República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) **PI 0211191-8 B1**

(22) Data de Depósito: 28/06/2002

(45) Data da Concessão: 15/09/2015
(RPI 2332)

(54) Título: ENSAIOS BASEADOS EM ÁCIDO NUCLÉICO PARA SE DIAGNOSTICAR PRECISAMENTE INFECÇÃO POR PARVOVÍRUS B19 E INCIADORES E MARCADORES PARA USO NESSES ENSAIOS

(51) Int.Cl.: C12Q1/68

(30) Prioridade Unionista: 28/06/2001 US 60/302,077, 19/03/2002 US 60/365,956, 29/03/2002 US 60/369,224, 28/06/2001 US 60/302,077, 28/06/2001 US 60/302,077, 19/03/2002 US 60/365,956, 19/03/2002 US 60/365,956, 29/03/2002 US 60/369,224

(73) Titular(es): Chiron Corporation, Novartis Vaccines & Diagnostics, Inc.

(72) Inventor(es): Sergio Pichuantes, Venkatakrishna Shyamala

ENSAIOS BASEADOS EM ÁCIDO NUCLÉICO PARA SE DIAGNOSTICAR PRECISAMENTE INFECÇÃO POR PARVOVÍRUS B19 E INICIADORES E MARCADORES PARA USO NESSES ENSAIOS

Campo técnico

A presente invenção pertence de forma geral aos diagnósticos virais. Em particular, a invenção se relaciona a ensaios baseados em ácido nucléico para se diagnosticar precisamente infecção por parvovírus B19 e a iniciadores e marcadores para uso nesses ensaios.

Fundamentos da invenção

Parvovírus B19 humano é um membro da família Parvoviridae, gênero Erythrovirus e é um pequeno vírus não-envelopado icosaédrico de 22 nm com uma molécula de DNA de filamento único linear de aproximadamente 5.600 nucleotídeos. O genoma viral codifica três proteínas principais, VP1, VP2 e NS1. Veja, Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936 e Figura 1 nesta. VP1 (83 kDa) e VP2 (58 kDa) são as proteínas estruturais do capsídeo. As duas proteínas são codificadas em estruturas de leitura sobrepostas a partir de em torno dos nucleotídeos 2444 a 4789 e de torno de 3125 a 4789, respectivamente. VP2 constitui 95% do capsídeo e a proteína maior VP1 somente 5% do capsídeo. VP1 é necessária para a conformação madura do vírus. NS1 (77 kDa), é uma proteína não-estrutural e está presente somente na fração nuclear de células infectadas, e ausente do citoplasma e vírions intactos nos soros.

Parvovírus B19 foi primeiro descoberto nos soros de doadores de sangue normais e é o único membro da família Parvoviridae que se sabe patogênico em humanos. O vírus está associado com uma ampla gama de manifestações de

doença. Parvovírus B19 humano normalmente causa uma infecção autolimitada leve ou assintomática em crianças. Em adultos, parvovírus B19 pode causar uma erupção, poliartralgia e artrite simétrica transitória. Parvovírus B19 tem sido associado com crise aplástica transitória (TAC) em pacientes com distúrbios hemolíticos subjacentes. Infecção crônica por B19 e anemia persistente foram relatadas em pacientes imunocomprometidos com leucemia aguda, imunodeficiências congênitas, AIDS, e após transplante de medula óssea. Parvovírus B19 também foi associado com morte fetal em mulheres grávidas.

Na maioria dos países, infecção por vírus B19 ocorre geralmente durante a infância, com aproximadamente 50% de crianças tendo anticorpos anti-B19 em torno dos 15 anos de idade. A prevalência do anticorpo para B19 pode ainda aumentar durante a vida e alcança valores mais altos do que 90% em indivíduos idosos.

Na infecção humana por parvovírus B19, acredita-se que a replicação viral inicial ocorra no trato respiratório. O vírus então tem como alvo células na medula óssea. Isso leva a uma replicação viral em grande escala com viremia relatada de entre 10^2 a até 10^{14} partículas/ml, ocorrendo 7-10 dias após infecção mas antes do surgimento de sintomas. A cessação da viremia coincide com a detecção de anticorpos IgM específicos permanecem elevados por dois a três meses. Anticorpos IgG anti-B19 são detectados poucos dias após anticorpos IgM aparecerem e persistem por toda a vida.

A ausência de um envelope de lipídeo e o conteúdo limitado de DNA tornam o parvovírus B19 extremamente resistente à inativação físico-química. Parvovírus B19,

especialmente em, alta concentração, pode tolerar tratamento convencional por calor de produtos de sangue e a transmissão de B19 através da administração de fator VIII tratado com solvente-detergente e de fatores VIII e IX aquecido com vapor ou a seco foi documentada.

Parvovírus B19 humano não pode crescer em culturas convencionais de célula tornando a detecção e isolamento de laboratório do vírus extremamente difícil. Dessa forma, por muitos anos, a única fonte de antígeno consistiu em soros de pacientes virêmicos. Antígenos recombinantes foram produzidos para uso em ensaios sorológicos em uma tentativa de contornar esses problemas. Veja, por exemplo, Sisk e Berman, *Biotechnology* (1987) 5: 1077-1080; Patente U.S. No. 6.204.044. Foram usados ensaios de captura imunoenzimática de IgM para detectar IgM anti-B19, bem como para diagnosticar infecção recente por B19. A performance diagnóstica de inúmeros testes comercialmente disponíveis, no entanto, não é homogênea. Além disso, testes diagnósticos baseados em IgM não podem detector o vírus durante o estágio virêmico de infecção e uma vez que os anticorpos IgM são sintetizados, eles podem permanecer em circulação por vários meses após o término da viremia.

A alta prevalência de anticorpos para B19 na população normal juntamente com o fato de que viremia elevada usualmente persiste por somente uma semana, torna o uso de testes com base sorológica impraticáveis. Além disso, em pacientes imunocomprometidos, o diagnóstico sorológico pode não ser confiável.

Ensaios de hibridização baseados em ácido nucléico, tais como "dot blot" e hibridização *in situ* foram usados

para detecção de B19. Esses ensaios geralmente têm limites de detecção de 1 a 0,1 pg de DNA viral (~104-105 partículas virais). PCR tem maior sensibilidade (~100 cópias de genoma). No entanto, técnicas de hibridização de DNA requerem muito tempo e de uso limitado e PCR é impraticável para o rastreamento de grandes números de amostras.

Portanto, permanece a necessidade para o desenvolvimento de testes diagnósticos confiáveis para detectar parvovírus B19 em amostras virêmicas, a fim de evitar a transmissão do vírus através de derivados de plasma e sangue ou por contato pessoal íntimo.

Resumo da invenção

A presente invenção é baseada na descoberta de iniciadores e marcadores exclusivos para uso em ensaios baseados em ácido nucléico, bem como no desenvolvimento de um teste diagnóstico baseado em ácido nucléico sensível, confiável, para a detecção de DNA de parvovírus B19 em amostras biológicas de indivíduos potencialmente infectados. As técnicas aqui descritas utilizam DNA extraído de amostra como um modelo para amplificação de regiões genômicas conservadas da seqüência de B19 usando amplificação mediada por transcrição (TMA), bem como em um ensaio de 5′ nuclease, tal como a técnica TaqMan™. Os métodos permitem a detecção de DNA de B19 em amostras virêmicas que têm titulações virais tão baixas quanto 103 partículas de vírus/ml. Conseqüentemente, amostras infectadas podem ser identificadas e excluídas de transfusão, bem como da preparação de derivados de sangue. Os marcadores e iniciadores aqui descritos também são úteis em, por exemplo, métodos-padrão de hibridização, bem como

em técnicas baseadas em PCR, amplificação baseada em seqüência de ácido nucléico (NASBA) e em ensaios que utilizam molécula de DNA ramificado.

Conseqüentemente, em uma modalidade, a invenção em questão é dirigida a um método de detecção de infecção humana por parvovírus B19 em uma amostra biológica. O método compreende:

(a) isolamento de ácido nucléico de uma amostra biológica suspeita de conter DNA de parvovírus B19 humano, onde o ácido nucléico compreende uma seqüência-alvo de RNA;

(b) reação do ácido nucléico isolado de parvovírus B19 com um primeiro oligonucleotídeo que compreende um primeiro iniciador que compreende uma seqüência de formação de complexo suficientemente complementar à porção do terminal 3' da seqüência-alvo de RNA para com ela formar um complexo, onde o primeiro iniciador ainda compreende um promotor para uma RNA polimerase 5' dependente de DNA e operacionalmente ligado à seqüência de formação de complexo, onde a reação é feita sob condições que permitem a formação de um complexo oligonucleotídeo/seqüência-alvo e iniciação de síntese de DNA;

(c) extensão do primeiro iniciador em uma reação de extensão usando a seqüência-alvo de RNA como um modelo para gerar um primeiro produto de extensão de iniciador de DNA complementar à seqüência-alvo de RNA;

(d) separação do primeiro produto de extensão de iniciador de DNA da seqüência-alvo de RNA usando uma enzima que degrada seletivamente a seqüência-alvo de RNA;

(e) tratamento do produto de extensão de iniciador de DNA com um segundo oligonucleotídeo que compreende um

segundo iniciador que compreende uma seqüência de formação de complexo suficientemente complementar à porção do terminal 3' do produto de extensão de iniciador de DNA para com ela formar um complexo sob condições que permitem a formação de um complexo oligonucleotídeo/seqüência-alvo e iniciação de síntese de DNA;

(f) extensão do terminal 3' do segundo iniciador em uma reação de extensão de DNA para gerar um segundo produto de extensão de iniciador de DNA, produzindo dessa forma um modelo para a RNA polimerase dependente de DNA;

(g) uso do modelo para a produção de múltiplas cópias de RNA da seqüência-alvo usando uma RNA polimerase dependente de DNA que reconhece a seqüência promotora;

e (h) uso das cópias de RNA da etapa (g), a repetição de forma autocatalítica das etapas (b) a (g) para amplificar a seqüência-alvo.

Em certas modalidades, o método ainda compreende as etapas de:

(i) adição de um marcador rotulado de oligonucleotídeo ao produto da etapa (h), onde o marcador de oligonucleotídeo é complementar a uma porção da seqüência-alvo, sob condições que permitem a hibridização do marcador com a seqüência-alvo para formarem um complexo marcador:alvo; e

(j) detecção da presença ou ausência de rótulo como uma indicação da presença ou ausência da seqüência-alvo.

Em modalidades adicionais, o rótulo é um éster de acridínio.

Ainda em modalidades adicionais, o primeiro e segundo iniciador, e o marcador usado nos métodos acima são

derivados da região VP1 do genoma do parvovírus B19 humano, tal como da seqüência de polinucleotídeos em qualquer uma das Figuras 2A-2U ou 11A-11Z.

Em outra modalidade, a invenção é dirigida a um método de detecção de infecção humana por parvovírus B19 em uma amostra biológica. O método compreende:

(a) isolamento de ácido nucléico de uma amostra biológica suspeita de conter DNA de parvovírus B19 humano, onde o ácido nucléico compreende uma seqüência-alvo de RNA;

(b) reação do ácido nucléico isolado de parvovírus B19 com um primeiro oligonucleotídeo que compreende um primeiro iniciador que compreende uma seqüência de formação de complexo suficientemente complementar à porção do terminal 3' da seqüência-alvo de RNA para com ela formar um complexo, onde o primeiro iniciador ainda compreende um promotor para uma RNA polimerase 5' dependente de DNA e operacionalmente ligado à seqüência de formação de complexo, onde o primeiro iniciador compreende a seqüência derivada da seqüência de polinucleotídeos em qualquer uma das Figuras 2A-2U ou Figuras 11A-11Z e a reação é feita sob condições que permitem a formação de um complexo oligonucleotídeo/seqüência-alvo e iniciação de síntese de DNA;

(c) extensão do primeiro iniciador em uma reação de extensão usando a seqüência-alvo de RNA como um modelo para gerar um primeiro produto de extensão de iniciador de DNA complementar à seqüência-alvo de RNA;

(d) separação do primeiro produto de extensão de iniciador de DNA da seqüência-alvo de RNA usando uma enzima que degrada seletivamente a seqüência-alvo de RNA;

(e) tratamento do produto de extensão de iniciador de DNA com um segundo oligonucleotídeo que compreende um segundo iniciador que compreende uma seqüência de formação de complexo suficientemente complementar à porção do terminal 3' do produto de extensão de iniciador de DNA para com ela formar um complexo, onde o segundo iniciador é derivado da seqüência de polinucleotídeos em qualquer uma das Figuras 2A-2U ou Figuras 11A-11Z e o tratamento é feito sob condições que permitem a formação de um complexo oligonucleotídeo/seqüência-alvo e iniciação de síntese de DNA;

(f) extensão do terminal 3' do segundo iniciador em uma reação de extensão de DNA para gerar um segundo produto de extensão de iniciador de DNA, produzindo dessa forma um modelo para a RNA polimerase dependente de DNA;

(g) uso do modelo para a produção de múltiplas cópias de RNA da seqüência-alvo usando uma RNA polimerase dependente de DNA que reconhece a seqüência promotora;

e (h) uso das cópias de RNA da etapa (g), a repetição de forma autocatalítica das etapas (b) a (g) para amplificar a seqüência-alvo;

(i) adição de um marcador de oligonucleotídeo rotulado com éster de acridínio ao produto da etapa (h), onde o marcador de oligonucleotídeo é complementar a uma porção da referida seqüência-alvo e o marcador é derivado da seqüência de polinucleotídeos em qualquer uma das Figuras 2A-2U, onde o marcador é adicionado sob condições que permitem a hibridização do marcador com a seqüência-alvo para formarem um complexo marcador:alvo; e

(j) detecção da presença ou ausência de rótulo como

uma indicação da presença ou ausência da seqüência-alvo.

Em ainda outra modalidade, a invenção é dirigida a um método para amplificação de uma seqüência-alvo de nucleotídeos de parvovírus B19. O método compreende:

(a) isolamento de ácido nucléico de uma amostra biológica suspeita de conter DNA de parvovírus B19 humano, onde o ácido nucléico compreende uma seqüência-alvo de RNA;

(b) adição de um ou mais iniciadores capazes de hibridizar para a seqüência-alvo de RNA, onde aquele um ou mais iniciadores são derivados das seqüências de polinucleotídeos em qualquer uma das Figuras 2A-2U e Figuras 11A-11Z;

(c) adição de um marcador de oligonucleotídeo capaz de hibridizar para a seqüência-alvo de RNA 3' em relação àquele um ou mais iniciadores;

(d) extensão daquele um ou mais iniciadores usando uma polimerase.

Em certas modalidades, a seqüência-alvo de RNA da etapa (a) é transcrita de forma reversa para fornecer cDNA e o método pode ainda compreender a amplificação do cDNA usando reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) ou reação em cadeia de ligase de intervalo assimétrico (RT-AGLCR). Em outras modalidades, a polimerase é uma polimerase termoestável, tal como, mas não limitado a, Taq polimerase ou Vent polimerase. Em modalidades adicionais, a polimerase é DNA polimerase I de *E. coli*, fragmento de Klenow de DNA polimerase I de *E. coli*, ou T4 DNA polimerase.

Em certas modalidades dos vários métodos descritos acima, é fornecido um controle interno. O controle interno pode ser derivado da seqüência da Figura 12 (ID. DE SEQ.

N°: 92). Em modalidades adicionais, o controle interno compreende ID. DE SEQ. N°: 90.

Em modalidades adicionais, a invenção é dirigida a um método para a detecção de infecção humana por parvovírus B19 em uma amostra biológica. O método compreende:

(a) isolamento de ácido nucléico de uma amostra biológica suspeita de conter DNA de parvovírus B19 humano, onde o ácido nucléico compreende uma seqüência-alvo;

(b) reação do ácido nucléico isolado de parvovírus B19 com um marcador rotulado de forma detectável suficientemente complementar a e capaz de hibridizar com a seqüência-alvo, onde o marcador é derivado das seqüências de polinucleotídeos em qualquer uma das Figuras 2A-2U e Figuras 11A-11Z, e ainda onde a reação é feita sob condições que permitem a formação de um complexo marcador/seqüência-alvo; e

(c) detecção da presença ou ausência de rótulo como uma indicação da presença ou ausência da seqüência-alvo.

Em modalidades adicionais, a invenção é dirigida a um polinucleotídeo que compreende uma seqüência de nucleotídeos que compreende qualquer uma das seqüências de nucleotídeos reveladas nas Figuras 2A-2U ou Figuras 11A-11Z.

Em modalidades adicionais, a invenção é dirigida a um polinucleotídeo, como acima, onde a seqüência de nucleotídeos consiste na seqüência de nucleotídeos revelada nas Figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2H,2I, 2J, 2K, 2L, 2M, 2N, 20,2P, 2Q, 2R, 2S,2T, 2U, 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 11G, 11H, 11I, 11J, 11K, 11L, 11M, 11N, 11O, 11P, 11Q, 11R, 11S, 11T, 11U, 11V, 11W, 11X, 11Y ou 11Z.

Em ainda outras modalidades, a invenção em questão é dirigida a um polinucleotídeo que compreende uma seqüência de nucleotídeos que compreende qualquer uma das seqüências de nucleotídeos reveladas nas Figuras 3A-3C ou 4A-4C.

Em modalidades adicionais, a invenção é dirigida a um polinucleotídeo como acima, onde a seqüência de nucleotídeos consiste na seqüência de nucleotídeos revelada nas Figuras 3A-3C ou nas Figuras 4A-4C.

Em outra modalidade, a invenção é dirigida a um iniciador de oligonucleotídeo que consiste em uma região promotora reconhecida por uma RNA polimerase dependente de DNA operacionalmente ligada a uma seqüência de formação de complexo específica para parvovírus B19 humano de cerca de 10 a cerca de 75 nucleotídeos. Em certas modalidades, a região promotora é o promotor T7 e a referida polimerase é T7 RNA polimerase. Adicionalmente, a seqüência específica para parvovírus B19 humano pode ser da região VP1 do genoma do parvovírus B19 humano, tal como da seqüência de polinucleotídeos em qualquer uma das Figuras 2A-2U ou Figuras 11A-11Z.

Ainda em modalidades adicionais, a invenção é dirigida a um iniciador de oligonucleotídeo que consiste em um promotor T7 operacionalmente ligado a uma seqüência de formação de complexo específica para parvovírus B19 humano de cerca de 10 a cerca de 75 nucleotídeos, onde a seqüência de formação de complexo específica para parvovírus B19 humano é derivada da seqüência de polinucleotídeos em qualquer uma das Figuras 2A-2U ou 11A-11Z.

Em outra modalidade, a invenção é dirigida a um marcador de oligonucleotídeo que compreende uma seqüência

de hibridização específica para parvovírus B19 de cerca de 10 a cerca de 50 nucleotídeos ligada a um rótulo de éster de acridínio. Em certas modalidades, a seqüência de hibridização específica para parvovírus B19 humano é da região VP1 do genoma do parvovírus B19 humano, tal como da seqüência de polinucleotídeos em qualquer uma das Figuras 2A-2U ou Figuras 11A-11Z.

Ainda em uma modalidade adicional, a invenção é dirigida a um kit de teste diagnóstico que compreende um ou mais iniciadores de oligonucleotídeo aqui descritos, e instruções para a condução do teste diagnóstico. Em certas modalidades, o kit de teste ainda compreende um marcador de oligonucleotídeo que compreende uma seqüência de hibridização específica para parvovírus B19 de cerca de 10 a cerca de 50 nucleotídeos ligada a um rótulo de éster de acridínio.

Esses e outros aspectos da presente invenção irão se tornar evidentes mediante referência à seguinte descrição detalhada e desenhos em anexo.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1 é uma representação esquemática do genoma do parvovírus B19 humano, revelando as várias regiões codificadoras do vírus. São revelados três fragmentos de PCR, um com aproximadamente 700 bp, correspondendo às posições de nucleotídeo 2936-3635 do genoma do parvovírus B19 descrito em Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936; um com aproximadamente 370 bp dentro do fragmento de 700 bp, correspondendo às posições de nucleotídeo 3073-3442 do genoma do parvovírus B19 descrito em Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936; e um com aproximadamente 214 bp

correspondendo às posições de nucleotídeo 4728-4941 do genoma do parvovírus B19 descrito em Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936.

Figuras 2A até 2U (ID. DE SEQ. N°s: 1-21) revelam seqüências de DNA de vários isolados de parvovírus B19 que incluem seqüências correspondendo às posições de nucleotídeo 2936-3635 do genoma do parvovírus B19 descrito em Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936 (o fragmento de 700 bp da Figura 1). Figura 2A (ID. DE SEQ. N°:1) é a seqüência correspondente do isolado CH47-26; Figura 2B (ID. DE SEQ. N°: 2) é a seqüência correspondente do isolado CH48-29; Figura 2C (ID. DE SEQ. N°: 3) é a seqüência correspondente do isolado CH33-2; Figura 2D (ID. DE SEQ. N°: 4) é a seqüência correspondente do isolado CH33-3; Figura 2E (ID. DE SEQ. N°:5) é a seqüência correspondente do isolado CH33-4; Figura 2F (ID. DE SEQ. N°: 6) é a seqüência correspondente do isolado CH42-7; Figura 2G (ID. DE SEQ. N°: 7) é a seqüência correspondente do isolado CH42-18; Figura 2H (ID. DE SEQ. N°: 8) é a seqüência correspondente do isolado CH42-19; Figura 21 (ID. DE SEQ. N°: 9) é a seqüência correspondente do isolado CH46-23; Figura 2J (ID. DE SEQ. N°: 10) é a seqüência correspondente do isolado CH1-1; Figura 2K (ID. DE SEQ. N°: 11) é a seqüência correspondente do isolado CH1-6; Figura 2L (ID. DE SEQ. N°: 12) é a seqüência correspondente do isolado CH2-8; Figura 2M (ID. DE SEQ. N°: 13) é a seqüência correspondente do isolado CH2-10; Figura 2N (ID. DE SEQ. N°: 14) é a seqüência correspondente do isolado CH2-11C; Figura 20 (ID. DE SEQ. N°: 15) é a seqüência correspondente do isolado CH5-13; Figura 2P (ID. DE SEQ. N°: 16) é a

seqüência correspondente do isolado CH7-22; Figura 2Q (ID. DE SEQ. N°: 17) é a seqüência correspondente do isolado CH13-27; Figura 2R (ID. DE SEQ. N°: 18) é a seqüência correspondente do isolado CH14-33; Figura 2S (ID. DE SEQ. N°: 19) é a seqüência correspondente do isolado CH62-2; Figura 2T (ID. DE SEQ. N°: 20) é a seqüência correspondente do isolado CH64-2; e Figura 2U (ID. DE SEQ. N°: 21) é a seqüência correspondente do isolado CH67-2.

