26.64	fago de Strep	1107	(Porphyromonas gingivalis, Tanner	500000	ninguno	-
Sptm19-036	-1	34.19	-1	30.89	ninguno	-	(Strep milliri)	55000	ninguno	-
Sptm19-038	26.57	30.67	-1	29.08	ninguno	-	ninguno	-	ninguno	-
Sptm19-039	34.43	21.56	25.45	29.43	fago de Strep	1000	Aggregatibacter segnis, Porphyrom	7500	ninguno	-
Sptm19-044	22.58	31.48	-1	26.95	ninguno	-	ninguno	-	ninguno	-
Sptm19-046	19.61	27.14	-1	23.29	ninguno	-	ninguno	-	ninguno	-

[0317] De hecho, el mNGS para la mayoría de las muestras incluyó considerables lecturas virales (HHV-4, Rhinovirus A, Respirovirus 3) y bacterianas (*Streptococcus*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, TB) (pero no fúngicas), sugiriendo que el PBV puede ser una infección oportunista del tracto respiratorio. Sin embargo, 3 infecciones por PBV de alta carga viral ($Cts < 26$; $\geq 10^5$ cp/ml) no mostraron enriquecimiento para ningún microbio adicional, lo que argumenta que puede ser el único patógeno causante de los síntomas.

[0318] También vale la pena señalar que hasta ahora se han detectado infecciones duales por PBV en las muestras 14-PBV-19-015 y 26-PBV-19-039, como lo indica la qPCR. Nótese que las sondas Cy5 y Cy3 son mutuamente excluyentes, lo que significa que se unen a secuencias muy diferentes presentes en la misma localización en RDRP, por lo que una muestra que es positiva para ambas está de hecho infectada en conjunto con estas dos cepas de PBV.

Discusión

[0319] En total, 25 muestras (19.2%) fueron positivas para el PBV. Era totalmente concebible desde el principio que, a pesar de tener un ensayo qPCR fiable, no se detectaran nuevas cepas entre las muestras examinadas. Por el contrario, aquí se demuestra que las infecciones por picobirnavirus son bastante frecuentes en individuos con síntomas respiratorios graves. Esto confirma y amplía las observaciones de que los PBV no están simplemente restringidos al tracto gastrointestinal, sino que también pueden encontrarse en las secreciones/fluidos respiratorios.

[0320] Hay varios puntos clave con respecto a los datos. En primer lugar, técnicamente, el ensayo qPCR funcionó bien. Los valores de Ct para cada muestra positiva oscilaron entre 22 ($\geq 10^6$ copias/ml) y 38 ($\leq 10^2$ copias/ml). Si todas las cargas virales tuvieran valores similares, esto podría sugerir un contaminante o un problema con el ensayo. La variabilidad entre las muestras aquí sugiere que son reales: o bien es un reflejo de los verdaderos títulos o hay retrasos en el Ct debido a desajustes en la sonda. Además, para el ensayo RDRP multiplex, cualquier muestra que fue positiva en el canal Cy5 o Cy3 también fue positiva para la sonda 'universal PBV' en el canal FAM, como se esperaba. Del mismo modo, no hubo casos en los que los positivos para la cápside fueran negativos para la RDRP, aunque ciertamente esto podría haber sido posible. Se observó que las muestras pueden ser triplemente positivas para RDRP, en cuyo caso indica una infección doble.

[0321] En segundo lugar, los resultados de la cápside son consistentes con la geografía y la extrema variabilidad genética del PBV, pero muestran que los segmentos de la cápside y la RDRP se segregan en conjunto. Ninguna de las muestras (n=80) de los EE. UU. fue positiva para la cápside; los únicos positivos para la cápside (n=10) fueron del sitio original en Colombia. Por supuesto, todos los PBV

tienen un segmento que codifica la cápside, pero las pruebas aquí realizadas sólo buscan detectar aquellos similares a la cápside ABT. En los Estados Unidos, se encontraron cepas de PBV con (n=4) y sin (n=2) la secuencia RDRP de ABT (por ejemplo, reactividad Cy5). A pesar de la reactividad negativa para FAM, la cápside de este grupo de secuencias US era en realidad bastante similar en un 91,9% entre sí y al índice. Por el contrario, el segundo grupo (Cy3+) que se asemeja a la cepa camboyana, también con reactividad negativa para FAM, era muy diferente del caso índice (sólo un 20% de identidad), pero de nuevo muy similar entre sí (82.5%). Las secuencias de aminoácidos de la RDRP (92.6%/94.8%) eran igualmente muy idénticas dentro de cada grupo, respectivamente. Así pues, las secuencias de la cápside y de la RDRP se ramifican con el mismo patrón por individuo, lo que demuestra que están vinculadas.