Figuras 3A-3C (ID. DE SEQ. N°: 22) mostram uma seqüência para o fragmento de PCR de aproximadamente 4,7 kbp mostrado na Figura 1 do clone 2-B1 de parvovírus B19. A seqüência é um fragmento de 4677 nucleotídeos correspondendo às posições de nucleotídeo 217-4893 de Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936. A seqüência revelada contém a estrutura de leitura aberta de comprimento total de parvovírus B19 que codifica NS1, VP1 e VP2, mais seqüências adicionais não-traduzidas 5' e 3'.

Figuras 4A-4C (ID. DE SEQ. N°: 23) mostram uma seqüência para o fragmento de PCR de aproximadamente 4,7 kbp mostrado na Figura 1 do clone 2-B6 de parvovírus B19. A seqüência é um fragmento de 4677 nucleotídeos correspondendo às posições de nucleotídeo 217-4893 of Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936. A seqüência revelada contém a estrutura de leitura aberta de comprimento total de parvovírus B19 que codifica NS1, VP1 e VP2, mais seqüências adicionais não-traduzidas 5'e 3'.

Figuras 5A (ID. DE SEQ. N°: 24) e 5B (ID. DE SEQ. N°: 25) mostram as seqüências de nucleotídeo e proteína de NS1, respectivamente, do clone 2-B1 de parvovírus B19.

Figuras 6A (ID. DE SEQ. N°: 26) e 6B (ID. DE SEQ. N°:

27) mostram as seqüências de nucleotídeos e proteína VP1, respectivamente, do clone 2-B1 de parvovírus B19.

Figuras 7A (ID. DE SEQ. N°: 28) e 7B (ID. DE SEQ. N°: 29) mostram as seqüências de nucleotídeos e proteína VP2, respectivamente, do clone 2-B1 de parvovírus B19.

Figuras 8A (ID. DE SEQ. N°: 30) e 8B (ID. DE SEQ. N°:31) mostram as seqüências de nucleotídeo e proteína de NS1, respectivamente, do clone 2-B6 de parvovírus B19.

Figuras 9A (ID. DE SEQ. N°: 32) e 9B (ID. DE SEQ. N°: 33) mostram as seqüências de nucleotídeos e proteína VP1, respectivamente, do clone 2-B6 de parvovírus B19.

Figuras 10A (ID. DE SEQ. N°: 34) e 10B (ID. DE SEQ. N°: 35) mostram as seqüências de nucleotídeos e proteína VP2, respectivamente, do clone 2-B6 de parvovírus B19.

Figuras 11A até 11Z (ID. DE SEQ. N°^{s}: 62-87) revelam seqüências de DNA de vários isolados de parvovírus B19 que incluem seqüências correspondendo às posições de nucleotídeo 2936-3635 do genoma do parvovírus B19 descrito em Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936 (o fragmento de 700 bp da Figura 1). Figura 11A (ID. DE SEQ. N°: 62) é a seqüência correspondente do isolado CH80-1; Figura 11B (ID. DE SEQ. N°: 63) é a seqüência correspondente do isolado CH81-3; Figura 11C (ID. DE SEQ. N°: 64) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL1-4; Figura 11D (ID. DE SEQ. N°: 65) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL2-1; Figura 11E (ID. DE SEQ. N°: 66) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL3-1; Figura 11F (ID. DE SEQ. N°: 67) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL4-3; Figura 11G (ID. DE SEQ. N°: 68) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL5-2; Figura 11H (ID. DE

SEQ. N°: 69) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL6-2; Figura 11I (ID. DE SEQ. N°: 70) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL7-3; Figura 11J (ID. DE SEQ. N°:71) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL8-2; Figura 11K (ID. DE SEQ. N°: 72) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL9-1; Figura 11L (ID. DE SEQ. N°: 73) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL9-9; Figura 11M (ID. DE SEQ. N°: 74) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL10-2; Figura 11N (ID. DE SEQ. N°: 75) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL11-1; Figura 11O (ID. DE SEQ. N°: 76) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL12-1; Figura 11P (ID. DE SEQ. N°: 77) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL13-3; Figura 11Q (ID. DE SEQ. N°: 78) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL141; Figura 11R (ID. DE SEQ. N°: 79) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL15-3; Figura1 11S (ID. DE SEQ. N°: 80) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL16-2; Figura 11T (ID. DE SEQ. N°: 81) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL17-1; Figura 11U (ID. DE SEQ. N°: 82) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL18-1; Figura 11V (ID. DE SEQ. N°:83) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL19-1; Figura 11W (ID. DE SEQ. N°: 84) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL20-3; Figura 11X (ID. DE SEQ. N°: 85) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL21-3; Figura 11Y (ID. DE SEQ. N°: 86) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL22-11; Figura 11Z (ID. DE SEQ. N°: 87) é a seqüência correspondente do isolado B19SCL2-14.

Figura 12 (ID. DE SEQ. N°: 92) revela uma seqüência

exemplar da qual pode ser derivado um controle interno (IC) para captura e amplificação de alvo.

Descrição detalhada da invenção

A prática da presente invenção irá empregar, a menos que indicado de forma diferente, métodos convencionais de química, técnicas de DNA recombinante e virologia, dentro do conhecimento da técnica. Tais técnicas são complemente explicadas na literatura. Veja, por exemplo, *Fundamental Virology*, 2ª Edição, vols. I & II (B.N. Fields e D.M. Knipe, eds.); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., adição atual); Sambrook, *e cols.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Edição, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick e N. Kaplaneds., Academic Press, Inc.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984).

Deve-se observar que, como usado nessa especificação e reivindicações em anexo, a forma singular "um", "uma" e "o" inclui referentes plurais a menos que o conteúdo indique claramente de forma diferente. Dessa forma, por exemplo, referência a "um antígeno" inclui uma mistura de dois ou mais antígenos, e outros mais.

As seguintes abreviações de aminoácido são usadas através do texto:

Alanina: Ala (A)	Arginina: Arg (R)
Asparagina: Asn(N)	Ácido aspártico: Asp (D)
Cisteína: Cys (C)	Glutamina: Gln (Q)
Ácido Glutâmico: Glu (E)	Glicina: Gly (G)
Histidina: His (H)	Isoleucina: Ile(I)
Leucina: Leu (L)	Lisina: Lys (K)
Metionina: Met (M)	Fenilalanina: Phe (F)

Prolina: Pro (P)	Serina: Ser (S)
Treonina: Thr (T)	Triptofano: Trp (W)
Tirosina: Tyr (Y)	Valina: Val (V)

I. Definições

Na descrição da presente invenção, os seguintes termos serão empregados, e visam ser definido como indicado abaixo.

Os termos "polipeptídeo" e "proteína" se referem a um polímero de resíduos de aminoácidos e não estão limitados a um comprimento mínimo do produto. Dessa forma, peptídeos, oligopeptídeos, dímeros, multímeros, e outros mais, estão incluídos dentro da definição. Tanto proteínas de comprimento total quanto fragmentos destas estão englobados pela definição. Os termos também incluem modificações pós-expressão do polipeptídeo, por exemplo, glicosilação, acetilação, fosforilação e outros mais. Além disso, para fins da presente invenção, um "polipeptídeo" se refere a uma proteína que inclui modificações, tais como deleções, adições e substituições (geralmente de natureza conservadora), à seqüência nativa, desde que a proteína mantenha a atividade desejada. Essas modificações podem ser deliberadas, como através de mutagênese sítio-direcionada, ou podem ser acidentais, tal como através de mutações de hospedeiros que produzem as proteínas ou erros devido a amplificação por PCR.

Um polipeptídeo de parvovírus B19 é um polipeptídeo, como definido acima, derivado de uma proteína codificada pelo genoma de B19, tal como de proteínas não-estruturais, NS1 e NS2, bem como das proteínas que formam o capsídeo viral, VP1 (comprimento de aproximadamente 781 aminoácidos)

ou VP2 (comprimento de aproximadamente 554 aminoácidos). Seqüências representativas de NS1, VP1 e VP2 são reveladas nas Figuras5-10 neste. O polipeptídeo não necessita ser fisicamente derivado de parvovírus B19, mas pode ser produzido sinteticamente ou de forma recombinante. Além disso, o polipeptídeo pode ser derivado de qualquer uma das cepas e isolados de parvovírus B19. Inúmeras regiões conservadas e variáveis são conhecidas entre essas cepas e isolados e, em geral, as seqüências de aminoácidos de, por exemplo, epitopos derivados dessas regiões terão um alto grau de homologia de seqüência, por exemplo, homologia de seqüência de aminoácidos de mais do que 30%, preferentemente mais do que 40%, quando as duas seqüências estão alinhadas. Dessa forma, por exemplo, o termo polipeptídeo "VP1" se refere a VP1 nativo de qualquer uma das várias cepas e isolados de parvovírus B19. Os genótipos e seqüências completos para as proteínas acima de muitas cepas e isolados de parvovírus B19 são conhecidos. Veja, por exemplo, Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936; Gallinella *e cols.*, *J. Virol. Methods* (1993) 41: 203-211. Além disso, epitopos de parvovírus B19 derivados dessas regiões também são conhecidos. Veja, por exemplo, Patente U.S. No. 5.436.127; e Publicação Internacional No. WO 91/12269.

Os termos "análogo" e "muteína" se referem a derivados biologicamente ativos da molécula de referência, ou fragmentos de tais derivados, que retêm a atividade desejada, tal como imunorreatividade em ensaios diagnósticos. Em geral, o termo "análogo" se refere a compostos que têm uma seqüência nativa de polipeptídeo e

estrutura com uma ou mais adições, substituições (geralmente de natureza conservadora) e/ou deleções de aminoácido, em relação à molécula nativa, desde que as modificações não destruam a atividade imunogênica. O termo "muteína" se refere a peptídeos que têm um ou mais miméticos de peptídeo ("peptóides"), tais como aqueles descritos na Publicação Internacional No. WO 91/04282. Preferentemente, o análogo ou muteína tem pelo menos a mesma imunoatividade que a molécula nativa. Métodos para a produção de análogos de polipeptídeo e muteínas são conhecidos na técnica e são descritos posteriormente abaixo.

Análogos particularmente preferidos incluem substituições que têm natureza conservadora, ou seja, aquelas substituições que ocorrem dentro de uma família de aminoácidos que estão relacionados em suas cadeias laterais. Especificamente, aminoácidos são geralmente divididos em quatro famílias: (1) ácidos - aspartato e glutamato; (2) básicos - lisina, arginina, histidina; (3) não-polares - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano; e (4) polares não-carregados - glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Fenilalanina, triptofano, e tirosina são algumas vezes classificados como aminoácidos aromáticos. Por exemplo, é razoavelmente previsível que uma substituição isolada de leucina com isoleucina ou valina, um aspartato com um glutamato, uma treonina com uma serina, ou uma substituição conservadora similar de um aminoácido com um aminoácido estruturalmente relacionado, não terá um efeito importante na atividade biológica. Por exemplo, o

polipeptídeo de interesse pode incluir até cerca de 5-10 substituições de aminoácido conservadoras ou não-conservadoras, ou até mesmo cerca de 15-25 substituições de aminoácido conservadoras ou não-conservadoras, ou qualquer número inteiro entre 5-25, desde que a função desejada da molécula permaneça intacta. Aquele experiente na técnica pode prontamente determinar regiões da molécula de interesse que podem tolerar mudança por referência a gráficos de Hopp/Woods e Kyte-Doolittle, bem conhecidos na técnica.

Por "isolado" significa, quando se refere a um polipeptídeo, que a molécula indicada está separada e distinta do organismo como um todo com o qual a molécula é encontrada na natureza ou está presente na ausência substancial de outras macromoléculas biológicas do mesmo tipo. O termo "isolado" com relação a um polinucleotídeo é uma molécula de ácido nucléico desprovida, como um todo ou em parte, de seqüências normalmente associadas com ela na natureza; ou uma seqüência, como ela existe na natureza, mas tendo seqüências heterólogas em associação com ela; ou uma molécula separada do cromossomo.

Um polinucleotídeo "derivado de" ou "específico para" uma seqüência designada se refere a uma seqüência de polinucleotídeos que compreende uma seqüência contígua de aproximadamente pelo menos cerca de 6 nucleotídeos, preferentemente pelo menos cerca de 8 nucleotídeos, mais preferentemente pelo menos cerca de 10-12 nucleotídeos, e ainda mais preferentemente pelo menos cerca de 15-20 nucleotídeos correspondentes, ou seja, idênticos ou complementares a, uma região da seqüência de nucleotídeos

designada. O polinucleotídeo derivado não será necessariamente derivado fisicamente de uma seqüência de nucleotídeos de interesse, mas pode ser gerado de qualquer forma, incluindo, mas não limitado a, síntese química, replicação, transcrição reversa ou transcrição, que é baseada na informação fornecida pela seqüência de bases na região (s) da qual o polinucleotídeo é derivado. Como tal, ele pode representar tanto uma orientação senso ou anti-senso do polinucleotídeo original.

"Homologia" se refere ao percentual de similaridade entre dois polinucleotídeos ou duas porções de polipeptídeo. Dois DNAs, ou duas seqüências de polipeptídeos, são "substancialmente homólogas" entre si quando as seqüências exibem pelo menos cerca de 50%, preferentemente pelo menos cerca de 75%, mais preferentemente pelo menos cerca de 80%-85%, preferentemente pelo menos cerca de 90%, e mais preferentemente ainda pelo menos cerca de 95%-98% similaridade de seqüência ao longo de um comprimento definido das moléculas. Como aqui usado, substancialmente homóloga também se refere a seqüências que mostram identidade completa para a seqüência de polipeptídeos ou DNA especificada.

Em geral, "identidade" se refere a uma correspondência nucleotídeo-para-nucleotídeo ou aminoácido-para-aminoácido exata de duas seqüências de polinucleotídeos ou polipeptídeos, respectivamente. Percentual de identidade pode ser determinado por uma comparação direta da informação de seqüência entre duas moléculas alinhando-se as seqüências, contando-se o número exato de combinações

entre as duas seqüências alinhadas, dividindo-se pelo comprimento da seqüência mais curta, e multiplicando-se o resultado por 100.

Programas de computador prontamente disponíveis podem ser usados para auxiliar a análise de homologia e identidade, tal como ALIGN, Dayhoff, M.O. em *Atlas of Protein Sequence and Structure* M.O. Dayhoff ed., 5 Supl. 3: 353-358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta o algoritmo de homologia local de Smith e Waterman *Advances in Appl. Math.* 2: 482-489, 1981 para análise de peptídeo. Programas para a determinação de homologia de seqüência de nucleotídeos estão disponíveis no Wisconsin Sequence Analysis Package, Versão 8 (disponível por Genetics Computer Group, Madison, WI) por exemplo, os programas BESTFIT, FASTA e GAP, que também se baseiam no algoritmo de Smith e Waterman. Esses programas são prontamente utilizados com os parâmetros-padrão recomendados pelo fabricante e descritos no Wisconsin Sequence Analysis Package acima referido. Por exemplo, percentual de homologia de uma seqüência de nucleotídeos em particular para uma seqüência de referência pode ser determinado usando o algoritmo de homologia de Smith e Waterman com uma tabela-padrão de pontuação e uma penalidade de intervalo de seis posições de nucleotídeo.

Outro método de estabelecer percentual de homologia no contexto da presente invenção é o uso do pacote de programas com direitos autorais pela "University of Edinburgh", desenvolvido por John F. Collins e Shane S. Sturrok, e distribuído por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). Por essa suíte de pacotes o algoritmo de Smith

Waterman pode ser empregado quando os parâmetros-padrão forem usados para a tabela de pontuação (por exemplo, penalidade de intervalo aberto de 12, penalidade de extensão de intervalo de um, e um intervalo de seis). A partir dos dados gerados o valor de "Combinação" reflete "homologia de seqüência". Outros programas adequados para o cálculo do percentual de identidade ou similaridade entre seqüências são geralmente conhecidos na técnica, por exemplo, outro programa de alinhamento é BLAST, usado com parâmetros-padrão. Por exemplo, BLASTN e BLASTP podem ser usados usando os seguintes parâmetros-padrão: código genético = padrão; filtro = nenhum; padrão = ambos; valor de corte = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descrições = 50 seqüências; classificadas por = HIGH SCORE; Bases de dados = não-redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traduções GenBank CDS + proteína Swiss + Spupdate + PIR. Detalhes desses programas podem ser encontrados no seguinte endereço da internet: http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST.

Alternativamente, homologia pode ser determinada por hibridização de polinucleotídeos sob condições que formam duplas estáveis entre regiões homólogas, seguida por digestão com nuclease específica para filamento único (s), e determinação de tamanho dos fragmentos digeridos. Seqüências de DNA que são substancialmente homólogas podem ser identificadas em um experimento de hibridização Southern sob, por exemplo, condições restritas, como definido para aquele sistema em particular. A definição de condições apropriadas de hibridização está dentro do conhecimento da técnica. Veja, por exemplo, Sambrook e

cols., supra; DNA Cloning, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra.

"Operacionalmente ligado" se refere a um arranjo de elementos onde os componentes assim descritos estão configurados de forma a realizar sua função desejada. Dessa forma, um certo promotor operacionalmente ligado a uma seqüência de ácidos nucléicos é capaz de efetuar a transcrição, e no caso de uma seqüência codificadora, a expressão da seqüência codificadora quando os fatores de transcrição adequados, etc., estiverem presentes. O promotor não necessita ser contíguo com a seqüência de ácidos nucléicos, desde que ele funcione para dirigir a transcrição e/ou expressão desta. Dessa forma, por exemplo, seqüências intervenientes não-traduzidas embora transcritas podem estar presentes entre a seqüência promotora e a seqüência codificadora, assim como podem estar íntrons transcritos, e a seqüência promotora ainda pode ser considerada "operacionalmente ligada" à seqüência codificadora.

"Recombinante" como aqui usado para descrever uma molécula de ácido nucléico significa um polinucleotídeo de origem genômica, de cDNA, viral, semi-sintética, ou sintética que, em virtude de sua origem ou manipulação não está associado com todo ou uma porção do polinucleotídeo com o qual ele está associado na natureza. O termo "recombinante" como usado com relação a uma proteína ou polipeptídeo significa um polipeptídeo produzido por expressão de um polinucleotídeo recombinante. Em geral, o gene de interesse é clonado e então expresso em organismos transformados, como descrito posteriormente abaixo. O

organismo hospedeiro expressa o gene estranho para produzir a proteína sob condições de expressão.

Um "elemento de controle" se refere a uma seqüência de polinucleotídeos que auxilia na transcrição e/ou tradução de uma seqüência de nucleotídeos à qual ela está ligada. O termo inclui promotores, seqüências de terminação de transcrição, domínios reguladores acima, sinais de poliadenilação, regiões não-traduzidas, incluindo UTRs-5' e UTRs-3' e, quando apropriado, seqüências líderes e intensificadoras, que coletivamente permitem a transcrição e tradução de uma seqüência codificadora em uma célula hospedeira.

Um "promotor" como aqui usado é uma região reguladora capaz de se ligar a uma polimerase e iniciar transcrição de uma seqüência de nucleotídeos abaixo (direção 3') operacionalmente ligada a ele. Para as finalidades da presente invenção, uma seqüência promotora inclui o número mínimo de bases ou elementos necessários para iniciar transcrição de uma seqüência de interesse em níveis detectáveis acima dos níveis de fundo. Dentro da seqüência promotora está um sítio de iniciação de transcrição, bem como domínios de ligação de proteína (seqüências de consenso) responsáveis pela ligação de RNA ou DNA polimerase. Por exemplo, promotor pode ser uma seqüência de ácidos nucléicos que é reconhecida por uma RNA polimerase dependente de DNA ("transcriptase") como um sinal para se ligar ao ácido nucléico e iniciar a transcrição de RNA em um sítio específico. Para ligação, tais transcriptases geralmente requerem DNA que é de filamento duplo na porção que compreende a seqüência promotora e seu complemento; a

porção modelo (seqüência a ser transcrita) não necessita ser de filamento duplo. RNA polimerases dependentes de DNA individuais reconhecem várias seqüência promotoras diferentes o que pode variar de forma marcante sua eficiência na promoção de transcrição. Quando uma RNA polimerase se liga a uma seqüência promotora para iniciar transcrição, aquela seqüência promotora não é parte da seqüência transcrita. Dessa forma, os transcritos de RNA assim produzidos não irão incluir aquela seqüência.

Uma "seqüência de controle" dirige a transcrição" de uma seqüência de nucleotídeos quando RNA ou DNA polimerase irá se ligar à seqüência promotora e transcreve a seqüência adjacente.

Uma "DNA polimerase dependente de DNA" é uma enzima que sintetiza uma cópia de DNA complementar de um modelo de DNA. Exemplos são DNA polimerase I de *E. coli* e T7 DNA polimerase de bacteriófago. Todas as DNA polimerases dependentes de DNA requerem um iniciador complementar para iniciar a síntese. Sob condições adequadas, uma DNA polimerase dependente de DNA pode sintetizar uma cópia de DNA complementar de um modelo de RNA.

Uma "RNA polimerase dependente de DNA" ou uma "transcriptase" é uma enzima que sintetiza múltiplas cópias de RNA a partir de molécula de DNA de filamento duplo ou parcialmente duplo que tem uma (usualmente de filamento duplo) seqüência promotora. As Moléculas de RNA ("transcritos") são sintetizados na direção 5' para 3' iniciando em uma posição específica logo abaixo do promotor. Exemplos de transcriptases são a RNA polimerase dependente de DNA de *E. coli* e bacteriófagos T7, T3, e SP6.

Uma "DNA polimerase dependente de RNA" ou "transcriptase reversa" é uma enzima que sintetiza uma cópia de DNA complementar a partir de um Modelo de RNA. Todas as transcriptase reversas conhecidas também têm a habilidade de fazer uma cópia de DNA complementar a partir de um Modelo de DNA; dessa forma, elas são DNA polimerases dependentes tanto de DNA quanto de RNA. Um iniciador é necessário para iniciar a síntese com ambos os modelos, tanto de RNA quanto de DNA.

"RNAse H" é uma enzima que degrada a porção RNA porção de uma dupla RNA:DNA. Essas enzimas podem ser endonucleases ou exonucleases. A maioria das enzimas transcriptase reversa normalmente contém uma atividade de RNAse H em adição à sua atividade de polimerase. No entanto, outras fontes da RNAse H são disponíveis sem uma atividade associada de polimerase. A degradação pode resultar em separação de RNA de um complexo RNA:DNA. Alternativamente, a RNAse H pode simplesmente cortar o RNA em várias localizações de forma que porções do RNA se fundam ou permite que enzimas liberem porções do RNA.

Os termos "polinucleotídeo", "oligonucleotídeo", "ácido nucléico" e "molécula de ácido nucléico" são aqui usados para incluir uma forma polimérica de nucleotídeos de qualquer comprimento, sejam ribonucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos. Esse termo se refere somente à estrutura primária da molécula. Dessa forma, o termo inclui DNA de filamento triplo, duplo, ou único, bem como RNA de filamento triplo, duplo, ou único. Ele também inclui modificações, tais como por metilação e/ou por tamponamento, e formas não-modificadas do polinucleotídeo.

Mais particularmente, os termos "polinucleotídeo", "oligonucleotídeo", "ácido nucléico" e "molécula de ácido nucléico" incluem polidesoxirribonucleotídeos (contendo 2-desoxi-D-ribose), polirribonucleotídeos (contendo D-ribose), qualquer outro tipo de polinucleotídeo que seja uma base de N- ou C-glicosídeo de uma purina ou pirimidina, e outros polímeros contendo estruturas centrais não-nucleotídica, por exemplo, polímeros de poliamida (por exemplo, ácidos nucléicos de peptídeo (PNAs)) e polimorfolino (comercialmente disponível por Anti-Virais, Inc., Corvallis, Oregon, como Neugene), e outros polímeros sintéticos de ácido nucléico com especificidade de seqüência permitindo que os polímeros contenham nucleobases em uma configuração que permite pareamento de base e empilhamento de bases, tal como é encontrado em DNA e RNA. Não há distinção desejada em comprimento entre os termos "polinucleotídeo", "oligonucleotídeo" "ácido nucléico" e "molécula de ácido nucléico", e esses termos serão usados de forma intercambiável. Esses termos se referem somente à estrutura primária da molécula. Dessa forma, esses termos incluem, por exemplo, 3'-desoxi-2',5'-DNA, oligodesoxirribo nucleotídeo N3'P5' fosforamidatos, RNA 2'-O-alquil-substituído, DNA de filamento duplo e único, bem como RNA de filamento duplo e único, híbridos DNA:RNA, e híbridos entre PNAs e DNA ou RNA, e também incluem tipos conhecidos de modificações, por exemplo, rótulos que são conhecidos na técnica, metilação, tamponagem substituição de um ou mais dos nucleotídeos de ocorrência natural com um análogo, modificações internucleotídeo tais como, por exemplo, aquelas com ligações não-carregadas (por exemplo, metil

fosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), com ligações negativamente carregadas (por exemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), e com ligações positivamente carregadas (por exemplo, aminoalquil fosforamidatos, aminoalquilfosfotriésteres), aquelas contendo porções pendentes, tais como, por exemplo, proteínas (incluindo nucleases, toxinas, anticorpos, peptídeos sinalizadores, poli-L-lisina, etc.), aquelas com separadores (por exemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquelas contendo quelantes (por exemplo, metais, metais radioativos, boro, metais oxidativos, etc.), aquelas contendo agentes promotores de alquilação, aquelas com ligações modificadas (por exemplo, ácidos nucléicos alfa anoméricos, etc.), bem como formas não-modificadas do polinucleotídeo ou oligonucleotídeo. Em particular, DNA é ácido desoxirribonucléico.

Como aqui usado, o termo "região-alvo de ácido nucléico" ou "ácido nucléico-alvo" significa uma molécula de ácido nucléico com uma "seqüência-alvo" a ser amplificada. O ácido nucléico-alvo pode ser de filamento único ou duplo e pode incluir outras seqüências além da seqüência-alvo, que podem não ser amplificadas. O termo "seqüência-alvo" se refere à seqüência de nucleotídeos em particular do ácido nucléico-alvo que deve ser amplificado. A seqüência-alvo pode incluir uma região marcadora de hibridização contida dentro da molécula-alvo com a qual um marcador irá formar um híbrido estável sob condições desejadas. A "seqüência-alvo" pode também incluir as seqüências de formação de complexo com as quais os iniciadores de oligonucleotídeo formam complexo e ser

estendida usando a seqüência-alvo como um modelo. Quando o ácido nucléico-alvo é originalmente de filamento único, o termo "seqüência-alvo" também se refere à seqüência complementar à "seqüência-alvo" como presente no ácido nucléico-alvo. Se o "ácido nucléico-alvo" é originalmente de filamento duplo, o termo "seqüência-alvo" se refere tanto aos filamentos mais (+) quanto aos filamentos menos (-).

O termo "iniciador" ou "oligonucleotídeo iniciador" como aqui usado, se refere a um oligonucleotídeo que atua para iniciar a síntese de um filamento de DNA complementar quando colocado sob condições nas quais é induzida a síntese de um produto de extensão de iniciador, ou seja, na presença de nucleotídeos e de um agente de indução de polimerização tal como uma DNA ou RNA polimerase e em temperatura, pH, concentração de metal, e concentração de sal adequados. O iniciador é preferentemente de filamento único para eficiência máxima na amplificação, mas pode alternativamente ser de filamento duplo. Se de filamento duplo, o iniciador primeiro é tratado para separar seus filamentos antes de ser usado para preparar produtos de extensão. Essa etapa de desnaturação é efetuada tipicamente por aquecimento, mas pode alternativamente ser realizada usando substância lacalina, seguida por neutralização. Dessa forma, um "iniciador" é complementar a um modelo, e forma complexos por ligação de hidrogênio ou hibridização com o modelo para gerar um complexo iniciador/modelo para iniciação de síntese por uma polimerase, que é estendida pela adição de bases ligadas de forma covalente ligadas em sua extremidade 3' complementar ao modelo no processo de

síntese de DNA.

Como aqui usado, o termo "marcador" ou "marcador de oligonucleotídeo" se refere a uma estrutura composta de um polinucleotídeo, como definido acima, que contém uma seqüência de ácidos nucléicos complementar a uma seqüência de ácidos nucléicos presente no analisado de ácido nucléico-alvo. As regiões de polinucleotídeo de marcadores podem ser compostas de DNA, e/ou RNA, e/ou análogos sintéticos de nucleotídeo. Quando um "marcador de oligonucleotídeo" deve ser usado em um ensaio de 5' nuclease, tal como a técnica TaqMan™, o marcador irá conter pelo menos uma substância fluorescente e pelo menos um extintor que é digerido pela atividade de 5' endonuclease de uma polimerase usada na reação a fim de detectar quaisquer seqüências-alvo de oligonucleotídeos amplificadas. Nesse contexto, o marcador de oligonucleotídeo terá um número suficiente de ligações de fosfodiéster adjacentes à sua extremidade 5' de forma que a atividade de 5' a 3' nuclease empregada possa degradar suficientemente o marcador ligado para separar as substâncias fluorescentes e extintores. Quando um marcador de oligonucleotídeo é usado na técnica TMA, ele será adequadamente rotulado, como descrito abaixo.

Será observado que as seqüências de hibridização não necessitam ter uma complementaridade perfeita para fornecerem híbridos estáveis. Em muitas situações, serão formados híbridos estáveis quando menos do que cerca de 10% das bases não combinam, ignorando alça de quatro ou mais nucleotídeos. Conseqüentemente, como aqui usado o termo "complementar" se refere a um oligonucleotídeo que forma

uma dupla estável com seu "complemento" sob condições de ensaio, geralmente quando há cerca de 90% ou mais de homologia.

Os termos "hibridiza" e "hibridização" se referem à formação de complexos entre seqüências de nucleotídeos que são suficientemente complementares para formarem complexos por meio de pareamento de base de Watson-Crick. Quando um iniciador "hibridiza" com alvo (modelo), tais complexos (ou híbridos) são suficientemente estáveis para servirem à função de preparação necessária, por exemplo, pela DNA polimerase para iniciar síntese de DNA.

Como aqui usado, o termo "par de ligação" se refere à primeira e segunda moléculas que se ligam especificamente entre elas, tais como pares complementares de polinucleotídeo capazes de formar duplas de ácido nucléico. "Ligação específica" do primeiro membro do par de ligação ao segundo membro do par de ligação em uma amostra é evidenciada pela ligação do primeiro membro ao segundo membro, ou vice-versa, com maior afinidade e especificidade do que outros componentes na amostra. A ligação entre os membros do par de ligação é tipicamente não-covalente. A menos que o contexto indique claramente de forma diferente, os termos "molécula de afinidade" e "analisado-alvo" são aqui usados para se referirem ao primeiro e segundo membros de um par de ligação, respectivamente.

Os termos "molécula de ligação específica" e "molécula de afinidade" são aqui usados de forma intercambiável e se referem a uma molécula que irá se ligar seletivamente, através de meios químicos ou físicos, a uma substância detectável presente em uma amostra. Por "ligar

seletivamente" significa que a molécula se liga preferentemente ao alvo de interesse ou se liga com maior afinidade para o alvo do que para outras moléculas. Por exemplo, uma molécula de DNA irá se ligar a uma seqüência substancialmente complementar e não a seqüências não-relacionadas.

A "temperatura de fusão" ou "T_m" de um DNA de filamento duplo é definida como a temperatura na qual metade da estrutura helicoidal do DNA é perdida devido ao aquecimento ou outra dissociação da ligação de hidrogênio entre pares de base, por exemplo, por tratamento ácido ou alcalino, ou outros mais. A T_m de uma molécula de DNA depende de seu comprimento e de sua composição de base. Moléculas de DNA ricas em pares de base GC têm maior T_m do que aquelas que têm uma abundância de pares de base AT. Filamentos complementares separados de DNA se re-associam espontaneamente ou se enrijecem para formarem dupla de DNA quando a temperatura diminuída abaixo da T_m. A maior taxa de hibridização de ácido nucléico ocorre aproximadamente 25°C abaixo da T_m. A T_m pode ser estimada usando o seguinte relacionamento: T_m = 69,3 + 0,41 %(GC) (Marmur *e cols.* (1962) *J. Mol. Biol.* 5: 109-118).

Como aqui usado, uma "amostra biológica" se refere a uma amostra de tecido ou fluido isolada de um indivíduo, que usualmente inclui anticorpos produzidos pelo indivíduo. Amostras típicas que incluem tais anticorpos são conhecidas na técnica e incluem, mas não se limitam a, sangue, plasma, soro, material fecal, urina, medula óssea, bile, fluido espinhal, fluido linfático, amostras da pele, secreções da pele, do trato respiratório, intestinal, e geniturinário,

lágrimas, saliva, leite, células sangüíneas, órgãos, biópsias e também amostras de constituintes de cultura de célula *in vitro* incluindo, mas não se limitando a, meio condicionado que resulta do crescimento de células e tecidos em meio de cultura, por exemplo, células recombinantes, e componentes de célula.

Como aqui usado, os termos "rótulo" e "rótulo detectável" se referem a uma molécula capaz de detecção, incluindo, mas não limitado a, isótopos radioativos, substâncias fluorescentes, substâncias quimioluminescentes, cromóforos, enzimas, substratos de enzima, co-fatores de enzima, inibidores de enzima, cromóforos, corantes, íons metálicos, soluções de metal, ligantes (por exemplo, biotina, avidina, estreptavidina ou haptenos) e outros mais. O termo "fluorescer" se refere a uma substância ou a uma porção desta que é capaz de exibir fluorescência na faixa detectável.

II. Modos de Realizar a Invenção

Antes de descrever a presente invenção em detalhe, deve-se entender que essa invenção não está limitada às formulações ou parâmetros de processo em particular uma vez que estes podem, evidentemente, variar. Deve-se entender também que a terminologia aqui usada tem somente a finalidade de descrever modalidades particulares da invenção, e não visa ser limitante.

Embora inúmeras composições e métodos similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática da presente invenção, os materiais e métodos preferidos são aqui descritos.

Como observado acima, a presente invenção é baseada na

descoberta de iniciadores e marcadores inéditos e métodos diagnósticos para a detecção precisa de infecção por parvovírus B19 em uma amostra biológica. Os métodos se baseiam em técnicas sensíveis baseadas na detecção de ácido nucléico que permitem a identificação de seqüências-alvo de ácido nucléico de parvovírus B19 em amostras contendo pequenas quantidades de vírus.

Em particular, os inventores desta caracterizaram regiões dentro do genoma do parvovírus B19 que são alvos desejáveis para testes diagnósticos. Iniciadores e marcadores derivados dessas regiões são extremamente úteis para detecção de infecção por parvovírus B19 em amostras biológicas.

Iniciadores e marcadores de parvovírus B19 descritos acima são usados em ensaios baseados em ácido nucléico para a detecção de infecção humana por parvovírus B19 em amostras biológicas.

Em particular, iniciadores e marcadores para uso nesses ensaios são preferentemente derivados do fragmento de aproximadamente 4,7 kb do genoma do parvovírus B19 correspondendo às posições de nucleotídeo 217-4678 de Shade *e cols., J. Virol.* (1986) 58: 921-936. As seqüências de nucleotídeos dessa região de dois isolados diferentes de parvovírus B19 são reveladas nas Figuras 3A-3C e 4A-4C desta. Como explicado acima, esse fragmento contém as regiões codificadoras NS1, VP1 e VP2.

Iniciadores e marcadores particularmente preferidos para uso com os presentes ensaios são designados de regiões altamente conservadas do genoma do parvovírus B19 para permitir a detecção de infecção por parvovírus B19 causada

por vários isolados. Como aqui descrito, a região altamente conservada do genoma do parvovírus B19 é encontrada dentro da região de 700 bp que se estende das posições de nucleotídeo 2936-3635, numeradas em relação ao genoma do parvovírus B19 descrito em Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936. Essa região é encontrada dentro da região VP1 do genoma. A seqüência dessa região de 21 isolados diferentes de parvovírus B19 é aqui mostrada Figuras 2A-2U. As seqüências de um adicional de 26 isolados são mostradas nas Figuras 11A-11Z desta. Uma comparação dessas seqüências mostra que essa região exibe de cerca de 98% a 99,5% de homologia de seqüência de isolado para isolado, tornando-a uma seqüência-alvo altamente desejável. Também é desejável para o projeto de iniciadores e marcadores a região de 370 bp encontrada dentro de VP1 que se estende aproximadamente das posições de nucleotídeo 3073-3442, numeradas em relação a Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936, bem como o fragmento de 214 bp revelado na Figura 1 que ocorre dentro da porção 3' do fragmento de 4,7 kb e se estende das posições de nucleotídeo 4728-4941, numeradas em relação a Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936.

As regiões de 4,7 kbp, 700 bp e 370 bp são prontamente obtidas de isolados adicionais usando porções da seqüência de parvovírus de B19 encontrada dentro dessas regiões particulares como iniciadores em reações de PCR tais como aquelas aqui descritas, bem como nas Patentes U.S. Nos. 4.683.195, 4.683.202 e 4.889.818, e baseado nas seqüências aqui fornecidas. Outro método de obtenção de seqüências de nucleotídeos com as seqüências desejadas é por enrijecimento de conjuntos complementares de

oligonucleotídeos sintéticos superpostos produzidos em um sintetizador de polinucleotídeo automatizado convencional, seguido por ligação com uma DNA ligase apropriada e amplificação da seqüência de nucleotídeos ligada por meio de PCR. Veja, por exemplo, Jayaraman e *cols.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4084-4088. Uma vez que as seqüências tenham sido preparadas ou isoladas, elas podem ser clonadas em qualquer vetor ou replicon adequado. Numerosos vetores de clonagem são conhecidos por aqueles experientes na técnica, e a seleção de um vetor de clonagem apropriado é uma questão de escolha. Vetores adequados incluem, mas não estão limitados a, plasmídeos, fagos, transposons, cosmídeos, cromossomos ou vírus que sejam capazes de replicação quando associados com elementos de controle apropriados.

Clones recombinantes são imediatamente identificados por análise de enzima de restrição e eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose, usando técnicas bem conhecidas na técnica, e descritas nos Exemplos abaixo.

Iniciadores e marcadores para uso nos ensaios nesta são derivados dessas seqüências e são prontamente sintetizados por técnicas-padrão, por exemplo, síntese em fase sólida por meio de química de fosforamidita, como revelados nas Patentes U.S. Nos. 4.458.066 e 4.415.732; Beaucage e *cols.* (1992) *Tetrahedron* 48: 2223-2311; e Applied Biosystems User Bulletin No. 13 (1° de abril de 1987). Outros métodos de síntese química incluem, por exemplo, o método de fosfotriéster descrito por Narang e *cols.*, *Meth. Enzymol.* (1979) 68: 90 e o método de fosfodiéster revelado por Brown e *cols.*, *Meth. Enzymol.*

(1979) 68: 109. Poli (A) ou poli (C), ou outras extensões de nucleotídeo não-complementares podem ser incorporadas em marcadores usando esses mesmos métodos. Extensões de óxido de hexaetileno podem ser acopladas a marcadores por métodos conhecidos na técnica. Cload *e cols.* (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113: 6324-6326; Patente U.S. No. 4.914.210 para Levenson *e cols.*; Durand *e cols.* (1990) *Nucleic Acids Res.* 18: 6353-6359; e Horn *e cols.* (1986) *Tet. Lett.* 27: 4705-4708. Tipicamente, as seqüências iniciadoras estão na faixa de entre 10-75 nucleotídeos de comprimento, tal como 15-60, 20-40 e assim por diante, mais tipicamente na faixa de entre 18-40 nucleotídeos de comprimento, e qualquer comprimento entre as faixas estabelecidas. O marcador típico está na faixa entre 10-50 nucleotídeos de comprimento, tal como 15-40, 18-30, e assim por diante, e qualquer comprimento entre as faixas estabelecidas.

Além disso, os marcadores podem ser acoplados a rótulos para detecção. Há várias formas conhecidas para a derivação de oligonucleotídeos com funcionalidades reativas que permitem a adição de um rótulo. Por exemplo, várias abordagens estão disponíveis para marcadores biotinilados de forma que rótulos radioativos, fluorescentes, quimioluminescente, enzimáticos, ou eletrodensos possam ser aderidos por meio de avidina. Veja, por exemplo, Broken *e cols.*, *Nucl. Acids Res.* (1978) 5: 363-384 que revela o uso de rótulos de ferritina-avidina-biotina; e Chollet *e cols.* *Nucl. Acids Res.* (1985) 13: 1529-1541 que revela biotinilação dos terminais 5' de oligonucleotídeos por meio de um braço ligante de aminoalquilfosforamida. Vários métodos também estão disponíveis para a síntese de

oligonucleotídeos amino-derivados que são rapidamente rotulados por compostos fluorescentes ou de outros tipos de compostos derivados por grupos amino-reativos, tais como isotiocianato, N-hidroxisuccinimida, ou outros mais, veja, por exemplo, Connolly (1987) *Nucl. Acids Res.* 15: 3131-3139, Gibson *e cols.* (1987) *Nucl. Acids Res.* 15: 6455-6467 e Patente U.S. No. 4.605.735 para Miyoshi *e cols.* Também estão disponíveis métodos para a síntese de oligonucleotídeos sulfidril-derivados que podem reagir com rótulos específicos para tiol, veja, por exemplo, Patente U.S. No. 4.757.141 para Fung *e cols.*, Connolly *e cols.* (1985) *Nucl. Acids Res.* 13: 4485-4502 e Spoat *e cols.* (1987) *Nucl. Acids Res.* 15: 4837-4848. Uma revisão abrangente de metodologias para a rotulagem de fragmentos de DNA é fornecida em Matthews *e cols.*, *Anal. Biochem.* (1988) 169: 1-25.

Por exemplo, marcadores podem ser rotulados de forma fluorescente pela ligação de uma molécula fluorescente ao terminal não-ligante do marcador. Um guia para a seleção de rótulos fluorescentes apropriados pode ser pode ser encontrado em Smith *e cols.*, *Meth.Enzymol.* (1987) 155: 260-301; Karger *e cols.*, *Nucl. Acids Res.* (1991) 19: 4955-4962; Haugland (1989) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Rótulos fluorescentes preferidos incluem fluoresceína e derivados desta, tal como revelado na Patente U.S. No. 4.318.846 e Lee *e cols.*, *Cytometry* (1989) 10:151-164, e 6-FAM, JOE, TAMRA, ROX, HEX-1, HEX-2, ZOE, TET-1 ou NAN-2, e outros mais.

Adicionalmente, marcadores podem ser rotulados com um

éster de acridínio (AE) usando as técnicas descritas abaixo. Tecnologias atuais permitem que o rótulo de AE seja colocado em qualquer localização dentro do marcador. Veja, por exemplo, Nelson *e cols.* (1995) "Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence" em *Nonisotopic Probing, Blotting and Sequencing*, Kricka L.J. (ed) Academic Press, San Diego, CA; Nelson *e cols.* (1994) "Application of the Hybridization Protection Assay (HPA) to PCR" em *The Polymerase Chain Reaction*, Mullis *e cols.* (eds.) Birkhauser, Boston, MA; Weeks *e cols.*, *Clin. Chem.* (1983) 29: 1474-1479; Berry *e cols.*, *Clin. Chem.* (1988) 34: 2087-2090. Uma molécula de AE pode ser diretamente anexada ao marcador usando química de braço ligante não baseado em nucleotídeo que permite a colocação do rótulo em qualquer localização dentro do marcador. Veja, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.585.481 e 5.185.439.

Em certas modalidades, um controle interno (IC) ou um padrão interno é adicionado para servir como um controle para a captura e amplificação do alvo. Preferentemente, o IC inclui uma seqüência que difere da seqüência-alvo, é capaz de hibridizar com as seqüências marcadoras usadas para a separação dos oligonucleotídeos específicos para o organismo da amostra, e é capaz de amplificação. O uso do IC permite o controle do processo de separação, do processo de amplificação, e do sistema de detecção, e permite o monitoramento da performance do ensaio e quantificação para a amostra (s). Uma seqüência representativa da qual o IC pode ser obtido é mostrada na Figura 12. O IC pode ser incluído em qualquer ponto adequado, por exemplo, no tampão de lise. Em uma modalidade, o IC compreende M13 ssDNA

contendo uma seqüência de nucleotídeos de um parvovírus B19 e uma seqüência exclusiva que hibridiza com o marcador, por exemplo, compreendendo seqüências da região VP1, onde uma seqüência-alvo é modificada pela substituição ou deleção de 5-20 bases ou mais, preferentemente 5-15 bases, tais como 5, 10 ou 15, bases ou qualquer número entre essas faixas. As bases substituídas ou deletadas preferentemente ocorrem sobre todo o comprimento da seqüência-alvo de forma que somente 2 ou 3 seqüências consecutivas seja substituídas. Dessa forma, por exemplo, se a seqüência-alvo for CTACTTGCTGCGGGAGAAAAACACCT (ID. DE SEQ. N°: 91), então a seqüência pode ser substituída com, por exemplo, AGCTAGACCTGCATGTCACTG (ID. DE SEQ. N°: 90) no IC.