[0322] En tercer lugar, la qPCR es capaz de detectar una amplia gama de diversidad genética. Si sólo se limitara a cebadores y sondas que amplifican y detectan un segmento del genoma con similitud al caso índice (cápside FAM+ o RDRP Cy5+), el ensayo sólo habría demostrado la detección de cepas con un 7% o 15% de disimilitud. Sin embargo, se utilizó un conjunto de cebadores con sondas RDRP conservadas, que en la práctica pueden amplificar una amplia gama de secuencias del PBV. De hecho, la secuenciación completa del genoma de los resultados obtenidos muestra que las secuencias de nucleótidos de la cápside y de la RDRP pueden tener tan sólo un 39% y un 59% de identidad global con el caso índice, respectivamente, y aun así ser fácilmente detectadas. Este nivel de divergencia con respecto al caso índice es el que se observa en todos los PBV, independientemente de que procedan de heces o de esputo (FIG. 3 y FIG. 4). Esta amplia tolerancia a la diversidad de secuencias, junto con su alta sensibilidad, hacen del ensayo de qPCR una herramienta de descubrimiento y diagnóstico muy útil.

[0323] En cuarto lugar, está la prevalencia del PBV y el papel que esta secuencia particular de RDRP puede jugar en el tropismo del tracto respiratorio y la enfermedad. Mientras que se encontraron 3 resultados con secuencias de RDRP potencialmente nuevas (FAM+ solamente; 2 de las cuales tenían Ct > 35), la mayoría (22/25) eran RDRP positivas duales, ya sea FAM+Cy5+ o FAM+Cy3+, y cayeron en 2 grupos distintos. Este sorprendente resultado confirma que las cepas de PBV que llevan estas secuencias de RDRP están implicadas o posiblemente implicadas en los síntomas respiratorios graves. También dice que cuando se detecta un PBV en muestras respiratorias, es probable que tenga una secuencia filogenéticamente cercana a la ABT colombiana o a las secuencias camboyanas. Así, una gran distancia genética separa las cápsides (20% de identidad) de estos grupos y se ramifican junto con las cepas de PBV derivadas del tracto gastrointestinal. Por el contrario, las secuencias RDRP

(60% de identidad) de los grupos se ramifican monofiléticamente para indicar que es la proteína RDRP la que determina el tropismo respiratorio.

En quinto lugar, mediante el uso de mNGS no sesgadas y el análisis en SURPI, fue posible evaluar si hay otros patógenos que también podrían proporcionar explicaciones plausibles para los síntomas respiratorios exhibidos. No se disponía de información clínica sobre las muestras de EE. UU., pero en el caso de los pacientes colombianos, 27/50 fueron positivos para tuberculosis (TB), que es muy difícil de detectar mediante NGS. De los 19 resultados PBV+ de esta cohorte, sólo 6 fueron positivos a la tuberculosis. La mayoría de las otras muestras mostraron evidencia de otro patógeno respiratorio, lo que sugiere que podría ser una infección oportunista o que sólo se encuentra en individuos inmunocomprometidos, que es a menudo el caso del PBV que infecta el tracto gastrointestinal. Sin embargo, en un puñado de cepas hasta ahora, el PBV parece ser el único patógeno presente. Dado que estos tienen títulos altos, el PBV puede ser en realidad la infección aguda primaria, y lo que se observa en otros pacientes es la progresión a coinfecciones virales o bacterianas secundarias.

[0324] Se descubrió una nueva cepa de picobirnavirus en el esputo de un paciente de Colombia. Aunque los PBV están implicados en la gastroenteritis y la diarrea, se conocen informes aislados recientes de PBV en secreciones respiratorias. El análisis filogenético de la nueva cepa indicó que de los cientos de secuencias de RDRP depositadas, la cepa se asemejaba a las encontradas en pacientes camboyanos con enfermedades respiratorias, esto a pesar de tener sólo un 58% de identidad global a nivel de aminoácidos. Se desarrolló un nuevo ensayo de PCR cuantitativo para detectar los segmentos de la cápside y la RDRP de esta cepa. Este ensayo también sirve como herramienta de descubrimiento, para encontrar secuencias de PBV relacionadas y totalmente nuevas en virtud de la conservación de la secuencia. Se observó una infección activa por el PBV en casi el 20% de las muestras de esputo de pacientes con enfermedades respiratorias graves. Cepas de PBV similares a la nueva cepa (por ejemplo, el caso índice) y a la cepa camboyana parecen estar circulando en Colombia, mientras que cepas relacionadas se han extendido a los Estados Unidos. La elevada prevalencia observada, unida a su capacidad para evolucionar rápidamente, reasignar su genoma segmentado y cruzarse con otras especies, indica la necesidad de una mayor concienciación en materia de salud pública y de futuros estudios sobre los picobirnavirus.