O suporte sólido pode adicionalmente incluir marcadores específicos para o padrão interno (marcador de IC), facilitando assim a captura quando se usa o marcador de IC. O marcador de IC pode opcionalmente ser acoplado com um rótulo detectável que é diferente do rótulo detectável para a seqüência-alvo. Em modalidades onde o rótulo detectável é um fluoróforo, o IC pode ser quantificado de forma espectrofotométrica e pode estudos de limite de detecção. Tipicamente, o número de cópia do IC que não interfere com a detecção-alvo é determinado pela titulação do IC com um IU fixo de alvo, preferentemente na extremidade inferior, e uma curva-padrão é gerada pela diluição de uma amostra de IC internacionalmente aceito. Para quantificação de parvovírus B19, um painel de oito membros de 8000 IU - 125 IU pode ser usado.

Em outra modalidade, um IC, como aqui descrito, é combinado com RNA isolado da amostra de acordo com

técnicas-padrão conhecidas por aqueles experientes na técnica, e aqui descritas. O RNA é então transcrito de forma reversa usando uma transcriptase reversa para fornecer DNA de cópia. As seqüências de cDNA podem opcionalmente ser amplificadas (por exemplo, por PCR) usando iniciadores rotulados. Os produtos de amplificação são separados, tipicamente por eletroforese, e a quantidade de radioatividade (proporcional à quantidade de produto amplificado) é determinada. A quantidade de mRNA na amostra é então calculada por comparação com o sinal produzido pelos padrões conhecidos.

Os iniciadores e marcadores acima descritos podem ser usados em técnicas baseadas na reação em cadeia de polimerase (PCR) para detectar infecção por parvovírus B19 em amostras biológicas. PCR é uma técnica para amplificação de uma seqüência-alvo de ácidos nucléicos desejada contida em uma molécula de ácido nucléico ou mistura de moléculas. Em PCR, um par de iniciadores é empregado em excesso para hibridizar para os filamentos complementares do ácido nucléico-alvo. Os iniciadores são cada um estendido por uma polimerase usando o ácido nucléico-alvo como um modelo. Os produtos de extensão se tornam eles mesmos seqüências-alvo após dissociação do filamento-alvo original. Novos iniciadores são então hibridizados e estendidos por uma polimerase, e o ciclo pe repetido para aumentar geometricamente o número de moléculas de seqüência-alvo. O método de PCR para amplificação seqüências-alvo de ácido nucléico em uma amostra é bem conhecido na técnica e foi descrito em, por exemplo, Innis *e cols.* (eds.) *PCR Protocols* (Academic Press, NY 1990); Taylor (1991)

Polymerase chain reaction: basic principles and automation, in PCR: A Practical Approach, McPherson *e cols.* (eds.) IRL Press, Oxford; Saiki *e cols.* (1986) *Nature* 324: 163; bem como nas Patentes U.S. Nos. 4.683.195, 4.683.202 e 4.889.818.

Em particular, PCR usa iniciadores de oligonucleotídeo relativamente curtos que flanqueiam a seqüência-alvo de nucleotídeos a ser amplificada, orientado de tal forma que suas extremidades 3' fiam diante uma da outra, cada iniciador se estendendo em direção ao outro. A amostra de polinucleotídeo é extraída e desnaturada, preferentemente por aquecimento, e hibridizada com primeiro e segundo iniciadores que estão presentes em excesso molar. A polimerização é catalisada na presença dos quatro desoxirribonucleotídeo trifosfatos (dNTPs - dATP, dGTP, dCTP e dTTP) usando um agente de polimerização de polinucleotídeo dependente de iniciador e de modelo, tal como qualquer enzima capaz de produzir produtos de extensão de iniciador, por exemplo, DNA polimerase I de *E. coli*, fragmento de Klenow de DNA polimerase I, T4 DNA polimerase, DNA polimerases termoestáveis isoladas de *Thermus aquaticus* (Taq), disponíveis a partir de várias fontes (por exemplo, Perkin Elmer), *Thermus thermophilus* (United States Biochemicals), *Bacillus stereothermophilus* (Bio-Rad), ou *Thermococcus litoralis* (polimerase "Vent", New England Biolabs). Isso resulta em dois "produtos longos" que contêm os respectivos iniciadores em suas extremidades 5' ligados de forma covalente aos complementos recentemente sintetizados dos filamentos originais. A mistura de reação é então retornada às condições de polimerização, por

exemplo, pela diminuição da temperatura, inativação do agente de desnaturação, ou adição de mais polimerase, e um segundo ciclo é iniciado. O segundo ciclo fornece os dois filamentos originais, os dois produtos longos do primeiro ciclo, dois novos produtos longos replicados dos filamentos originais, e dois "produtos curtos" replicados dos produtos longos. Os produtos curtos têm a seqüência da seqüência-alvo com um iniciador em cada extremidade. Em cada ciclo adicional, dois produtos longos adicionais são produzidos, e um número de produtos curtos igual ao número de produtos longos e curtos que permanecem na extremidade do ciclo prévio. Dessa forma, o número de produtos curtos contendo a seqüência-alvo cresce exponencialmente com cada ciclo. Preferentemente, PCR é realizada com um ciclador térmico comercialmente disponível por, por exemplo, Perkin Elmer.

RNAs podem ser amplificados pela transcrição reversa do mRNA em cDNA, e então realização de PCR (RT-PCR), como descrito acima. Alternativamente, uma única enzima pode ser usada para ambas as etapas como descrito na Patente U.S. No. 5.322.770. mRNA também pode ser transcrito de forma reversa em cDNA, seguido por reação em cadeia de ligase de intervalo assimétrico (RT-AGLCR) como descrito por Marshall *e cols.* (1994) *PCR Meth. App.* 4: 80-84.

O ensaio fluorogênico de 5' nuclease, conhecido como o ensaio TaqMan™ (Perkin-Elmer), é um poderoso e versátil sistema de detecção baseado em PCR para alvos de ácido nucléico. Dessa forma, iniciadores e marcadores derivados de regiões do genoma do parvovírus B19 aqui descritos, podem ser usados em análises TaqMan™ para detectar a presença de infecção em uma amostra biológica. A análise é

realizada em conjunto com ciclagem térmica monitorando-se a geração de sinais de fluorescência. O sistema de ensaio dispensa a necessidade de análise eletroforética em gel, e tem a capacidade de gerar dados quantitativos que permitem a determinação de números de cópia de alvo.

O ensaio fluorogênico de 5' nuclease é realizado convenientemente usando, por exemplo, AmpliTaq Gold™ DNA polimerase, que tem atividade endógena de 5' nuclease, para digerir um marcador de oligonucleotídeo interno rotulado tanto com um corante relator fluorescente como com um extintor (veja, Holland *e cols.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88: 7276-7280; e Lee *e cols.*, *Nucl. Acids Res.* (1993) 21: 3761-3766). Os resultados do ensaio são detectados pela medição das mudanças em fluorescência que ocorrem durante o ciclo de amplificação a medida em que o marcador fluorescente é digerido, desacoplando os rótulos do corante e extintor e causando um aumento no sinal fluorescente que é proporcional à amplificação de DNA-alvo.

Os produtos de amplificação podem ser detectados em solução ou usando suportes sólidos. Nesse método, o marcador TaqMan™ é designado para hibridizar para uma seqüência-alvo dentro do produto de PCR desejado. A extremidade 5' do marcador TaqMan™ contém um corante relator fluorescente. A extremidade 3' do marcador é bloqueada para evitar a extensão do marcador e contém um corante que irá extinguir a fluorescência do fluoróforo 5'. Durante amplificação subseqüente, o rótulo fluorescente 5' é retirado por clivagem se uma polimerase com atividade de 5' exonuclease estiver presente na reação. A excisão do fluoróforo 5' resulta em um aumento na fluorescência que

pode ser detectado.

Em particular, o marcador de oligonucleotídeo é construído de forma que o marcador existe em pelo menos uma conformação de filamento único quando não-hibridizado onde a molécula extintora estiver próxima o bastante da molécula relatora para extinguir a fluorescência da molécula relatora. O marcador de oligonucleotídeo também existe em pelo menos uma conformação quando hibridizado para um polinucleotídeo-alvo de forma que a molécula extintora não esteja posicionada próxima o bastante da molécula relatora para extinguir a fluorescência da molécula relatora. Adotando-se essas conformações hibridizadas e não-hibridizadas, a molécula relatora e molécula extintora no marcador exibem intensidades diferentes de sinal de fluorescência quando o marcador está hibridizado e não-hibridizado. Como resultado, é possível determinar se o marcador está hibridizado ou não-hibridizado com base em uma mudança na intensidade de fluorescência da molécula relatora, da molécula extintora, ou uma combinação destas. Em adição, pelo fato do marcador poder ser designado de forma que a molécula extintora extingue a molécula relatora quando o marcador está não-hibridizado, o marcador pode ser designado de forma que a molécula relatora exibe fluorescência limitada, a menos que o marcador esteja tanto hibridizado como digerido.

Conseqüentemente, a presente invenção se relaciona a métodos para amplificação de uma seqüência-alvo de nucleotídeos de parvovírus B19 usando um ácido nucléico polimerase que tem atividade de 5' a 3' nuclease, um ou mais iniciadores capazes de hibridizar para a seqüência-

alvo de B19, e um marcador de oligonucleotídeo capaz de hibridizar para a seqüência-alvo de B19 3' em relação ao iniciador. Durante amplificação, a polimerase digere o marcador de oligonucleotídeo quando ele está hibridizado para a seqüência-alvo, separando, dessa forma, a molécula relatora da molécula extintora. A medida em que a amplificação é conduzida, a fluorescência da molécula relatora é monitorada, com a fluorescência que corresponde à ocorrência de amplificação de ácido nucléico. A molécula relatora é preferentemente um corante de fluoresceína e a molécula extintora é preferentemente um corante de rodamina.

Embora o comprimento dos iniciadores e marcadores possa variar, as seqüências marcadoras são selecionadas de forma que elas tenham uma temperatura de fusão mais baixa do que as seqüências iniciadoras. essa forma, as seqüências iniciadoras são geralmente mais longas do que as seqüências marcadoras. Tipicamente, as seqüências iniciadoras estão na faixa de entre 10-75 nucleotídeos de comprimento, mais tipicamente na faixa de 20-45. O marcador típico está na faixa de entre 10-50 nucleotídeos de comprimento, mais tipicamente 15-40 nucleotídeos de comprimento.

Se for usado um suporte sólido, o marcador de oligonucleotídeo pode ser anexado ao suporte sólido de várias maneiras. Por exemplo, o marcador pode ser anexado ao suporte sólido por adesão do nucleotídeo terminal 3' ou 5' do marcador ao suporte sólido. Mais preferentemente, o marcador é anexado ao suporte sólido por um ligante que serve para distanciar o marcador do suporte sólido. O ligante usualmente tem comprimento de pelo menos 1530

átomos, mais preferentemente comprimento de pelo menos 15-50 átomos. O comprimento necessário do ligante irá depender do suporte sólido particular usado. Por exemplo, um ligante de seis átomos é geralmente suficiente quando é usado poliestireno de alta entrecruzado é usado como o suporte sólido.

Uma ampla variedade de ligantes é conhecida na técnica que podem ser usados para anexar o marcador de oligonucleotídeo ao suporte sólido. O ligante pode ser formado de qualquer composto que não interfira significativamente com a hibridização da seqüência-alvo para o marcador aderido ao suporte sólido. O ligante pode ser formado de um oligonucleotídeo homopolimérico que pode ser rapidamente adicionado ao ligante por síntese automatizada. Alternativamente, polímeros tais como polietileno glicol funcionalizado pode ser usado como o ligante. Tais polímeros são preferidos em relação aos oligonucleotídeos homopoliméricos porque eles não interferem significativamente com a hibridização de marcador para o oligonucleotídeo-alvo. Polietileno glicol é particularmente preferido.

As ligações entre o suporte sólido, o ligante e o marcador são preferentemente não clivadas durante a remoção de grupos de proteção de base sob condições básicas em alta temperatura. Exemplos de ligações preferidas incluem ligações de carbamato e amida.

Exemplos de tipos preferidos de suportes sólidos para imobilização do marcador de oligonucleotídeo incluem vidro poroso controlado, placas de vidro, poliestireno, glóbulos de poliestireno cobertos por avidina, celulose, náilon, gel

de acrilamida e dextrana ativada.

Para uma descrição detalhada do ensaio TaqMan™, reagentes e condições para uso nesta, veja, por exemplo, Holland e *cols.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1991) 88: 7276-7280; Patentes U.S. Nos. 5.538.848, 5.723.591, e 5.876.930.

As seqüências de parvovírus B19 aqui descritas também podem ser usadas como uma base para ensaios de amplificação mediada por transcrição (TMA). TMA fornece um método de identificação de seqüências-alvo de ácido nucléico presentes em quantidades muito pequenas em uma amostra biológica. Tais seqüências podem ser difíceis ou impossíveis de serem detectadas usando métodos diretos de ensaio. Em particular, TMA um sistema de amplificação de ácido nucléico-alvo isotérmico, autocatalítico, que pode fornecer mais de um bilhão de cópias de RNA de uma seqüência-alvo. O ensaio pode ser feito qualitativamente, para detectar com precisão a presença ou ausência da seqüência-alvo em uma amostra biológica. O ensaio também pode fornecer uma medida quantitativa da quantidade de seqüência-alvo em relação à faixa de concentração de várias ordens de magnitude. TMA fornece um método para sintetizar de forma autocatalítica cópias múltiplas de uma seqüência-alvo de ácidos nucléicos sem manipulação repetitiva de condições de reação tais como temperatura, força iônica e pH.

De forma geral, TMA inclui as seguintes etapas: (a) isolamento do ácido nucléico, incluindo RNA, da amostra biológica de interesse suspeita de estar infectada com parvovírus B19; e (b) combinação na mistura de reação (i)

do ácido nucléico isolado, (ii) do primeiro e do segundo iniciadores de oligonucleotídeo, o primeiro iniciador tendo uma seqüência de formação de complexo suficientemente complementar à porção do terminal 3' de uma seqüência-alvo de RNA, se presente (por exemplo o filamento (+)), para com ela formar um complexo, e o segundo iniciador tendo uma seqüência de formação de complexo suficientemente complementar à porção do terminal 3' da seqüência-alvo de seu complemento (por exemplo, o filamento (-)) para com ela formar um complexo, onde o primeiro oligonucleotídeo ainda compreende uma seqüência 5' à seqüência de formação de complexo que inclui um promotor, (iii) uma transcriptase reversa ou DNA polimerases dependentes de RNA e DNA, (iv) uma atividade de enzima que degrada seletivamente o filamento de RNA de um complexo RNA-DNA (tal como uma RNAse H) e (v) uma RNA polimerase que reconhece o promoter.

Os componentes da mistura de reação podem ser combinados em etapas ou de uma vez. A mistura de reação é incubada sob condições pelas quais um oligonucleotídeo /seqüência-alvo é formado, incluindo preparação de DNA e condições de síntese de ácido nucléico (incluindo ribonucleotídeo trifosfatos e desoxirribonucleotídeo trifosfatos) por um período de tempo suficiente para fornecer múltiplas cópias da seqüência-alvo. A reação de forma vantajosa ocorre sob condições adequadas para manutenção da estabilidade de componentes da reação tais como as enzimas componentes e sem requerer modificação ou manipulação de condições de reação durante o curso da reação de amplificação. Conseqüentemente, a reação pode ocorrer sob condições que são substancialmente isotérmicas

e incluem força iônica e pH substancialmente constantes. A reação convenientemente não requer uma etapa de desnaturação para separar o complexo RNA-DNA produzido pela primeira reação de extensão de DNA.

DNA polimerases adequadas incluem transcriptases reversas, tais como transcriptase reversa de vírus de mieloblastose aviária (AMV) (disponível por, por exemplo, Seikagaku America, Inc.) e transcriptase reversa do vírus da leucemia murídea de Moloney (MMLV) (disponível, por exemplo, por Bethesda Research Laboratories).

Promotores ou seqüências promotoras adequadas para incorporação nos iniciadores são seqüências de ácido nucléico (sejam de ocorrência natural, produzidas sinteticamente ou um produto de uma digestão por restrição) que são reconhecidas especificamente por uma RNA polimerase que reconhece e se liga àquela seqüência e inicia o processo de transcrição pelo qual são produzidos transcritos de RNA. A seqüência pode opcionalmente incluir bases de nucleotídeo que se estendem além do real sítio de reconhecimento para a RNA polimerase que pode conferir estabilidade ou susceptibilidade adicional aos processos de degradação ou eficiência de transcrição aumentada. Exemplos de promotores úteis incluem aqueles que são reconhecidos por certas polimerases de bacteriófago tais como aqueles de bacteriófago T3, T7 ou SP6, ou um promotor de *E. coli*. Essas RNA polimerases estão rapidamente disponíveis por fontes comerciais, tais como New England Biolabs e Epicentre.

Algumas das transcriptase reversas adequadas para uso nos métodos desta têm uma atividade de RNAse H, tal como

transcriptase reversa de AMV. Pode, no entanto, ser preferível adicionar RNAse H exógena, tal como RNAse H de *E. coli*, mesmo quando for usada transcriptase reversa de AMV. RNAse H está prontamente disponível por, por exemplo, Bethesda Research Laboratories.

Os transcritos de RNA produzidos por esses métodos podem servir como modelos para a produção de cópias adicionais da seqüência-alvo através dos mecanismos acima descritos. O sistema é autocatalítico e a amplificação ocorre de forma autocatalítica sem a necessidade de se modificar ou mudar repetidamente as condições de reação tais como temperatura, pH, força iônica ou outras mais.

A detecção pode ser feita usando uma ampla variedade de métodos, incluindo seqüenciamento direto, hibridização com oligômeros com especificidade de seqüência, eletroforese em gel e espectrometria de massa. Esses métodos podem usar formatos heterogêneos ou homogêneos, rótulos isotópicos ou não-isotópicos, bem como nenhum rótulo.

Um método de detecção preferível é o uso de marcadores de oligonucleotídeo com especificidade de seqüência-alvo, derivados dos fragmentos de 4,7 kbp, 700 bp, 370 bp e 214 bp acima descritos. Os marcadores podem ser usados em ensaios de proteção de hibridização (HPA). Nessa modalidade, os marcadores são convenientemente rotulados com éster de acridínio (AE), uma molécula altamente quimioluminescente. Veja, por exemplo, Nelson *e cols.* (1995) "Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence" em *Nonisotopic Probing, Blotting and Sequencing*, Kricka L.J. (ed) Academic Press, San Diego, CA;

Nelson *e cols.* (1994) "Application of the Hybridization Protection Assay (HPA) to PCR" em *The Polymerase Chain Reaction*, Mullis *e cols.* (eds.) Birkhauser, Boston, MA; Weeks *e cols.*, *Clin. Chem.* (1983) 29: 1474-1479; Berry *e cols.*, *Clin. Chem.* (1988) 34: 2087-2090. Uma molécula de AE é diretamente anexada ao marcador usando uma química de braço ligante não baseado em nucleotídeo que permite a colocação do rótulo em qualquer localização dentro do marcador. Veja, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.585.481 e 5.185.439. Quimiluminescência é desencadeada por reação com peróxido de hidrogênio alcalino que rende um peróxido de hidrogênio excitado que subseqüentemente colapsa para o estado fundamental com a emissão de um fóton. Adicionalmente, AE causa hidrólise de éster que rende o ácido metil acridínio carboxílico não-quimioluminescente.

Quando a molécula de AE é anexada de forma covalente a um marcador de ácido nucléico, hidrólise é rápida sob condições levemente alcalinas. Quando o marcador rotulado por AE é exatamente complementar ao ácido nucléico-alvo, a taxa de hidrólise de AE é grandemente reduzida. Dessa forma, marcador rotulado por AE hibridizado e não-hibridizado pode ser detectado diretamente em solução, sem a necessidade de separação física.

HPA geralmente consiste nas seguintes etapas: (a) o marcador rotulado por AE é hibridizado com o ácido nucléico-alvo em solução por cerca de 15 a cerca de 30 minutos. Uma solução levemente alcalina é então adicionada e AE acoplado ao marcador não-hibridizado é hidrolisado. Essa reação leva aproximadamente 5 a 10 minutos. O AO associado com híbrido restante é detectado como uma medida

da quantidade de alvo presente. Essa etapa leva aproximadamente 2 a 5 segundos. Preferentemente, a etapa de hidrólise diferencial é conduzida na mesma temperatura que a etapa de hibridização, tipicamente a 50 a 70°C. Alternativamente, uma segunda etapa de hidrólise diferencial pode ser conduzida em temperatura ambiente. Isso permite que sejam usados pHs elevados, por exemplo na faixa de 10-11, que geram diferenças maiores na taxa de hidrólise entre marcador rotulado por AE hibridizado e não-hibridizado. HPA é descrito em detalhe, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos. 6.004.745; 5.948.899; e 5,283.174.

TMA é descrito em detalhe, por exemplo, na Patente U.S. No. 5.399.491. Em um Exemplo de um ensaio típico, uma amostra isolada de ácido nucléico, suspeita de conter uma seqüência-alvo de parvovírus B19, é misturada com um concentrado de tampão contendo o tampão, sais, magnésio, nucleotídeo trifosfatos, iniciadores, ditiotreitol, e espermidina. A reação é opcionalmente incubada a cerca de 100°C por aproximadamente dois minutos para desnaturar qualquer estrutura secundária. Após resfriamento até a temperatura ambiente, transcriptase reversa, RNA polimerase, e RNAse H são adicionadas e a mistura é incubada por duas a quatro horas a 37°C. A reação pode então ser testada pela desnaturação do produto, adição de uma solução de marcador, incubação por 20 minutos a 60°C, adição de uma solução para hidrolisar seletivamente o marcador não-hibridizado, incubação da reação por seis minutos a 60°C, e medição da quimiluminescência restante em um luminômetro.

As moléculas de oligonucleotídeo da presente invenção

também podem ser usadas em amplificação baseada em seqüência de ácido nucléico (NASBA). Esse método é um processo dirigido por promotor, enzimático, que induz amplificação homogênea e isotérmica contínua *in vitro*, de um ácido nucléico específico para fornecer cópias de RNA do ácido nucléico. Os reagentes para a condução de NASBA incluem um primeiro iniciador de DNA com uma cauda de 5' que compreende um promotor, um segundo iniciador de DNA, transcriptase reversa, RNAse-H, T7 RNA polimerase, NTP's e dNTP's. Usando NASBA, são geradas grandes quantidades de RNA de filamento a partir de RNA ou DNA de filamento único, ou DNA de filamento duplo. Quando RNA deve ser amplificado, o ssRNA serve como um modelo para a síntese de um primeiro filamento de DNA por prolongamento de um primeiro iniciador contendo um sítio de reconhecimento de RNA polimerase. Esse filamento de DNA por sua vez serve como o modelo para a síntese de um segundo filamento de DNA, complementar, por prolongamento de um segundo iniciador, resultando em um sítio de promotor de RNA-polimerase de filamento duplo, e o segundo filamento de DNA serve como um modelo para a síntese de grandes quantidades do primeiro modelo, o ssRNA, com o auxílio de uma RNA polimerase. A técnica NASBA é conhecida na técnica e descrita em, por exemplo, Patente Européia 329.822, Aplicação de Patente Internacional No. WO 91/02814, e Patentes U.S. Nos. 6.063.603, 5.554.517 e 5.409.818.

As seqüências de parvovírus B19 aqui descritas também são úteis em técnicas de hibridização de ácido nucléico e amplificação que utilizam molécula de DNA ramificado. Em um ensaio básico de hibridização de ácido nucléico, ácido

nucléico analisado de filamento único é hibridizado para um marcador rotulado de ácido nucléico de filamento único e são detectadas duplas rotuladas resultantes. Variações desse esquema básico foram desenvolvidas para facilitar a separação das duplas a serem detectadas de materiais extrínsecos e/ou para amplificar o sinal que é detectado. Um método para amplificação do sinal usa multímeros de amplificação que são polinucleotídeos com um primeiro segmento que hibridiza especificamente para o ácido nucléico analisado ou um filamento de ácido nucléico ligado ao analisado e interações de um segundo segmento que hibridiza especificamente para um marcador rotulado. A amplificação é teoricamente proporcional ao número de interações do segundo segmento. Os multímeros podem ser tanto lineares quanto ramificados. Dois tipos gerais de multímeros ramificados são úteis nessas técnicas: divididos e penteados. Métodos para fabricação e uso de moléculas de ácido nucléico ramificados são conhecidos na técnica e descritos em, por exemplo, Patente U.S. No. 5.849.481.

Em outro aspecto da invenção, dois ou mais dos testes acima descritos são realizados para confirmar a presença do organismo. Por exemplo, se o primeiro teste usou a amplificação mediada por transcrição (TMA) para amplificar os ácidos nucléicos para detecção, então é realizado um ensaio de teste alternativo de ácido nucléico (NAT), por exemplo, pelo uso de amplificação por PCR, RT PCR, e outros mais, como aqui descritos. Dessa forma, parvovírus B19 pode ser especificamente e seletivamente detectado mesmo quando a amostra contém outros organismos, tais como HIV, e vírus da Hepatite B, por exemplo.

Como é facilmente aparente, o projeto dos ensaios aqui descritos estão sujeitos a grande possibilidade de variação, e muitos formatos são conhecidos na técnica. As descrições acima são fornecidas meramente como um guia, e aquele experiente na técnica pode facilmente modificar os protocolos descritos, usando técnicas bem conhecidas na técnica.

Os reagentes de ensaio acima descritos, incluindo os iniciadores, marcadores, suporte sólido com marcadores ligados, bem como outros reagentes de detecção, podem ser fornecidos em kits, com instruções adequadas e outros reagentes necessários, a fim de conduzir os ensaios como descrito acima. O kit irá normalmente conter em recipientes separados a combinação de iniciadores e marcadores (já unidos a uma matriz sólida ou separados com reagentes para uni-los à matriz), formulações de controle (positivas e/ou negativas), reagentes rotulados quando o formato do ensaio requerer os mesmos e reagentes de geração de sinal (por exemplo, substrato de enzima) se o rótulo não gera um sinal diretamente. Instruções (por exemplo, escritas, fitas, VCR, CD-ROM, etc.) para a realização do ensaio usualmente serão incluídas no kit. O kit também pode conter, dependendo do ensaio em particular usado, outros reagentes e materiais embalados (ou seja tampões de lavagem e outros mais). Ensaios-padrão, tais como aqueles acima descritos, podem ser realizados usando esses kits.

III. Experimental

Abaixo estão Exemplos de modalidades específicas para a realização da presente invenção. Os Exemplos são oferecidos somente para fins ilustrativos, e não visam

limitar o escopo da presente invenção de qualquer forma.

Foram feitos esforços para assegurar a precisão com relação aos números usados (por exemplo, quantidades, temperaturas, etc.), mas alguns erros e desvios experimentais devem, evidentemente, ser permitidos.

Nos seguintes Exemplos, enzimas foram adquiridas de fontes comerciais, e usadas de acordo com as instruções dos fabricantes. Filtros de nitrocelulose e outros mais também foram adquiridos de fontes comerciais.

O isolamento de fragmentos de DNA, exceto quando observado, todas as manipulações de DNA foram feitas de acordo com procedimentos-padrão. Veja, Sambrook *e cols.*, *supra*. Enzimas de restrição, T4 DNA ligase, *E. coli*, DNA polimerase I, fragmento de Klenow, e outros reagentes biológicos podem ser adquiridos de fornecedores comerciais e usados de acordo com as instruções dos fabricantes. Fragmentos de DNA de filamento duplo foram separados em géis de agarose.

Exemplo 1

Extração de Ácido Nucléico de Parvovírus B19 para PCR

Amostras de soro humano que foram testadas positivas previamente para parvovírus B19 humano tanto por IgM quanto por testes PCR foram obtidas de fontes comerciais e usadas para isolar DNA para subseqüentes experimentos de PCR. Amostras foram estocadas a -80°C até usadas.

DNA foi extraído de 0,2 ml de soro usando o Mini Kit QIAamp DNA Blood (QIAGEN, Valencia, CA) seguindo as especificações do fabricante com as seguintes considerações. Foi adicionado DNA transportador ao tampão de lise para melhorar o rendimento e ligação de ácido

nucléico. Em particular, foi adicionada uma quantidade de 5,6 µg por amostra de ácido poliadenílico 5' (Sigma, St. Louis, MO) ou poli-dA (Roche, Indianapolis, IN). Adicionalmente, DNA de parvovírus B19 foi eluído com 200 µL de tampão AE (Qiagen) ao invés de água.

Exemplo 2

Detecção de Amostras de Ácido Nucléico de Parvovírus B19-Positivas por PCR

Foram usados dois procedimentos de PCR diferentes para amplificar fragmentos de parvovírus 19. Um método, descrito em detalhe abaixo, foi usado para amplificar fragmentos de aproximadamente 700 bp, 370 bp e 214 bp (veja, Figura 1). Foi usado "High Fidelity Expand PCR" (Roche) para amplificar fragmentos de aproximadamente 4,7 kb. O fragmento de aproximadamente 700 bp às posições de nucleotídeo 2936-3635 do genoma do parvovírus B19 descrito em Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936. O de aproximadamente 370 bp ocorre dentro do fragmento de 700 bp nas posições de nucleotídeo 3073-3442. O fragmento de aproximadamente 4,7 kb é um fragmento de 4677 nucleotídeos que corresponde às posições de nucleotídeo 217-4893 de Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936.

A fim de amplificar os fragmentos de B19 de aproximadamente 700 bp, 370 bp e 214 bp, foram usados os iniciadores mostrados na Tabela 1.

Tabela 1

Região Do Iniciador	Seqüência	Produto de PCR	Genômico
VP-5	AGGAAGTTTGCCGGAAGTTC (ID.DE SEQ.N°:36)	370 bp	VP1
VP-3	GTGCTGAAACTCTAAAGGTG (ID.DE SEQ.N°:37)	370 bp	VP1

VP2-5	GACATGGATATGAAAAGCCTGAAG	
	(ID.DE SEQ.N°: 38)	214 bp
VP1/VP2	GTTGTTCATATCTGGTTAAGTACT	
	(ID.DE SEQ.N°: 39)	214 bp
VP1/VP2		
K-1sp	ATAAATCCATATACTCATT (ID.DE SEQ.N°: 40)	700 bp
VP1/VP2		
K-2sp	CTAAAGTATCCTGACCTTG (ID.DE SEQ.N°: 41)	700 bp
VP1/VP2		

Para esse experimento, PCR foi realizada em um volume final de 100 µL usando 2 µL de DNA purificado de parvovírus B19 (purificado como descrito acima), 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato e 1,25 unidades de Pfu DNA polimerase (Stratagene, La Jolla, CA). O perfil de amplificação envolveu desnaturação a 94°C por 2 minutos, enrijecimento de iniciador a 37°C por 3 minutos e extensão a 72°C por 3 minutos por 35 ciclos. Uma pré-incubação de 3 minutos a 94°C para assegurar desnaturação inicial e uma incubação final de 7 minutos a 72°C para assegurar a extensão completa de fragmentos precedeu e seguiu, respectivamente, os 35 ciclos de PCR. Produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida 7%, corados com brometo de etídio e visualizados sob uma fonte de UV. A purificação de fragmentos amplificados foi realizada usando o kit de purificação de PCR QiaQuick (QIAGEN).

Foi realizada PCR abrigada para amplificar o fragmento de B19 de 370 bp quando a banda de 700 bp não foi visualizada nos géis de poliacrilamida. O material de DNA de 700 bp foi usado para a PCR abrigada usando iniciadores

mostrados na Tabela 1.

"High Fidelity Expand PCR" (Roche) foi usada para amplificar o fragmento de parvovírus B19 de 4,7 kb como segue. O kit "High Fidelity Expand PCR" (Roche) e iniciadores Hicks-5 (5'CCCGCCTTATGCAAATGGGCAG3') (ID. DE SEQ. N°: 42) e Hicks-3 (5'TTGTGTTAGGCTGTCTTATAGG3') (ID. DE SEQ. N°: 43) foram usados seguindo as recomendações do vendedor. As condições de amplificação foram 94°C por 1 minuto, 50°C por 2 minutos e 68°C por 4 minutos por 35 ou 45 ciclos. Uma pré-incubação a 94°C por 2 minutos e uma pós-incubação a 75°C por 7 minutos também foram incluídas. Os produtos de PCR foram separados em géis de agarose 1% e purificados usando o kit de Purificação de PCR (Promega, Madison, WI).

Exemplo 3

Clonagem de Fragmentos de DNA de Parvovírus B19

Os fragmentos de PCR foram clonados em vetores TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA). A clonagem nesses vetores é altamente facilitada quando o DNA amplificado contém uma única desoxiadenosina (A) em sua extremidade 3'. Conseqüentemente, uma reação catalítica para adicionar a 3' (A) acima foi usada. Uma mistura de reação continha 1,25 mM de dATP, 0,5 unidades de Taq polimerase (Perkin Elmer, Boston, MA) e procedeu a 72°C por 15 minutos.

Fragmentos de PCR foram clonados no vetor pCR2.1-TOPO usando kit de clonagem TA da Invitrogen ("TOPO^{TN}TA Cloning Kit" com "One Shot TOP 10 Electrocompetent Cells") seguindo as especificações do fabricante. Células bacterianas foram incubadas a 37°C em placas de Meio de Cultura Luria contendo ampicilina a 100 µg/ml, 0,66 mM IPTG e X-Gal

0,033%. Um número de colônias brancas foi inoculado em 4 ml de Meio de Cultura Luria ampicilina (100 µg/ml) e incubado de um dia para o outro a 37°C com agitação. Três ml das culturas que permaneceram de um dia para o outro foram usados para preparar DNA de plasmídeo usando o kit QIAprep Miniprep (QIAGEN). Clones recombinantes foram identificados por análise de enzima de restrição com *Eco*RI (New England e Biolabs) e eletroforese em gel de poliacrilamida 7% ou de agarose 1 % como descrito acima.

A fim de determinar as seqüências de DNA dos clones, grandes quantidades de plasmídeos de clones recombinantes foram preparadas como acima e o DNA suspenso em TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) a 0,2 mg/ml. A determinação da seqüência de nucleotídeos dos fragmentos de parvovírus 19 foi realizada usando um sistema Seqüenciador de DNA Applied Biosystems Modelo 373 (ou Modelo 377).

Figuras 2A até 2U (IDS. DE SEQ. N°^{s}: 1-21) revelam seqüências de DNA de 21 isolados de parvovírus B19, purificados, amplificados e seqüenciados como descrito acima, que correspondem a posições de nucleotídeo 2936-3635 do genoma do parvovírus B19 descrito em Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936 (o fragmento de 700 bp da Figura 1 e descrito acima). Figura 2A (ID. DE SEQ. N°: 1) é a seqüência do isolado CH47-26; Figura 2B (ID. DE SEQ. N°: 2) é a seqüência do isolado CH48-29; Figura 2C (ID. DE SEQ. N°: 3) é a seqüência do isolado CH33-2; Figura 2D (ID. DE SEQ. N°: 4) é a seqüência do isolado CH33-3; Figura 2E (ID. DE SEQ. N°:5) é a seqüência do isolado CH33-4; Figura 2F (ID. DE SEQ. N°: 6) é a seqüência do isolado CH42-7; Figura 2G (ID. DE SEQ. N°: 7) é a seqüência do isolado CH42-18;

Figura 2H (ID. DE SEQ. N°: 8) é a seqüência do isolado CH42-19; Figura 21 (ID. DE SEQ. N°: 9) é a seqüência do isolado CH46-23; Figura 2J (ID. DE SEQ. N°: 10) é a seqüência do isolado CH1-1; Figura 2K (ID. DE SEQ. N°: 11) é a seqüência do isolado CH1-6; Figura 2L (ID. DE SEQ. N°: 12) é a seqüência do isolado CH2-8; Figura 2M (ID. DE SEQ. N°: 13) é a seqüência do isolado CH2-10; Figura 2N (ID. DE SEQ. N°: 14) é a seqüência do isolado CH2-11C; Figura 20 (ID. DE SEQ. N°: 15) é a seqüência do isolado CH5-13; Figura 2P (ID. DE SEQ. N°: 16) é a seqüência do isolado CH7-22; Figura 2Q (ID. DE SEQ. N°: 17) é a seqüência do isolado CH13-27; Figura 2R (ID. DE SEQ. N°: 18) é a seqüência do isolado CH14-33; Figura 2S (ID. DE SEQ. N°: 19) é a seqüência do isolado CH62-2; Figura 2T (ID. DE SEQ. N°: 20) é a seqüência do isolado CH64-2; e Figura 2U (ID. DE SEQ. N°: 21) é a seqüência do isolado CH67-2.

Figuras 11A até 11Z (ID. DE SEQ. N°^{s}: 62-87) revelam seqüências de DNA de um adicional de 26 isolados de parvovírus B19, purificados, amplificados e seqüenciados como descrito acima, que corresponde às posições de nucleotídeo 2936-3635 do genoma do parvovírus B19 descrito em Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58:921-936 (o fragmento de 700 bp da Figura 1 e descrito acima). Figura 11A (ID. DE SEQ. N°: 62) é a seqüência do isolado CH80-1; Figura 11B (ID. DE SEQ. N°: 63) é a seqüência do isolado CH81-3; Figura 11C (ID. DE SEQ. N°: 64) é a seqüência do isolado B19SCL14; Figura 11D (ID. DE SEQ. N°: 65) é a seqüência do isolado B19SCL2-1; Figura 11E (ID. DE SEQ. N°: 66) é a seqüência do isolado B19SCL3-1; Figura 11F (ID. DE SEQ. N°: 67) é a seqüência do isolado B19SCL4-3; Figura 11G (ID. DE

SEQ. N°: 68) é a seqüência do isolado B19SCL5-2; Figura 11H (ID. DE SEQ. N°: 69) é a seqüência do isolado B19SCL6-2; Figura 111 (ID. DE SEQ. N°: 70) é a seqüência do isolado B19SCL7-3; Figura 11J (ID. DE SEQ. N°: 71) é a seqüência do isolado B19SCL8-2; Figura 11K (ID. DE SEQ. N°: 72) é a seqüência do isolado B19SCL9-1; Figura 11L (ID. DE SEQ. N°: 73) é a seqüência do isolado B19SCL9-9; Figura 11M (ID. DE SEQ. N°: 74) é a seqüência do isolado B19SCL10-2; Figura 11N (ID. DE SEQ. N°: 75) é a seqüência do isolado B19SCL11-1; Figura 11O (ID. DE SEQ. N°: 76) é a seqüência do isolado B19SCL12-1; Figura 11P (ID. DE SEQ. N°: 77) é a seqüência do isolado B19SCL13-3; Figura 11Q (ID. DE SEQ. N°: 78) é a seqüência do isolado B19SCL141; Figura 11R (ID. DE SEQ. N°: 79) é a seqüência do isolado B19SCL15-3; Figura 11S (ID. DE SEQ. N°: 80) é a seqüência do isolado B19SCL16-2; Figura 11T (ID. DE SEQ. N°:81) é a seqüência do isolado B19SCL17-1; Figura 11U (ID. DE SEQ. N°: 82) é a seqüência do isolado B19SCL18-1; Figura 11V (ID. DE SEQ. N°: 83) é a seqüência do isolado B19SCL19-1; Figura 11W (ID. DE SEQ. N°: 84) é a seqüência do isolado B19SCL20-3; Figura 11X (ID. DE SEQ. N°: 85) é a seqüência do isolado B19SCL213; Figura 11Y (ID. DE SEQ. N°: 86) é a seqüência do isolado B19SCL22-11; Figura 11Z (ID. DE SEQ. N°: 87) é a seqüência do isolado B19SCL2-14.

Comparações de seqüência revelaram aproximadamente 98% a 99,5% de homologia de seqüência dessa seqüência de 700 bp entre os vários isolados.

Figuras 3A-3C (ID. DE SEQ. N°: 22) mostram a seqüência para o fragmento de PCR de aproximadamente 4,7 kbp mostrada na Figura 1 e descrita acima, do clone 2-B1 de parvovírus

B19. A seqüência revelada nas figuras é um fragmento de 4677 nucleotídeos correspondendo às posições de nucleotídeo 217-4893 de Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936. A seqüência revelada contém a estrutura de leitura aberta de comprimento total de parvovírus B19 que codifica NS1, VP1 e VP2, mais seqüências não-traduzidas adicionais 5' e 3'. O fragmento seqüenciado continha um nucleotídeo adicional na região não-codificadora 5' entre a posição de nucleotídeo 367 e 368 da seqüência de B19 reatada por Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936.

Figuras 4A-4C (ID. DE SEQ. N°: 23) mostram a seqüência para o fragmento de PCR de aproximadamente 4,7 kbp mostrada na Figura 1 do clone 2-B6 de parvovírus B19. A seqüência é um fragmento de 4677 nucleotídeos correspondendo às posições de nucleotídeo 217-4893 de Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936. A seqüência revelada contém a estrutura de leitura aberta de comprimento total de parvovírus B19 que codifica NS1, VP1 e VP2, mais seqüências não-traduzidas adicionais 5' e 3'. O fragmento seqüenciado continha um nucleotídeo adicional na região não-codificadora 5' entre a posição de nucleotídeo 367 e 368 da seqüência de B19 relatada por Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936.

Exemplo 4

Clonagem e Expressão de Proteínas Recombinantes de Parvovírus B19 NS1, VP1 e VP2.

Fragmentos que codificam NS1, VP1 e VP2 (veja Figura 1) foram amplificados usando o fragmento de 4,7 kb de parvovírus B19 clonado em pCR2.1-TOPO (descrito acima). Em particular, iniciadores de PCR (veja abaixo) foram

designados para PCR fora das regiões NS1, VP1, e VP2 de parvovírus B19. Para facilitar a clonagem dessas regiões em vetores de expressão de levedura, foram introduzidos sítios de restrição *Xba*I, *Hind*III e *Sal*I nos iniciadores como necessário.

Os iniciadores usados para clonar e amplificar fragmentos de parvovírus 19 para expressão de levedura de proteínas recombinantes NS1, VP1 e VP2 eram baseados nas seqüências obtidas acima e eram como segue:

NS1-5 (iniciador senso)

5'ATACTCTCTAGACAAAACAAAATGGAGCTATTTAGAGGGGTGCTTCAAGTTTCT3'

(ID. DE SEQ. N°: 44)

NS1-3 (iniciador anti-senso)

5'GAGTATGTCGACTTACTCATAATCTACAAAGCTTTGCAATCCAGACAG3'

(ID. DE SEQ. N°: 45)

VP1-5SN (iniciador senso)

5'ATACTCAAGCTTACAAAACAAAATGAGTAAAGAAAGTGGCAAATGGTGGGAAAGT3'

(ID. DE SEQ. N°: 46)

VPALL-3 (iniciador anti-senso)

5'GAGTATGTCGACTTACAATGGGTGCACACGGCTTTTGGCTGTCCACAATTC3

(ID. DE SEQ. N°: 47)

VP2-5SN (iniciador senso)

5'ATACTCAAGCTTACAAAACAAAATGACTTCAGTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACT3'

(ID. DE SEQ. N°: 48)

Iniciadores de PCR foram sintetizados, purificados e suspensos em 300 µl de dH_2O e suas densidades ópticas a 260 nm determinadas. A mistura de reação continha 0,25 ng de modelo, 100 pmol de cada iniciador, 10 µl de 1,25 mM de cada dNTP e 1 unidade de Taq polimerase (Perkin Elmer, Boston, MA) em um volume final de 50 µl. As condições de

amplificação foram 94°C por 1 minuto, 50°C por 2 minutos e 68°C por 4 minutos para 35 ciclos. Uma pós-incubação de 7 minutos a 75°C foi adicionada para assegurar a extensão completa de fragmentos. Alíquotas de 5 µl foram usadas para checar síntese de PCR por eletroforese em géis de agarose 1%. Todo o produto PCR foi então submetido a eletroforese e fragmentos que exibiam os tamanhos esperados foram purificados dos géis usando o kit de Purificação de PCR (Promega) seguindo as recomendações do vendedor. Aproximadamente 0,8 µg de DNA de PCR purificado foi digerido com as enzimas de restrição apropriadas (Roche) por 3 horas a 37°C e os produtos foram adicionalmente purificados usando o kit de Purificação de PCR da Promega.

Plasmídeo pBS24.1 foi usado para expressão heteróloga das proteínas recombinantes de parvovírus B19. Esse vetor de expressão de levedura contém seqüências de 2 µ e repetições invertidas (IR) para replicação autônoma em levedura, o terminador de fator-α para assegurar a terminação de transcrição, e a levedura *leu2-d* e URA3 para seleção. A origem de replicação ColE1 e o gene de β-lactamase também estão presentes para propagação e seleção em *E. coli* (Pichuantes *e cols.* (1996) "Expression of Heterologous Gene Products in Yeast". Em: *Protein Engineering: A Guide to Design e Production*, Capítulo 5. J. L. Cleland e C. Craik, eds., Wiley-Liss, Inc., New York, N. Y. pp. 129-161). Plasmídeo pBS24.1 foi digerido com *Bam*HI/*Sal*I e desfosforilado com 10 unidades de fosfatase alcalina de intestino de bezerro (Boheringer Manheim, Indianapolis, IN) sob as condições recomendadas pelo vendedor. Os fragmentos de PCR digeridos e purificados

foram misturados com *Bam*HI/*Sal*I digerido pBS24.1 e com um fragmento de DNA contendo o promotor híbrido de levedura ADH2/GAPDH (Cousens *e cols.*, *Gene* (1987) 61: 265- 275) digerido ou com *Bam*HI/*Sfu*I ou com um *Bam*HI/*Hind*III, dependendo dos sítios de restrição presentes nos fragmentos de PCR a serem clonados. A ligação foi realizada com o kit e protocolo do "Roche Rapid Ligation kit". A mistura de ligação foi então usada para transformar células competentes HB101 de *E. coli* e transformantes foram selecionados em placas de Meio de Cultura Luria contendo ampicilina a 100 g/ml após uma incubação de um dia para o outro a 37°C.