Referencias:

- [0325]** Banyai, K. et al. Genome sequencing identifies genetic and antigenic divergence of porcine picobirnaviruses. *J Gen Virol* 95, 2233-2239, doi:10.1099/vir.0.057984-0 vir.0.057984-0 [pii] (2014).
- [0326]** 2 Ganesh, B., Masachessi, G. & Mladenova, Z. Animal picobirnavirus. *Virusdisease* 25, 223-

238, doi:10.1007/s13337-014-0207-y 207 [pii] (2014).

[0327] 3 Malik, Y. S. et al. Epidemiology, phylogeny, and evolution of emerging enteric Picobirnaviruses of animal origin and their relationship to human strains. *Biomed Res Int* 2014, 780752, doi:10.1155/2014/780752 (2014). 4 Ribeiro Silva, R. et al. Genogroup I avian picobirnavirus detected in Brazilian broiler chickens: a molecular epidemiology study. *J Gen Virol* 95, 117-122, doi:10.1099/vir.0.054783-0 vir.0.054783-0 [pii] (2014).

[0328] Banyai, K. et al. Genome sequencing identifies genetic and antigenic divergence of porcine picobirnaviruses. *J Gen Virol* 95, 2233-2239, doi:10.1099/vir.0.057984-0 vir.0.057984-0 [pii] (2014).

[0329] 2 Ganesh, B., Masachessi, G. & Mladenova, Z. Animal picobirnavirus. *Virusdisease* 25, 223-238, doi:10.1007/s13337-014-0207-y 207 [pii] (2014).

[0330] 3 Malik, Y. S. et al. Epidemiology, phylogeny, and evolution of emerging enteric Picobirnaviruses of animal origin and their relationship to human strains. *Biomed Res Int* 2014, 780752, doi:10.1155/2014/780752 (2014).

[0331] 4 Ribeiro Silva, R. et al. Genogroup I avian picobirnavirus detected in Brazilian broiler chickens: a molecular epidemiology study. *J Gen Virol* 95, 117-122, doi:10.1099/vir.0.054783-0 vir.0.054783-0 [pii] (2014).

[0332] 5 Smits, S. L. et al. Genogroup I and II picobirnaviruses in respiratory tracts of pigs. *Emerg Infect Dis* 17, 2328-2330, doi:10.3201/eid1712.110934 (2011). 6 Cummings, M. J. et al. Precision surveillance for viral respiratory pathogens: virome capture sequencing for the detection and genomic characterization of severe acute respiratory infection in Uganda. *Clin Infect Dis*, doi:10.1093/cid/ciy656 5067586 [pii] (2018).

[0333] 7 Rosen, B. I., Fang, Z. Y., Glass, R. I. & Monroe, S. S. Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. *Virology* 277, 316-329, doi:10.1006/viro.2000.0594 S00426822(00)90594-4 [pii] (2000).

[0334] 8 Woo, P. C. et al. High Diversity of Genogroup I Picobirnaviruses in Mammals. *Front Microbiol* 7, 1886, doi:10.3389/fmicb.2016.01886 (2016). 9 Wakuda, M., Pongsuwanna, Y. & Taniguchi, K. Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human picobirnavirus. *J Virol Methods* 126, 165-169, doi:S0166-0934(05)00063-7 [pii] 10.1016/j.jviromet.2005.02.010 (2005).

[0335] 10 Da Costa, B., Duquerroy, S., Tarus, B. & Delmas, B. Picobirnaviruses encode a protein with repeats of the ExxRxNxxxE motif. *Virus Res* 158, 251-256, doi:10.1016/j.virusres.2011.02.018 S0168-1702(11)00070-0 [pii] (2011).

[0336] 11 Knox, M. A., Gedye, K. R. & Hayman, D. T. S. The Challenges of Analysing Highly

Diverse Picobirnavirus Sequence Data. *Viruses* 10, doi:E685 [pii] 10.3390/v10120685 v10120685 [pii] (2018).

[0337] 12 van Leeuwen, M. et al. Human picobirnaviruses identified by molecular screening of diarrhea samples. *J Clin Microbiol* 48, 1787-1794, doi:10.1128/JCM.02452-09 JCM.02452-09 [pii] (2010).

[0338] 13 Banyai, K. et al. Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. *Arch Virol* 148, 2281-2291, doi:10.1007/s00705-003-0200-z (2003).

Reivindicaciones