Várias colônias de cada transformação foram retiradas e inoculadas em 3 ml de Meio de Cultura Luria com ampicilina a 100 g/ml e incubadas a 37°C com agitação de um dia para o outro.

DNA de plasmídeo foi preparado usando 1,5 ml de culturas o kit QIAprep Miniprep (QIAGEN). Clones recombinantes foram identificados por análise analítica de enzima de restrição com *Bam*HI-*Sal*I. Foram feitas preparações em larga escala de plasmídeos recombinantes para realizar o seqüenciamento para confirmar a seqüência de nucleotídeos dos fragmentos clonados de parvovírus 19.

Plasmídeos de expressão de levedura que exibiam a seqüência esperada para NS1, VP1 e VP2 foram usados para transformação de levedura como segue. Células AD# competentes de *Saccharomyces cerevisiae* [*Mat a*, *trp1+*, *ura3-52*, *prb1-1122*, *pep4-3*, *prc1-407*, [cir^0],::*pDM15* (*pGAP/ADR1*::$G418^R$)], *leu2*(ΔAD)] foram transformadas com DNAs de plasmídeo que codificam NS1, VP1 ou VP2, clonados

como descrito acima. A seleção de recombinantes de levedura foi obtida por duas rodadas de placas deficientes em uracil seguidas por uma rodada de placas deficientes em leucina após incubação a 30°C por 48-72 horas. As culturas cresceram então em meios deficientes em leucina e então em YEP suplementado com glicose 2% (Pichuantes *e cols.*, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* (1989) 6: 324-337) por 48 horas antes de se checar a expressão das proteínas recombinantes.

As seqüências para as várias proteínas de dois isolados diferentes são mostradas nas Figuras 5-10. Em particular, Figuras 5A (ID. DE SEQ. N°: 24) e 5B (ID. DE SEQ. N°: 25) mostram as seqüências de nucleotídeos e proteína de NS1, respectivamente, do clone 2-B1 de parvovírus B19. Figuras 6A (ID. DE SEQ. N°: 26) e 6B (ID. DE SEQ. N°: 27) mostram as seqüências de nucleotídeos e proteína de VP1, respectivamente, do clone 2-B1 de parvovírus B19. Figuras 7A (ID. DE SEQ. N°: 28) e 7B (ID. DE SEQ. N°: 29) mostram as seqüências de nucleotídeos e proteína de VP2, respectivamente, do clone 2-B1 de parvovírus B19. Figuras 8A (ID. DE SEQ. N°: 30) e 8B (ID. DE SEQ. N°: 31) mostram as seqüências de nucleotídeo e proteína de NS1, respectivamente, do clone 2-B6 de parvovírus B19. Figuras 9A (ID. DE SEQ. N°: 32) e 9B (ID. DE SEQ. N°: 33) mostram as seqüências de nucleotídeos e proteína de VP1, respectivamente, do clone 2-B6 de parvovírus B19. Figuras 10A (ID. DE SEQ. N°: 34) e 10B (ID. DE SEQ. N°: 35) mostram as seqüências de nucleotídeos e proteína de VP2, respectivamente, do clone 2-B6 de parvovírus B19.

Exemplo 5

Detecção e Quantificação de DNA de Parvovírus B19 por TaqMan™

Um método diagnóstico sensível para a detecção de infecção por parvovírus B19 foi designado como segue. Em particular,tecnologia de PCR TaqMan™ foi usada para detectar e quantificar DNA de parvovírus B19. PCR quantitativa requer extração eficiente de ácido nucléico. O volume de plasma/soro usado para extração de DNA também influencia a sensibilidade de detecção. Foram usadas duas abordagens para isolar ácido nucléico de 0,5 ml de plasma/soro. Em particular, DNA foi extraído por (a) ligação à sílica; e (b) enrijecimento para oligonucleotídeos com especificidade de alvo.

(a) Isolamento de ácido nucléico por ligação à sílica.

Na presença de altas concentrações de sal caotrópico tal como isotiocianato de guanidínio, ácidos nucléicos se ligam à sílica. Ácidos nucléicos de tamanho pequeno se ligam mais eficientemente à sílica sob condições de pH ácido. Os ácidos nucléicos ligados são eficientemente eluídos em sal inferior, tampão de pH alcalino em temperaturas elevadas. A substituição de sílica magnetizada por sílica regular facilita grandemente as etapas de lavagem e eluição de isolamento de ácido nucléico. Uma base magnética foi usada para capturar as partículas de ácido nucléico ligado à sílica, eliminando dessa forma centrifugações necessárias para sedimentar as partículas de sílica regular.

O tampão de lise usado foi da Organon-Teknika (Durham, NC). Esse tampão de lise contém isotiocianato de guanidínio

para solubilizar proteínas e inativar RNases e DNases. O detergente Triton X-100 facilita ainda mais o processo de solubilização e desintegração da estrutura celular e proteínas nucleares, liberando dessa forma ácido nucléico. O reagente de lise foi acidificado para melhorar a ligação do ácido nucléico, e 50 µL de tampão de eluição alcalino foram usados para eluir o ácido nucléico ligado. Após o isolamento de ácido nucléico, a presença de DNA de parvovírus foi determinada pela realização de PCR TaqMan™, como descrito abaixo.

(b) Isolamento de ácido nucléico por enrijecimento para oligonucleotídeos com especificidade de alvo.

Embora o uso de sílica magnetizada facilita grandemente a manipulação rápida e fácil durante as etapas de lavagem e eluição, isolamento de ácido nucléico ainda é trabalhoso e demorado. Portanto, foi usada captura em uma etapa de alvo específico de ácido nucléico de plasma ou soro usando glóbulos magnéticos. A fim de tornar esse processo aplicável para uma ampla variedade de testes de captura de ácido nucléico viral, foram usados glóbulos magnéticos genéricos acoplados com oligo dT. Glóbulos magnéticos oligo (dT) Sera-Mag (Seradyn, Indianapolis, IN) com um comprimento de oligo dT de 14meros foram usados em combinação com oligonucleotídeos de Captura contendo 20 poli A's na extremidade 3' contígua com a seqüência específica para parvovírus usada (designada na extremidade da seqüência especificada abaixo).

Os oligonucleotídeos anti-senso de captura usados eram derivados do fragmento de 700 bp e eram como segue:

VSPC1 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCTTAACAGCAATTTCTGATA (nt

3492-3514) (*) (ID. DE SEQ. N°: 49)

VSPC2 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAACGCCCTGTAGTGCTGTCAG (nt 3549-3568) (ID. DE SEQ. N°: 50)

VSPC3 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAATATACCCAAATAGGAAGTTCTG (nt 3639-3660) (ID. DE SEQ. N°:51)

VSPC4 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAATGCTGATTCTTCACTTGC (nt 3737-3759) (ID. DE SEQ. N°: 52)

VSPC5 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGCTGTACCTCCTGTACCTA (nt 3789-3808) (ID. DE SEQ. N°: 53)

VSPC6 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCCCTCTAAATTTTCTGGG (nt 3838-3857) (ID. DE SEQ. N°: 54)

VSPC7 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCCTAATGTGTCAGGAACC (nt 3910-3929) (ID. DE SEQ. N°: 55)

(*) Números de nucleotídeo estão de acordo com Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936.

Os glóbulos magnéticos foram suspensos em tampão de lise Novagen (Madison, WI) e uma série de sete oligonucleotídeos de captura (VSPC1 - VSPC7, descritos acima) foram testados individualmente ou em combinação, para capturar DNA de parvovírus B19 de um painel obtido do "FDA Center for Biologic Evaluation and Research, U.S. Department of Health and Human Services (FDA-CBER)".

(c) Lavagem dos glóbulos com um tampão de lavagem.

Após capture, os glóbulos foram lavados com um tampão contendo 10 mM Hepes tamponado até pH 7,5 em 0,3 M NaCl, e NP-40 0,5%. Após tratamento do soro com tampão de lise, hibridização, adsorção magnética de glóbulos, e remoção do tampão de lise, 1,5 ml do tampão de lavagem foram adicionados aos glóbulos. Após o turbilhonamento, adsorção magnética, e remoção do tampão de lavagem usuais, os

glóbulos foram lavados uma segunda vez em 0,5 ml do mesmo tampão, de forma que os glóbulos magnéticos possam ser compactados, para facilitar suspensão em 100 ml de tampão de PCR Universal contendo todos os reagentes para o ensaio Taqman. Os glóbulos com o DNA capturado foram transferidos para a placa de TaqMan™ para detecção por PCR TaqMan™, como descrito abaixo. Várias combinações de oligonucleotídeo foram eficientes na captura de B19 as como detectado por ensaio TaqMan™.

Em particular, a tecnologia TaqMan™ amplifica ácido nucléico-alvo capturado como DNA amplicons. Uma alternativa é amplificação do alvo capturado como RNA. Para isso, oligonucleotídeos de amplificação consistiam em um iniciador específico para parvovírus B19 com uma seqüência promotora T7, a fim de gerar amplicons de RNA usando T7 RNA polimerase. Três iniciadores de amplificação (VSA1-A3, descritos abaixo), derivados da seqüência de 700 bp que corresponde aos nucleotídeos 2936-3635 do genoma do parvovírus B19 descrito em Shade *e cols.*, *J. Virol.* (1986) 58: 921-936 foram testados quanto à sua habilidade para amplificar. Os iniciadores eram como segue:

Iniciadores de amplificação de filamento senso

VSA1 - AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCATATACTCATTGGACTGT (nt 2942-2961) (ID. DE SEQ. N°: 56)

VSA2 - AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCAGAGCACCATTATAA (nt 3272-3288) (ID. DE SEQ. N°: 57)

VSA3 - AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCACAATGCCAGTGGAAA (nt 3317-3333) (ID. DE SEQ. N°: 58)

VSP2 - GTGCTGAAACTCTAAAGGT (Iniciador Anti-senso - nt 3424-3442) (ID. DE SEQ. N°: 59)

Foram empregados reagentes do kit RNamplifire (Qiagen) para examinar a eficiência de amplificação usando 50 cópias do DNA de parvovírus como alvo em um volume final de 20 ml. Os iniciadores de amplificação foram testados individualmente ou em combinação usando VSP2 como o segundo iniciador. Após 1 (uma) hora de incubação em uma temperatura de 42°C como recomendado pelo fabricante, uma alíquota do material amplificado foi diluída 100 vezes, para detecção pelo ensaio TaqMan™ para avaliar a eficiência dos iniciadores de amplificação. Uma combinação de dois iniciadores de amplificação, VSA2 e VSA3 com VSP2, foi altamente eficiente na geração de amplicons de RNA.

A sensibilidade do ensaio TaqMan™, a adeqüabilidade dos iniciadores de PCR e as condições de reação ótimas foram estabelecidas empregando DNA de plasmídeo contendo o fragmento de 4,7 kb descrito acima. Esse fragmento inclui a região VP1, bem como as regiões NS1 e VP2 (veja Figura 1). Foram usados iniciadores de amplificação de PCR derivados da região VP1, conforme detalhados abaixo. A numeração é em relação a Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936. X representa 5'-fluoresceína fosforamidita e Z representa DABCYL-dT, ambos obtidos de Glen Research Corporation, Sterling, VA. Os números designados à direita da seqüência se referem aos nucleotídeos nos iniciadores da seqüência de parvovírus B19.

VSP1 - GGAGGCAAAGGTTTGCA (Iniciador Senso-nt 3334-3350) (ID. DE SEQ. N°: 60)

VSP2 - GTGCTGAAACTCTAAAGGT (Iniciador Anti-Senso-nt 3424-3442) (ID. DE SEQ. N°: 59)

VSPPR1 - XCCCATGGAGATATTTAGATTZ (Marcador-nt 3379-3398)

(ID. DE SEQ. N°: 61)

Vpara 8: TCCATATGACCCAGAGCACCA (nt 3262-3282) (ID. DE SEQ. N°: 88)

Vpara 9: TTTCCACTGGCATTGTGGC (Iniciador Anti-Senso-nt 3315-3333) (ID. DE SEQ. N°: 89)

Vpara 10: X TAAGGTGTTTTCTCCCGCAGCGAGT Z, onde X é Fam e Z é Tamra. (nt 3286-3310) (ID. DE SEQ. N°: 93)

A concentração de DNA de plasmídeo foi estimada de forma espectrofotométrica, e foi realizada diluição serial para se obter 5.000-10 cópias/20 µl. A mistura de reação em um volume final de 50 µl continha amostra de 20 µl, tampão de amplificação 1X Gold Taq (Perkin Elmer) com 3,2 mM $MgCl_2$, 300 µM de cada um dos dNTPs, 1 pmol de cada dos iniciadores de amplificação, 0,4 pmol do marcador, e 1 unidade de enzima AmpliTaq. As condições de reação incluíam 10 minutos a 95°C para ativar a enzima seguidos por 45 ciclos de 30 segundos a 95°C, alternando com 60°C em um Detector de Seqüência ABI 7700.

Usando o par de iniciador VSP1 e VSP2 que gerou um produto de PCR de 109 bp e o marcador VSPPR1, apenas 10 cópias/ensaio foram detectadas. Uma vez que o volume da amostra era 20 µl em um volume final de 50 µl, isso sugere que amostras de plasma contendo apenas 50 cópias/ml de DNA de parvovírus B19 poderiam ser extraídas e detectadas por tecnologia TaqMan™. Uma vez que parvovírus é um vírus de alta titulação, volumes de plasma/soro de 50 µl poderiam ser extraídos e usados para análise.

Usando a amostra positiva de DNA de parvovírus B19 FDA-CBER (10^6 cópias/ml) a tecnologia TaqMan™ detectou tantas pequenas quantidades como 50 cópias por ensaio. Em uma

tentativa de correlacionar o ácido nucléico e a titulação imune, a carga de DNA viral foi quantificada em várias amostras anticorpo-positivas.

Conseqüentemente, seqüências inéditas de parvovírus B19 humano e ensaios de detecção que usam essas seqüências foram revelados. A partir do precedente, será observado que, embora tenham sido aqui descritas modalidades específicas da invenção para fins de ilustração, várias modificações podem ser feitas sem se desviar do espírito e escopo desta.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



B696E43C6FC6F7AB

Campo 2



7EECCF95D5199731

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 122715e003.txt
- Data de Geração do Código: 14-01-2015
- Hora de Geração do Código: 09:34:58
- Código de Controle:
    - Campo 1: B696E43C6FC6F7AB
    - Campo 2: 7EECCF95D5199731

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detectar parvovírus B19 humano em uma amostra biológica, **caracterizado** pelo fato do método compreender:

(a) isolar ácidos nucléicos a partir de uma amostra biológica suspeita de conter DNA de parvovírus B19 humano, mediante o contato com glóbulos magnéticos compreendendo ácidos nucléicos de captura associados aos mesmos com a amostra biológica sob condições de hibridização, onde as sequências de ácido nucleico-alvo, se presentes na amostra biológica, hibridizam com os ácidos nucléicos de captura, em que os ácidos nucleicos de captura compreendem um ou mais oligonucleotídeos, selecionados a partir do grupo consistindo em SEQ ID Nos:49-55, e separação dos glóbulos magnéticos da amostra;

(b) amplificar os ácidos nucléicos usando um iniciador senso e um anti-senso onde cada um dos iniciadores não possui mais do que 60 nucleotídeos de comprimento, e é complementar a uma porção dos filamentos senso e anti-senso, respectivamente, do ácido nucleico isolado para hibridizar com o mesmo; em que (i) o iniciador senso compreende SEQ ID NO:60 e o iniciador anti-senso SEQ ID NO:59, ou (ii)o iniciador senso compreende SEQ ID NO:88 e o inciador anti-senso compreende SEQ ID NO:89; e

(c) detectar a presença de ácidos nucleicos amplificados utilizando um marcador de não mais do que 50 nucleotídeos de comprimento, e que compreende (i) a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:61 quando o iniciador senso compreender SEQ ID NO:60, ou (ii) a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:90 quando o iniciador senso compreender SEQ ID NO:88, como uma indicação da presença do parvovírus B19

humano na maostra;

em que os ácidos nucleicos de captura compreendem ainda uma cadeia homopolimérica para ligar os ácidos nucléicos de captura aos glóbulos magnéticos, tal cadeia homopolimérica sendo 20 poli A's na extremidade 3' contígua com os ditos ácidos nucleicos de captura.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a amplificação compreende RT-PCR, amplificação mediada por transcrição, um ensaio fluorogênico de 5' nuclease, ou uma combinação dos mesmos.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a amplificação compreende um ensaio fluorogênico de 5' nuclease usando o iniciador senso e o iniciador anti-senso, e a detecção é feita usando pelo menos um marcador compreendendo um rótulo detectável.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que o rótulo detectável é selecionado a partir do grupo consistindo em 6-carboxifluoresceína (6-FAM), tetrametil rodamina (TAMRA) e 2', 4', 5', 7',-tetracloro-4-7-diclorofluoresceína (TET).

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que o marcador compreende ainda rótulos detectáveis na extremidade 5' e na extremidade 3'.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que uma sequência de controle interno está presente.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de controle interno é derivada da sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 92.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de compreender ainda uma sequência de marcador rotulado de forma detectável para a sequência de controle interno.

9. Kit para detectar parvovírus B19 humano em uma amostra biológica, o kit **caracterizado** pelo fato de compreender:

ácidos nucleicos de captura compreendendo um ou mais oligonucleotídeos selecionados a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 49-55;

um par de oligonucleotídeos iniciadores em que cada um dos oligonucleotídeos iniciadores não possui mais do que 60 nucleotídeos em comprimento e (i) um dos oligonucleotídeos iniciadores compreende SEQ ID NO: 60 e o outro oligonucleotídeo iniciador compreende SEQ ID NO: 59, ou (ii) um dos oligonucleotídeos iniciadores compreende SEQ ID NO: 88 e o outro oligonucleotídeo iniciador compreende SEQ ID NO: 89; e

instruções escritas para identificar a presença de parvovírus B19 humano.

10. Kit, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** por compreender ainda uma polimerase e tampões.

11. Kit, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** por compreender ainda pelo menos um oligonucleotídeo marcador compreendendo um rótulo detectável.

12. Kit, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato do rótulo detectável ser um rótulo fluorescente selecionado a partir do grupo consistindo em 6-carboxi-fluoresceína (6-FAM), tetrametil rodamina (TAMRA) e 2', 4', 5', 7',-tetracloro-4-7-diclorofluoresceína (TET).

13. Kit, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato do marcador compreender ainda rótulos detectáveis

na extremidade 5′ e na extremidade 3′.

14. Kit, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de pelo menos um marcador não possuir mais do que 50 nucleotídeos em comprimento e compreender (i) a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 61 quando um dos oligonucleotídeos iniciadores compreender SEQ. ID NO: 60, ou (ii) a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 90 quando um dos oligonucleotídeos iniciadores compreender SEQ ID NO: 88.

15. Kit, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de compreender ainda um controle interno derivado da sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 92.

PARVOVÍRUS B-19 HUMANO

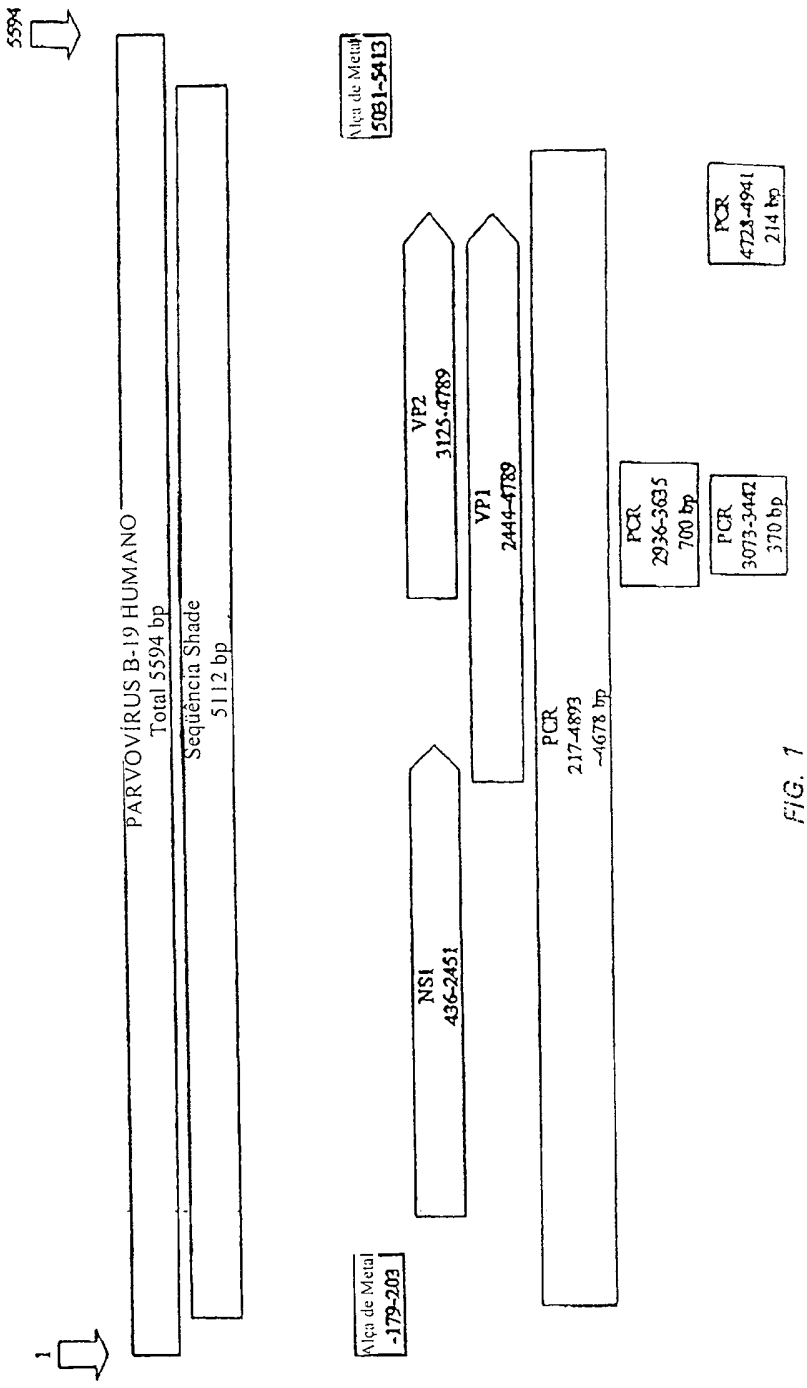


FIG. 1

CH47-26

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaact
ctgtaacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttgtttttttcacctttagagtttcagcatttaattgaaaact
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggagtacaagttactgacagcactaccgggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2A

CH48-29

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaacaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggtggcagtaatcctgccaaaagcatgtggagtgaggggccactttactgccaact
ctgtaacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactca
actccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
agggggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcctgttagtagaccatgaatacaagtacc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2B

CH33-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaacaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggtggcagtaatcctgccaaaagcatgtggagtgagggggccacttttactgccaact
ctgtaacttgtacattttccagacagttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactca
actccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
agggggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcttgttagtagaccatgaatacaagtacc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2C

CH33-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaacatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggtggcagtaatcctgccaaaagcatgtggagtgagggggccacttttactgccaact
ctgtaacttgtacattttccagacagttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactca
actccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
agggggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcctgttagtagaccatgaatacaagtacc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2D

CH33-4

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggtggcagtaatcctgccaaaagcatgtggagtgaggggccactttactgccaact
ctgtaacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactca
actccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
agggggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcctgttagtagaccatgaatacaagtacc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2E

CH42-7

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgaggggccactttttagtgccaac
tctgtaacttgtacattttccaggcagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2F

CH42-18

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaac
tctgtaacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2G

CH42-19

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaac
tctgtaacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2H

CH46-23

attaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
ncacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaac
tctgtaacttgtacattttccaggcagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggagggggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2I

CH1-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaac
tctgtaacttgtacattttccagacagttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggagggggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2J

CH1-6

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccatttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaac
tctgtaacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2K

CH2-8

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccatttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaac
tctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2L

CH2-10

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaac
tctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacagaactg
gagggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2M

H2-11C

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaac
tctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gagggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2N

CH5-13

ctaaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaact
ctgtaacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaagaggcaaaggtttgcactattagtcccataatgggatactca
accccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaattat
ggcagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactgg
agggggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtacc
caatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2O

CH7-22

ataaatccatgtactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaact
ctgtaacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttgttttttcacctttagagtttcagcatttaattgaaaact
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gagggggagtacaagttactgacagcactaccgggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2P

CH13-27

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaattctgtcaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgctaact
ctgtaacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcgagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccatcagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2Q

CH14-33

ataaatccatatactcattggactgtggcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaactc
tgtaacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgcag
caagtagctgccacaatgccagtggaaaagaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactcaa
ccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaattatg
gtagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaagatgttacagacaaaactggag
gggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtggaccatgaatacaagtaccca
tatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2R

CH62-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcaattaattctgcagaagccagcact
ggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaact
ctgtaacttgtacaktttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gccagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagcicctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggtacaggttactgacagcactacaggccgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2S

CH64-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaact
ctgtaacttgtacatttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttcgcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatacttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2T

CH67-2

ataaatccatatactcattggactgtggcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaact
ctgtaacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaagaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaagatgttacagacaaaactg
gaggggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtggaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 2U

clone 2-B1 de parvovírus B19

```
   1 cccgccttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt
  61 ttgtaacggt taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact
 121 gccgcagctc tttctttctg ggctgctttt ttcctggact tacttgctgt tttttgtgag
 181 ctaactaaca ggtatttata ctacttgtta acatactaac atggagctat ttagaggggt
 241 gcttcaagtt tcttctaatg ttctggactg tgctaacgat aactggtggt gctctttact
 301 ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcatact aacagactaa tggcaatata
 361 cttaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta
 421 ctttttttcaa gtagaatgta acaaatttga agaaggctat catattcatg tggttattgg
 481 ggggccaggg ttaaacccca gaaacctcac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt
 541 actttatcac cttgtaactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa
 601 aggcaaatac tttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc
 661 tttaaatgtt gtatggtgtg ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctgc
 721 tacttttaga aagggagctt gccatgccaa gaaaccccgc atcaccacag ccataaatga
 781 tactagtact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggttgtgc catttaatgg
 841 gaagggaact aaggctagca taaagtttca aactatggta aactggttgt gtgaaaacag
 901 agtgtttaca gaggataagt ggaaactagt tgactttaac cagtacactt tactaagcag
 961 tagtcacagt ggaagttttc aaattcaaag tgcactaaaa ctagcaattt ataaagcaac
1021 taatttagtg cctactagca catttttatt gcatacagac tttgagcaag ttatgtgtat
1081 taaaaacaat aaaattgtta aattgttact ttgtcaaaac tatgaccccc tattagtggg
1141 gcagcatgtg ttaaagtgga ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtggtttta
1201 tgggccgcca agtacaggga aaacaaactt ggcaatggcc attgctaaaa gtgttccagt
1261 atatggcatg gttaactgga ataatgaaaa ctttccattt aatgatgtag caggaaaaag
1321 cttggtggtc tgggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat
1381 tttaggcggg caacccacca gggtagatca aaaaatgcgt ggaagtgtag ctgtgcctgg
1441 agtacctgtg gttataacca gcaatggtga cattactttt gttgtaagcg ggaacactac
1501 aacaactgta catgctaaag ccttaaaaga gcgcatggta aagttaaact ttactgtaag
1561 atgcagccct gacatggggt tactaacaga ggctgatgta caacagtggc ttacatggtg
1621 taatgcacaa agctgggacc actatgaaaa ctgggcaata aactacactt ttgatttccc
1681 tggaattaat gcagatgccc tccacccaga cctccaaacc accccaattg tcacagacac
1741 cagtatcagc agcagtggtg gtgaaagctc tgaagaactc agtgaaagca gctttttttaa
1801 cctcatcacc ccaggcgcct ggaacactga aaccccgcgc tctagtacgc ccatccccgg
1861 gaccagttca ggagaatcat ctgtcggaag cccagtttcc tccgaagttg tagctgcatc
1921 gtgggaagaa gccttctaca caccttggc agaccagttt cgtgaactgt tagttggggt
1981 tgattatgtg tgggacggtg taaggggttt acctgtctgt tgtgtgcaac atattaacaa
```

FIG. 3A

2041 tagtggggga ggcttgggac tttgtcccca ttgcattaat gtaggggctt ggtataatgg
2101 atggaaattt cgagaattta ccccagattt ggtgcgatgt agctgccatg tgggagcttc
2161 taatcccttt tctgtgctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgcaaagctt
2221 tgtagattat gagtaaagaa agtggcaaat ggtgggaaag tgatgataaa tttgctaaag
2281 ctgtgtatca gcaatttgtg gaattttatg aaaaggttac tggaacagac ttagagctta
2341 ttcaaatatt aaaagatcat tataatattt ctttagataa tcccctagaa aaccccatcct
2401 ctttgtttga cttagttgct cgtattaaaa ataaccttaa aaactctcca gacttatata
2461 gtcatcattt tcaaagtcat ggacagttat ctgaccaccc ccatgccttа tcatccagta
2521 gcagtcatgc agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc
2581 ctgggcaagt tagcgtacaa ctacccggta ctaactatgt tgggcctggc aatgagctac
2641 aagctgggcc cccgcaaagt gctgttgaca gtgctgcaag gattcatgac tttaggtata
2701 gccaactggc taagttggga ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc
2761 ttttaaaaaa tataaaaaat gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta
2821 ctttaaaagg tgcagctgcc cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg
2881 cttacaacgc ctcagaaaaa tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca
2941 ctggtgcagg agggggggggc agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt
3001 ttagtgccaa ctctgtaact tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgacccag
3061 agcaccatta taaggtgttt tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg
3121 aggcaaaggt ttgcaccatt agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag
3181 attttaatgc tttaaattta ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt
3241 atggaagtat agctcctgat gctttaactg taaccatatc agaaattgct gttaaggatg
3301 ttacggacaa aactggaggg ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca
3361 tgttagtaga ccatgaatat aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcaa gatactttag
3421 ccccagaact tcctatttgg gtatacttтc cccctcaata cgcttactta acagtaggag
3481 atgttaacac acaaggaatt tctggagaca gcaaaaaatt ggcaagtgaa gaatcagcat
3541 tttatgtttt ggaacacagt tcttttcagc ttttaggtac aggaggtaca gcaactatgt
3601 cttataagtt tcctccagtg cccccagaaa atttagaggg ctgcagtcaa cacttttatg
3661 aaatgtacaa ccccttatac ggatcccgct taggggttcc tgacacatta ggaggtgacc
3721 caaaatttag atctttaaca catgaagacc atgcaattca gccccaaaac ttcatgccag
3781 ggccactagt aaactcagtg tctacaaagg agggagacag ctctagtact ggagctggaa
3841 aagccttaac aggccttagc acaggtacct ctcaaaacac tagaatatcc ttacgccctg
3901 ggccagtgtc tcagccgtac caccactggg acacagataa atatgtcaca ggaataaatg
3961 ccatttctca tggtcagacc acttatggta acgctgaaga caaagagtat cagcaaggag
4021 tgggtagatt tccaaatgaa aaagaacagc taaaacagtt acagggttta aacatgcaca
4081 cctactttcc caataaagga acccagcaat atacagatca aattgagcgc cccctaatgg
4141 tgggttctgt atggaacaga agagcccttc actatgaaag ccagctgtgg agtaaaattc
4201 caaatttaga tgacagtttt aaaactcagt ttgcagcctt aggaggatgg ggtttgcatc

FIG. 3B

4261 agccacctcc tcaaatattt ttaaaaatat taccacaaag tgggccaatt ggaggtatta
4321 aatcaatggg aattactacc ttagttcagt atgccgtggg aattatgaca gtaaccatga
4381 catttaaatt ggggccccgt aaagctacgg gacggtggaa tcctcaacct ggagtgtatc
4441 ccccgcacgc agcaggtcat ttaccatatg tactatatga ccccacagct acagatgcaa
4501 aacaacacca cagacatgga tatgaaaagc ctgaagaatt gtggacagcc aaaagccgtg
4561 tgcacccatt gtaaacactc cccaccgtgc cctcagccag gatgtgtaac taaacgccca
4621 ccagtaccac ccagactgta cctgcccccc cctataccta taagacagcc taacacaa

FIG. 3C

clone 2-B6 de parvovirus B19

1 cccgccttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt
61 ttgtaacggt taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact
121 gccgcagctc tttctttctg ggctgctttt ttcctggact tacttgctgt tttttgtgag
181 ctaactaaca ggtatttata ctacttgtta acatactaac atggagctat ttagaggggt
241 gcttcaagtt tcttctaatg ttctggactg tgctaacgat aactggtggt gctctttact
301 ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcatact aacagactaa tggcaatata
361 cttaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta
421 ctttttttcaa gtagaatgta acaaatttga agaaggctat catattcatg tggttattgg
481 ggggccaggg ttaaacccca gaaacctcac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt
541 actttatcac cttgtaactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa
601 aggcaaatac tttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc
661 tttaaatgtt gtatggtgtg ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctgc
721 tacttttaga aagggagctt gccatgccaa gaaaccccgc atcaccacag ccataaatga
781 tactagtact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggttgtgc catttaatgg
841 gaagggaact aaggctagca taaagtttca aactatggta aactggttgt gtgaaaacag
901 agtgtttaca gaggataagt ggaaactagt tgactttaac cagtacactt tactaagcag
961 tagtcacagt ggaagttttc aaattcaaag tgcactaaaa ctagcaattt ataaagcaac
1021 taatttagtg cctactagca catttttatt gcatacagac tttgagcaag ttatgtgtat
1081 taaagacaat aaaattgtta aattgttact ttgtcaaaac tatgacccca tattagtggg
1141 gcagcatgtg ttaaagtgga ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtggtttta
1201 tggaccgcca agtacaggga aaacaaactt ggcaatggcc attgctaaaa gtgttccagt
1261 atatggcatg gttaactgga ataatgaaaa ctttccattt aatgatgtag caggaaaaag
1321 cttggtggtc tgggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat
1381 tttaggcggg caacccacca gggtagatca aaaaatgcgt ggaagtgtag ctgtgcctgg
1441 agtacccgtg gttataacca gcaatggtga cattactttt gttgtaagcg ggaacactac
1501 aacaactgta catgctaaag ccttaaaaga gcgcatggta aagttaaact ttactgtaag
1561 atgcagcccc gacatggggt tactaacaga ggctgatgta caacagtggc ttacatggtg
1621 taatgcacaa agctgggacc actatgaaaa ctgggcaata aactacactt ttgatttccc
1681 tggaattaat gcagatgccc tccacccaga cctccaaacc accccaattg tcacagacac
1741 cagtatcagc agcagtggtg gtgaaagctc tgaagaactc agtgaaagca gctttttttaa
1801 cctcatcacc ccaggcgcct ggaacactga aaccccgcgc tctagtacgc ccatccccgg
1861 gaccagttca ggagaatcat ctgtcggaag cccagtttcc tccgaagttg tagctgcatc
1921 gtgggaagaa gccttctaca caccttggc agaccagttt cgtgaactgt tagttggggt
1981 tgattatgtg tgggacggtg taaggggttt acctgtctgt tgtgtgcaac atattaacaa
2041 tagtgggggga ggcttgggac tttgtcccca ttgcattaat gtaggggctt ggtataatgg

FIG. 4A

2101 atggaaattt cgagaattta ccccagattt ggtgcgatgt agctgccatg tgggagcttc
2161 taatcccttt tctgtgctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgcaaagctt
2221 tgtagattat gagtaaagaa agtggcaaat ggtgggaaag tgatgataaa tttgctaaag
2281 ctgtgtatca gcaatttgtg gaattttatg aaaaggttac tggaacagac ttagagctta
2341 ttcaaatatt aaaagatcat tataatattt ctttagataa tcccctagaa aacccatcct
2401 ctttgtttga cttagttgct cgtattaaaa ataaccttaa aaactctcca gacttatata
2461 gtcatcattt tcaaagtcat ggacagttat ctgaccaccc ccatgcctta tcatccagta
2521 gcagtcatgc agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc
2581 ctgggcaagt tagcgtacaa ctacccggta ctaactatgt tgggcctggc aatgagctac
2641 aagctgggcc cccgcaaagt gctgttgaca gtgctgcaag gattcatgac tttaggtata
2701 gccaactggc taagttggga ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc
2761 ttttaaaaaa tataaaaaat gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta
2821 ctttaaaagg tgcagctgcc cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg
2881 cttacaacgc ctcagaaaaa tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca
2941 ctggtgcagg aggggggggc agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt
3001 ttagtgccaa ctctgtaact tgtacatttt ccagacaatt tttaattcca tatgacccag
3061 agcaccatta taaggtgttt tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg
3121 aggcaaaggt ttgcaccatt agtcccataa tgggatactc aacccccatgg agatatttag
3181 attttaatgc tttaaattta ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt
3241 atggaagtat agctcctgat gctttaactg taaccatatc agaaattgct gttaaggatg
3301 ttacaaacaa aactggaggg ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca
3361 tgttagtaga ccatgaatat aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcaa gatactttag
3421 ccccagaact tcctatttgg gtatacttte ccctcaata cgcttactta acagtaggag
3481 atgttaacac acaaggaatt tctggagaca gcaaaaaatt ggcaagtgaa gaatcagcat
3541 tttatgtttt ggaacacagt tcttttcagc ttttaggtac aggaggtaca gcaactatgt
3601 cttataagtt tcctccagtg cccccagaaa atttagaggg ctgcagtcaa cacttttatg
3661 aaatgtacaa cccccttatac ggatcccgct taggggttcc tgacacatta ggaggtgacc
3721 caaaatttag atctttaaca catgaagacc atgcaattca gccccaaaac ttcatgccag
3781 ggccactagt aaactcagtg tctacaaagg agggagacag ctctagtact ggagctggaa
3841 aagccttaac aggccttagc acaggtacct ctcaaaacac tagaatatcc ttacgccctg
3901 ggccagtgtc tcagccgtac caccactggg acacagataa atatgtcaca ggaataaatg
3961 ccatttctca tggtcagacc acttatggta acgctgaaga caaagagtat cagcaaggag
4021 tgggtagatt tccaaatgaa aaagaacagc taaaacagtt acagggttta aacatgcaca
4081 cctactttcc caataaagga acccagcaat atacagatca aattgagcgc ccccctaatgg
4141 tgggttctgt atggaacaga agagcccttc actatgaaag ccagctgtgg agtaaaattc
4201 caaatttaga tgacagtttt aaaactcagt ttgcagcctt aggaggatgg ggtttgcatc
4261 agccacctcc tcaaatattt ttaaaaatat taccacaaag tgggccaatt ggaggtatta

FIG. 4B

4321 aatcaatggg aattactacc ttagttcagt atgccgtggg aattatgaca gtaaccatga
4381 catttaaatt ggggccccgt aaagctacgg gacggtggaa tcctcaacct ggagtgtatc
4441 ccccgcacgc agcaggtcat ttaccatatg tactatatga ccccacagct acagatgcaa
4501 aacaacacca cagacatgga tatgaaaagc ctgaagaatt gtggacagcc aaaagccgtg
4561 tgcacccatt gtaaacactc cccaccgtgc cctcagccag gatgtgtaac taaacgccca
4621 ccagtaccac ccagactgta cctgcccccc cctataccta taagacagcc taacacaa

FIG. 4C

clone B1-NS1 de seqüência simples de DNA

atactcttcgaacaaaacaaaatggagctatttagaggggtgcttcaagtttcttctaatgttctggactgtgctaacgataactggtggtgctctt
tactggatttagacacttctgactgggaaccactaactcatactaacagactaatggcaatatacttaagcagtgtggcttctaagcttgacttta
ctgggggggccactagcagggtgcttgtacttttttcaagtagaatgtaacaaatttgaagaaggctatcatattcatgtggttattgggggggcca
gggttaaaccccagaaacctcacagtgtgtgtagaggggttatttaataatgtactttatcaccttgtaactgaaaatctgaagctaaaatttttgc
caggaatgactacaaaaggcaaatactttagagatggagagcagtttatagaaaactatttaatgaaaaaaatacctttaaatgttgtatggtgt
gttactaatattgatggacatatagatacctgtatttctgctacttttagaaagggagcttgccatgccaagaaaccccgcatcaccacagccat
aaatgatactagtactgatgctggggagtctagcggcacaggggcagaggttgtgccatttaatgggaagggaactaaggctagcataaag
tttcaaactatggtaaactggttgtgtgaaaacagagtgtttacagaggataagtggaaactagttgactttaaccagtacactttactaagcagt
agtcacagtggaagttttcaaattcaaagtgcactaaaactagcaatttataaagcaactaatttagtgcctactagcacatttttattgcatacag
actttgagcaagttatgtgtattaaaaacaataaaattgttaaattgttactttgtcaaaactatgacccccctattagtggggcagcatgtgttaaag
tggattgataaaaaatgtggcaagaaaaacacactgtggttttatgggccgccaagtacagggaaaacaaacttggcaatggccattgctaa
aagtgttccagtatatggcatggttaactggaataatgaaaactttccatttaatgatgtagcaggaaaaagcttggtggtctgggatgaag
gtattattaagtctacaattgtagaagctgcaaaagccatttaggcgggcaacccaccagggtagatcaaaaaatgcgtggaagtgtagctg
tgcctggagtacctgtggttataaccagcaatggtgacattacttttgttgtaagcgggaacactacaacaactgtacatgctaaagccttaaaa
gagcgcatggtaaagttaaactttactgtaagatgcagccctgacatggggttactaacagaggctgatgtacaacagtggcttacatggtgt
aatgcacaaagctgggaccactatgaaaactgggcaataaactacacttttgatttccctggaattaatgcagatgccctccacccagacctcc
aaaccaccccaattgtcacagacaccagtatcagcagcagtggtggtgaaagctctgaagaactcagtgaaagcagctttttaacctcatca
ccccaggcgcctggaacactgaaaccccgcgctctagtacgcccatccccgggaccagttcaggagaatcatctgtcggaagcccagtttc
ctccgaagttgtagctgcatcgtgggaagaagccttctacacaccttggcagaccagtttcgtgaactgttagttggggttgattatgtgtggg
acggtgtaaggggtttacctgtctgttgtgtgcaacatattaacaatagtgggggaggcttgggactttgtccccattgcattaatgtaggggct
tggtataatggatggaaatttcgagaatttaccccagatttggtgcgatgtagctgccatgtgggagcttctaatccctttttctgtgctaacctgca
aaaaatgtgcttacctgtctggattgcaaagctttgtagattatgagtaagtcgacatactc

FIG. 5A

clone B1-NS1 de seqüência de aminoácido

MELFRGVLQVSSNVLDCANDNWWCSLLDLDTSDWEPLTHTNRLMAIYLSSVAS
KLDFTGGPLAGCLYFFQVECNKFEEGYHIHVVIGGPGLNPRNLTVCVEGLFNNVLYHLVT
ENLKLKFLPGMTTKGKYFRDGEQFIENYLMKKIPLNVVWCVTNIDGHIDTCISATFRKGA
CHAKKPRITTAINDTSTDAGESSGTGAEVVPFNGKGTKASIKFQTMVNWLCENRVFTEDK
WKLVDFNQYTLLSSSHSGSFQIQSALKLAIYKATNLVPTSTFLLHTDFEQVMCIKNNKIV
KLLLCQNYDPLLVGQHVLKWIDKKCGKKNTLWFYGPPSTGKTNLAMAIAKSVPVYGMVNW
NNENFPFNDVAGKSLVVWDEGIIKSTIVEAAKAILGGQPTRVDQKMRGSVAVPGVPVVIT
SNGDITFVVSGNTTTTVHAKALKERMVKLNFTVRCSPDMGLLTEADVQQWLTWCNAQSWD
HYENWAINYTFDFPGINADALHPDLQTTPIVTDTSISSSGGESSEELSESSFFNLITPGA
WNTETPRSSTPIPGTSSGESSVGSPVSSEVVAASWEEAFYTPLADQFRELLVGVDYVWDG
VRGLPVCCVQHINNSGGGLGLCPHCINVGAWYNGWKFREFTPDLVRCSCHVGASNPFSVL
TCKKCAYLSGLQSFVDYE

FIG. 5B

B1 VP1 de seqüência simples de DNA

atactcaagcttacaaaacaaaatgagtaaagaaagtggcaaatggtgggaaagtgatgataaatttgctaaagctgtgtatcagcaatttgtggaatttta
tgaaaaggttactggaacagacttagagcttattcaaatattaaaagatcattataatatttctttagataatccccctag
aaaacccatcctctttgtttgacttagttgctcgtattaaaaataaccttaaaaactctccagacttatatagtcatcat
tttcaaagtcatggacagttatctgaccacccccatgccttatcatccagtagcagtcatgcagaacctagaggagaaga
tgcagtattatctagtgaagacttacacaagcctgggcaagttagcgtacaactacccggtactaactatgttgggcctg
gcaatgagctacaagctgggccccgcaaagtgctgttgacagtgctgcaaggattcatgactttaggtatagccaactg
gctaagttgggaataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgg
gtttcaagcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaatctgcagaagccagcactggtgca
ggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaactctgtaacttgtacatt
ttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgcagcaagtagctgccacaatg
ccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactcaaccccatggagatatttagattttaat
gctttaaattattttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaattatggaagtatagctcctgatgctttaac
tgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactggaggggggtgcaggttactgacagcactacag
ggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagtacccatatgtgttagggcaaggtcaagatactttagccccagaa
cttcctatttgggtatactttccccctcaatacgcttacttaacagtaggagatgttaacacacaaggaatttctggaga
cagcaaaaaattggcaagtgaagaatcagcatttatgtttggaacacagttcttttcagcttttaggtacaggaggta
cagcaactatgtcttataagtttcctccagtgccccagaaaatttagagggctgcagtcaacacttttatgaaatgtac
aaccccttatacggatcccgcttaggggttcctgacacattaggaggtgacccaaaatttagatctttaacacatgaaga
ccatgcaattcagccccaaaacttcatgccagggccactagtaaactcagtgtctacaaaggagggagacagctctagta
ctggagctggaaaagccttaacaggcctagcacaggtacctctcaaaacactagaatatccttacgcctgggccagtg
tctcagccgtaccaccactgggacacagataaatatgtcacaggaataaatgccatttctcatggtcagaccacttatgg
taacgctgaagacaaagagtatcagcaaggagtgggtagatttccaaatgaaaaagaacagctaaaacagttacagggtt
taaacatgcacacctactttcccaataaaggaacccagcaatatacagatcaaattgagcgccccctaatggtgggttct
gtatggaacagaagagccctcactatgaaagccagctgtggagtaaaattccaaatttagatgacagttttaaaactca
gtttgcagccttaggaggatggggtttgcatcagccacctcctcaaatatttttaaaaatattaccacaaagtgggccaa
ttggaggtattaaatcaatgggaattactacttagttcagtatgccgtgggaattatgacagtaaccatgacatttaaa
ttggggccccgtaaagctacgggacggtggaatcctcaacctggagtgtatccccgcacgcagcaggtcatttaccata
tgtactatatgaccccacagctacagatgcaaaacaacaccacagacatggatatgaaaagcctgaagaattgtggacag
ccaaaagccgtgtgcacccattgtaagtcgacatactc

FIG. 6A

B1 VP1 de seqüência de aminoácido

MSKESGKWVNESDDKFAKAVYQQFVEFYEKVTGTDLELIQILKDHYNISLDNPL
ENPSSLFDLVARIKNNLKNSPDLYSHHFQSHGQLSDHPHALSSSSSHAEPRGEDAVLSSE
DLHKPGQVSVQLPGTNYVGPGNELQAGPPQSAVDSAARIHDFRYSQLAKLGINPYTHWTV
ADEELLKNIKNETGFQAQVVKDYFTLKGAAAPVAHFQGSLPEVPAYNASEKYPSMTSVNS
AEASTGAGGGGSNPVKSMVSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHN
ASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGSIAPDALTVTISEI
AVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDTLAPELPIWVYFPPQYAY
~~LTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPPVPPENLEGCS~~
QHFYEMYNPLYGSRLGVPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMPGPLVNSVSTKEGDSSS
TGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKE
YQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVGSVWNRRALHYESQL
WSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGITTLVQYAVGIM
TVTMTFKLGPRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHHRHGYEKPEELWT
AKSRVHPL

FIG. 6B

B1 VP2 de seqüência simples de DNA

atactcaagcttacaaaacaaaatgacttcagttaattctgcagaagccagcactggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggc
cacttttagtgccaactctgtaacttgtacatttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccatt
ataaggtgttttctcccgcagcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccata
atgggatactcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcactt
aattgaaaattatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggaca
aaactggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagtaccca
tatgtgttagggcaaggtcaagatactttagccccagaacttcctatttgggtatactttcccccctcaatacgcttactt
aacagtaggagatgttaacacacaaggaatttctggagacagcaaaaaattggcaagtgaagaatcagcattttatgttt
tggaacacagttcttttcagcttttaggtacaggaggtacagcaactatgtcttataagtttcctccagtgccccccagaa
aatttagagggctgcagtcaacacttttatgaaatgtacaacccctatacggatcccgcttaggggttcctgacacatt
aggaggtgacccaaaatttagatctttaacacatgaagaccatgcaattcagccccaaaacttcatgccagggccactag
taaactcagtgtctacaaaggagggagacagctctagtactggagctggaaaagccttaacaggccttagcacaggtacc
tctcaaaacactagaatatccttacgccctgggccagtgtctcagccgtaccaccactgggacacagataaatatgtcac
aggaataaatgccatttctcatggtcagaccacttatggtaacgctgaagacaaagagtatcagcaaggagtgggtagat
ttccaaatgaaaaagaacagctaaaacagttacagggtttaaacatgcacacctactttcccaataaaggaacccagcaa
tatacagatcaaattgagcgccccctaatggtgggttctgtatggaacagaagagcccttcactatgaaagccagctgtg
gagtaaaattccaaatttagatgacagttttaaaactcagtttgcagccttaggaggatggggtttgcatcagccacctc
ctcaaatatttttaaaaatattaccacaaagtgggccaattggaggtattaaatcaatgggaattactaccttagttcag
tatgccgtgggaattatgacagtaaccatgacatttaaattggggccccgtaaagctacgggacggtggaatcctcaacc
tggagtgtatccccccgcacgcagcaggtcatttaccatatgtactatatgaccccacagctacagatgcaaaacaacacc
acagacatggatatgaaaagcctgaagaattgtggacagccaaaagccgtgtgcacccattgtaagtcgacatactc

FIG. 7A

B1 VP2 de seqüência de aminoácido

MTSVNSAEASTGAGGGGSNPVKSMWSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHH
YKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGS
IAPDALTVTISEIAVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDTLAPE
LPIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYK
FPPVPPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRLGVPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMPGPL
VNSVSTKEGDSSSTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGINAIS
HGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVGS
VWNRRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSM
GITTLVQYAVGIMTVTMTFKLGPRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQH
HRHGYEKPEELWTAKSRVHPL

FIG. 7B

B6 NS1 de seqüência simples de DNA

atactcttcgaacaaaacaaaatggagctatttagaggggtgcttcaagtttcttctaatgttctggactgtgctaacgataactggtggtgctctt
tactggatttagacacttctgactgggaaccactaactcatactaacagactaatggcaatatacttaagcagtgtggcttctaagcttgacttta
ctgggggggccactagcagggtgcttgtacttttttcaagtagaatgtaacaaatttgaagaaggctatcatattcatgtggttattgggggggcca
gggttaaaccccagaaacctcacagtgtgtgtagaggggttatttaataatgtactttatcaccttgtaactgaaaatctgaagctaaaatttttgc
caggaatgactacaaaaggcaaatactttagagatggagagcagtttatagaaaactatttaatgaaaaaaatacctttaaatgttgtatggtgt
gttactaatattgatggacatatagatacctgtatttctgctacttttagaaagggagcttgccatgccaagaaaccccgcatcaccacagccat
aaatgatactagtactgatgctggggagtctagcggcacaggggcagaggttgtgccatttaatgggaagggaactaaggctagcataaag
tttcaaactatggtaaactggttgtgtgaaaacagagtgtttacagaggataagtggaaactagttgactttaaccagtacactttactaagcagt
agtcacagtggaagttttcaaattcaaagtgcactaaaactagcaatttataaagcaactaatttagtgcctactagcacatttttattgcatacag
actttgagcaagttatgtgtattaaagacaataaaattgttaaattgttactttgtcaaaactatgacccccctattagtggggcagcatgtgttaaag
tggattgataaaaaatgtggcaagaaaaacacactgtggttttatggaccgccaagtacagggaaaacaaacttggcaatggccattgctaa
aagtgttccagtatatggcatggttaactggaataatgaaaactttccatttaatgatgtagcaggaaaaagcttggtggtctgggatgaaggta
ttattaagtctacaattgtagaagctgcaaaagccattttaggcgggcaacccaccagggtagatcaaaaaatgcgtggaagtgtagctgtgc
ctggagtacccgtggttataaccagcaatggtgacattacttttgttgtaagcgggaacactacaacaactgtacatgctaaagccttaaaaga
gcgcatggtaaagttaaactttactgtaagatgcagccctgacatggggttactaacagaggctgatgtacaacagtggcttacatggtgtaat
gcacaaagctgggaccactatgaaaactgggcaataaactacacttttgatttccctggaattaatgcagatgccctccacccagacctccaa
accaccccaattgtcacagacaccagtatcagcagcagtggtggtgaaagctctgaagaactcagtgaaagcagctttttaacctcatcacc
ccaggcgcctggaacactgaaaccccgcgctctagtacgcccatccccgggaccagttcaggagaatcatctgtcggaagcccagtttcc
tccgaagttgtagctgcatcgtgggaagaagccttctacacacctttggcagaccagtttcgtgaactgttagttggggttgattatgtgtggga
cggtgtaaggggtttacctgtctgttgtgtgcaacatattaacaatagtgggggaggcttgggactttgtccccattgcattaatgtaggggctt
ggtataatggatggaaatttcgagaatttaccccagatttggtgcgatgtagctgccatgtgggagcttctaatccctttttctgtgctaacctgca
aaaaatgtgcttacctgtctggattgcaaagctttgtagattatgagtaagtcgacatactc

FIG. 8A

B6 NS1 de seqüência de aminoácido

MELFRGVLQVSSNVLDCANDNWWCSLLDLDTSDWEPLTHTNRLMAIYLSSVAS
KLDFTGGPLAGCLYFFQVECNKFEEGYHIIHVVIGGPGLNPRNLTVCVEGLFNNVLYHLVT
ENLKLKFLPGMTTKGKYFRDGEQFIENYLMKKIPLNVVWCVTNIDGHIDTCISATFRKGA
CHAKKPRITTAINDTSTDAGESSGTGAEVVPFNGKGTKASIKFQTMVNWLCENRVFTEDK
WKLVDFNQYTLLSSSHSGSFQIQSALKLAIYKATNLVPTSTFLLHTDFEQVMCIKDNKIV
KLLLCQNYDPLLVGQHVLKWIDKKCGKKNTLWFYGPPSTGKTNLAMAIAKSVPVYGMVNW
NNENFPFNDVAGKSLVVWDEGIIKSTIVEAAKAILGGQPTRVDQKMRGSVAVPGVPVVIT
SNGDITFVVSGNTTTTVHAKALKERMVKLNFTVRCSPDMGLLTEADVQQWLTWCNAQSWD
HYENWAINYTFDFPGINADALHPDLQTTPIVTDTSISSSGGESSEELSESSFFNLITPGA
WNTETPRSSTPIPGTSSGESSVGSPVSSEVVAASWEEAFYTPLADQFRELLVGVDYVWDG
VRGLPVCCVQHINNSGGGLGLCPHCINVGAWYNGWKFREFTPDLVRCSCHVGASNPFSVL
TCKKCAYLSGLQSFVDYE

FIG. 8B

B6 VP1 de seqüência simples de DNA

atactcaagcttacaaaacaaaatgagtaaagaaagtggcaaatggtgggaaagtgatgataaatttgctaaagctgtgtatcagcaatttgtg
gaattttatgaaaaggttactggaacagacttagagcttattcaaatattaaaagatcattataatatttctttagataatcccctagaaaacccatc
ctctttgtttgacttagttgctcgtattaaaaataaccttaaaaactctccagacttatatagtcatcattttcaaagtcatggacagttatctgaccac
ccccatgccttatcatccagtagcagtcatgcagaacctagaggagaagatgcagtattatctagtgaagacttacacaagcctgggcaagtt
agcgtacaactacccggtactaactatgttgggcctggcaatgagctacaagctgggcccccgcaaagtgctgttgacagtgctgcaaggat
tcatgactttaggtatagccaactggctaagttgggaataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaa
tgaaactgggtttcaagcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccccctgtggcccattttcaaggaagtttgccggaa
gttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcactggtgcaggaggggggggcagta
atcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccacttttagtgccaactctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccag
agcaccattataaggtgttttctcccgcagcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgg
gatactcaacccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaattatggaagtatagct
cctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacaaacaaaactggaggggggggtgcaggttactgacagcactaca
gggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagtacccatatgtgttagggcaaggtcaagatactttagccccagaacttcctatttgggt
atactttccccctcaatacgcttacttaacagtaggagatgttaacacacaaggaatttctggagacagcaaaaaattggcaagtgaagaatca
gcattttatgttttggaacacagttcttttcagcttttaggtacaggaggtacagcaactatgtcttataagtttcctccagtgcccccagaaaattt
agagggctgcagtcaacacttttatgaaatgtacaaccccttatacggatcccgcttaggggttcctgacacattaggaggtgacccaaaattt
agatctttaacacatgaagaccatgcaattcagccccaaaacttcatgccagggccactagtaaactcagtgtctacaaaggagggagacag
ctctagtactggagctggaaaagccttaacaggccttagcacaggtacctctcaaaacactagaatatccttacgccctgggccagtgtctca
gccgtaccaccactgggacacagataaatatgtcacaggaataaatgccatttctcatggtcagaccacttatggtaacgctgaagacaaag
agtatcagcaaggagtgggtagatttccaaatgaaaaagaacagctaaaacagttacagggtttaaacatgcacacctactttcccaataaag
gaacccagcaatatacagatcaaattgagcgcccctaatggtgggttctgtatggaacagaagagcccttcactatgaaagccagctgtgg
agtaaaattccaaatttagatgacagttttaaaactcagtttgcagccttaggaggatggggtttgcatcagccacctcctcaaatattCttaaaa
atattaccacaaagtgggccaa ttggaggtattaaatcaatgggaattactaccttagttcagtatgccgtgggaattatgacagtaaccatga
catttaaattggggcccccgtaaagctacgggacggtggaatcctcaacctggagtgtatccccccgcacgcagcaggtcatttaccata tgta
ctatatgaccccacagctacagatgcaaaacaacaccacagacatggatatgaaaagcctgaagaattgtggacagccaaaagccgt gtg
cacccattgtaagtcgacatactc

FIG. 9A

B6 VP1 de seqüência de aminoácido

MSKESGKWWESDDKFAKAVYQQFVEFYEKVTGTDLELIQILKDHYNISLDNPL
ENPSSLFDLVARIKNNLKNSPDLYSHHFQSHGQLSDHPHALSSSSSHAEPRGEDAVLSSE
DLHKPGQVSVQLPGTNYVGPGNELQAGPPQSAVDSAARIHDFRYSQLAKLGINPYTHWTV
ADEELLKNIKNETGFQAQVVKDYFTLKGAAAPVAHFQGSLPEVPAYNASEKYPSMTSVNS
AEASTGAGGGGSNPVKSMWSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHN
ASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGSIAPDALTVTISEI
AVKDVTNKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDTLAPELPIWVYFPPQYAY
LTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPPVPPENLEGCS
QHFYEMYNPLYGSRLGVPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMPGPLVNSVSTKEGDSSS
TGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKE
YQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVGSVWNRRALHYESQL
WSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGITTLVQYAVGIM
TVTMTFKLGPRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHHRHGYEKPEELWT
AKSRVHPL

FIG. 9B

B6 VP2 de seqüência simples de DNA

atactcaagcttacaaaacaaaatgacttcagttaattctgcagaagccagcactggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggc
cacttttagtgccaactctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccatt
ataaggtgttttctcccgcagcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccata
atgggatactcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcaccttagagtttcagcactt
aattgaaaattatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacaaaca
aaactggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagtaccca
tatgtgttagggcaaggtcaagatactttagccccagaacttcctatttgggtatactttccccctcaatacgcttactt
aacagtaggagatgttaacacacaaggaatttctggagacagcaaaaaattggcaagtgaagaatcagcattttatgttt
tggaacacagttcttttcagcttttaggtacaggaggtacagcaactatgtcttataagtttcctccagtgccccccagaa
aatttagagggctgcagtcaacacttttatgaaatgtacaaccccttatacggatcccgcttaggggttcctgacacatt
aggaggtgacccaaaatttagatctttaacacatgaagaccatgcaatttcagccccaaaacttcatgccagggccactag
taaactcagtgtctacaaaggagggagacagctctagtactggagctggaaaagccttaacaggccttagcacaggtacc
tctcaaaacactagaatatccttacgccctgggccagtgtctcagccgtaccaccactgggacacagataaatatgtcac
aggaataaatgccatttctcatggtcagaccacttatggtaacgctgaagacaaagagtatcagcaaggagtgggtagat
ttccaaatgaaaaagaacagctaaaacagttacagggtttaaacatgcacacctactttcccaataaaggaacccagcaa
tatacagatcaaattgagcgccccctaatggtgggttctgtatggaacagaagagcccttcactatgaaagccagctgtg
gagtaaaattccaaatttagatgacagttttaaaactcagtttgcagccttaggaggatggggtttgcatcagccacctc
ctcaaatatttttaaaaatattaccacaaagtgggccaattggaggtattaaatcaatgggaattactaccttagttcag
tatgccgtgggaattatgacagtaaccatgacatttaaattggggccccgtaaagctacgggacggtggaatcctcaacc
tggagtgtatccccccgcacgcagcaggtcatttaccatatgtactatatgaccccacagctacagatgcaaaacaacacc
acagacatggatatgaaaagcctgaagaattgtggacagccaaaagccgtgtgcacccattgtaagtcgacatactc

FIG. 10A

B6 VP2 de seqüência de aminoácido

MTSVNSAEASTGAGGGGSNPVKSMWSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHH
YKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGS
IAPDALTVTISEIAVKDVTNKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDTLAPE
LPIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYK
FPPVPPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRLGVPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMPGPL
VNSVSTKEGDSSSTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGINAIS
HGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVGS
VWNRRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSM
GITTLVQYAVGIMTVTMTFKLGPRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQH
HRHGYEKPEELWTAKSRVHPL

FIG. 10B

CH80-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaact
ctgtaacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgtttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttgtttttttcacctttagagtttcagcatttaattgaaaact
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggagtacaagttactgacagcactaccgggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11A

CH81-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaact
ctgtaacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgtttcgcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatacttagatttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11B

B19SCL1-4

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11C

B19SCL2-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11D

B19SCL3-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gagggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11E

B19SCL4-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaac
tctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gagggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11F

B19SCL5-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgcc
ggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagcac
tggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaac
tctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatactc
aaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagtac
ccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11G

B19SCL6-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11H

B19SCL7-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccactttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11I

B19SCL8-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccactttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttaggttttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11J

B19SCL9-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcaattaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgaggggccacttttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccg
cagccagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatac
tcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaa
ttatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaac
tggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagt
acccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11K

B19SCL9-9

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccacttttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11L

B19SCL10-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttacttttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11M

B19SCL11-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttacttttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttat

FIG. 11N

B19SCL12-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgaggggccacttttagtgccaa
ctctgtgacttgtacattttccagacagtttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccg
cagcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtccgataatgggatac
tcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaa
ttatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggtgcaagttactgacagcagtacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11O

B19SCL13-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccacttttagtgccaa
ctctgtaacttgtgcattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccg
cagcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatac
tcaaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaa
ttatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaac
tggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagt
acccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11P

B19SCL14-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccacttttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11Q

B19SCL15-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccacttttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11R

B19SCL16-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccacttttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttat

FIG. 11S

B19SCL17-1

ataaatccatatacttattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccacttttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11T

B19SCL18-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11U

B19SCL19-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11V

B19SCL20-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccatttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11W

B19SCL21-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccatttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11X

B19SCL22-11

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcgggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatttagatttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11Y

B19SCL2-14

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaatataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggaagtttgc
cggaagttcccgcttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
ctggtgcaggaggggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccactttagtgccaa
ctctgtaacttgtacattttccagacaatttttaattccatatgacccagagcaccattataaggtgttttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaaaggtttgcaccattagtcccataatgggatact
caaccccatggagatatctagattttaatgctttaaatttatttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

FIG. 11Z

Figura 12

GAATTCACTTGTACATTTTCCAGACAATTTTTAATTCCATATGACCCAGAGCACCATTAT
ACAGTGACATGCAGGTCTAGCTCTGCCACAATGCCAGTGGAAAGGAGGCAAAGGTTTGCA
CCATTAGTCCCATAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATTTTAATGCTTTAA
ATTTATTTTTTTCACCTTTAGAGTTTCAGCACTTAATTGAAAATTATGGAAGTATAGCTC
CTGATGCTTTAACTGTAACCATATCAGAAATTGCTGTTAAGGATGTTACGGACAAAACTG
GAGGGGGGGTGCAGGTTACTGACAGCACTACAGGGCGCCTATGCATGTTAGTAGACCATG
AATATAAGTACCCATATGTGTTAGGGCAAGGTCAAGATACTTTAGCCCCAGAACTTCCTA
TTTGGGTATACTTTCCCCCTCAATACGCTTACTTAACAGTAGGAGATGTTAACACACAAG
GAATTTCTGGAGACAGCAAAAAATTGGCAAGTGAAGAATCAGCATTTTATGTTTTGGAAC
ACAGTTCTTTTCAGCTTTTAGGTACAGGAGGTACAGCAACTATGTCTTATAAGTTTCCTC
CAGTGCCCCCAGAAAATTTAGAGGGCTGCAGTCAACACTTTTATGAAATGTACAACCCCT
TATACGGATCCCGCTGTCGAC (SEQ ID NO.:92)

RESUMO

ENSAIOS BASEADOS EM ÁCIDO NUCLÉICO PARA SE DIAGNOSTICAR PRECISAMENTE INFECÇÃO POR PARVOVÍRUS B19 E INICIADORES E MARCADORES PARA USO NESSES ENSAIOS

A presente invenção é baseada na descoberta de iniciadores e marcadores únicos para uso em ensaios baseados em ácido nucléico, bem como no desenvolvimento de um teste diagnóstico baseado em ácido nucléico sensível, confiável, para a detecção de DNA de parvovírus B19 em amostras biológicas de indivíduos potencialmente infectados. As técnicas aqui descritas utilizam DNA extraído de amostra como um modelo para amplificação de regiões genômicas conservadas da sequência de B19 usando amplificação mediada por transcrição (TMA), bem como em um ensaio de 5' nuclease. Os métodos permitem a detecção de DNA de B19 em amostras virêmicas que têm titulações virais tão baixas quanto 10^3 partículas de vírus/ml. Consequentemente, amostras infectadas podem ser identificadas e excluídas de transfusão, bem como da preparação de derivados de sangue. Os marcadores e iniciadores aqui descritos também são úteis em, por exemplo, métodos-padrão de hibridização, bem como em técnicas baseadas em PCR, amplificação baseada em sequência de ácido nucléico (NASBA) e em ensaios que utilizam molécula de DNA ramificado. Kits para detecção de parvovírus humano em uma amostra biológica são também reveladas.