



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MICROARREGLO DE DNA  
PARA DETECCIÓN DE AGENTES VIRALES ASOCIADOS AL  
TRACTO GASTROINTESTINAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Doctor en Ciencias

PRESENTA:

**MIGUEL ANGEL MARTÍNEZ MERCADO**

TUTOR PRINCIPAL  
DR. PAVEL ISA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DR. JESÚS MARTÍNEZ BARNETCHE, MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOQUÍMICAS

MÉXICO, D. F.

MAYO, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de virología de los Dres. Carlos Arias y Susana López del Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt-UNAM) bajo la asesoría del Dr Pavel Isa. Durante la realización de este trabajo conté con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 204662. El proyecto fue desarrollado con un donativo otorgado por CONACyT número 111593. Este trabajo fue realizado en parte con el Cluster del IBt-UNAM que ha sido financiado con apoyo del Laboratorio Nacional de Respuesta a Enfermedades Emergentes, dentro del programa de Laboratorios Nacionales del CONACyT.

*Homo homini lupus*

- Plauto

Dedicada a mis padres, Cristina y Miguel

## **Agradecimientos**

A mis padres y familia

A Yamne por su amor y su apoyo

A mi tutor el Dr. Pavel Isa

A los Dres Susana López Charretón y Carlos F. Arias Ortiz por permitirme trabajar en su laboratorio

A los miembros del comité tutorial los Dres. Enrique Merino Pérez y Jesús Martínez Barnetche

Al M.C. Jérôme Verleyen por el apoyo con el uso del Cluster

A los doctores que amablemente nos donaron los virus y muestras utilizados, Dr. Juan Francisco Contreras Cordero, Dr. Ramón González García-Conde, Dra. Ana Lorena Gutiérrez, Dra. Rosa Ma. Del Angel, Dra. Rosa E. Sarmiento Silva, M.D. Terrence S. Dermody,

Al grupo del Dr. Charles Y. Chiu

A mis compañeros de laboratorio

A los miembros del jurado, Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos, Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, Dra. Rosa Victoria Pando Robles, Dr. Fidel Alejandro Sánchez Flores y el Dr. José Luis Puente García

# Índice

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>1</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>3</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>4</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>5</b>
Generalidades sobre gastroenteritis.....	5
Patógenos asociados a gastroenteritis.....	6
Detección de patógenos en casos de gastroenteritis.....	6
Pruebas de detección simultánea.....	7
Microarreglos.....	8
Componentes físicos del microarreglo: las sondas y el soporte.....	9
Procesamiento de la muestra.....	10
Hibridación y obtención de imágenes.....	11
Temperatura de desnaturalización y energía libre de Gibbs.....	11
Descripción de los principales virus gastrointestinales humanos.....	13
Rotavirus.....	13
Astrovirus.....	14
Calicivirus.....	15
Adenovirus.....	16
Virus secundarios y virus nuevos.....	17
<b>Hipótesis.....</b>	<b>19</b>
<b>Objetivo general.....</b>	<b>19</b>
Objetivos particulares.....	19
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>20</b>
Virus, células y muestras clínicas.....	20
Virus de interés.....	21
Generación y manejo de bases de datos de secuencias de virus.....	22
Cálculo de la formación del duplex en la hibridación.....	23
Estrategia de selección de sondas.....	24
Hibridación in silico.....	26
Producción de microarreglos.....	26
Purificación de ácidos nucleicos.....	27
Amplificación y marcaje de muestras.....	27
Preparación de laminillas e hibridación.....	28
Obtención de imágenes y análisis de datos.....	28
Límites de detección del microarreglo.....	29
Panel de PCR diagnóstico y PCRs de confirmación.....	30
Detección de virus por RT-PCR y PCR en tiempo real.....	31
<b>Resultados.....</b>	<b>32</b>
Virus asociados al tracto gastrointestinal.....	32
Generación de bases de datos de secuencias.....	33
Variabilidad en las secuencias de interés.....	35
Implementación de la estrategia de selección de sondas.....	36
Evaluación de los parámetros de hibridación.....	37
Alcance de hibridación en oligonucleótidos.....	40
Integración de la estrategia de selección.....	41

Hibridación in-silico.....	43
Validación del microarreglo con virus de referencia.....	46
Sondas no específicas.....	47
Determinación de los límites de detección.....	47
Análisis de muestras clínicas.....	48
Análisis de coinfecciones.....	51
<b>Discusión.....</b>	<b>53</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>63</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>64</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>65</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>76</b>
Anexo 1. Artículo publicado.....	76
Anexo 2. Material suplementario del artículo.....	87
Anexo 3. Tablas de identidad en secuencias de virus.....	122



## Abreviaturas

<b>BLAST</b>	Basic local alignment search tool
<b>bp</b>	base pairs
<b>ChPV</b>	parvovirus de pollo
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>Ct</b>	ciclo al umbral de amplificación exponencial (“threshold cycle”)
<b>CV</b>	calicivirus
<b>DenV</b>	virus Dengue
<b>DALY</b>	años de vida potencialmente perdidos (“Disability-adjusted life year”)
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>dsDNA</b>	DNA de doble cadena
<b>dsRNA</b>	RNA de doble cadena
<b>EDA</b>	enfermedad diarreica aguda
<b>EHEC</b>	Escherichia coli enterohemorrágica
<b>EIA</b>	enzimoinmunoanálisis
<b>ELISA</b>	ensayo enzimático inmunosorbente (“Enzyme-linked immunosorbent assay”)
<b>EPEC</b>	Escherichia coli enteropatógena
<b>FeAstV</b>	astrovirus felino
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FLUAV</b>	virus de Influenza A
<b>FLUVB</b>	virus de Influenza B
<b>HAV</b>	virus de la Hepatitis A
<b>HAdV</b>	adenovirus humano
<b>HAsV</b>	astrovirus humano
<b>HBoV</b>	bocavirus humano
<b>HCV</b>	virus de la Hepatitis C
<b>HEV</b>	enterovirus humano
<b>HHV</b>	virus herpes humano
<b>HPeV</b>	parechovirus humano
<b>HuCosV</b>	cosavirus humano
<b>HuCV</b>	calicivirus humanos
<b>ICG</b>	inmunocromatografía
<b>JCV</b>	polyomavirus JC
<b>kb</b>	kilobases
<b>NCBI</b>	National Center For Biotechnology Information
<b>NDV</b>	virus de NewCastle
<b>NEG</b>	negativo
<b>NN</b>	vecino más cercano (“nearest neighbor”)
<b>NSP</b>	proteína viral no estructural (“non structural protein”)
<b>nt</b>	nucleótido
<b>NV</b>	virus Norwalk o norovirus
<b>ORF</b>	marco abierto de lectura (“open reading frame”)
<b>PAGE</b>	electroforesis en gel de poliacrilamida (“polyacrilamide gel electrophoresis”)
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa (“polymerase chain reaction”)
<b>PoAdVB</b>	adenovirus porcino B

<b>RaPBV</b>	picobirnavirus de conejo
<b>RHPA</b>	hemaglutinación reversa pasiva
<b>RNA</b>	ácido ribonucléico
<b>RP</b>	producto de rangos (“rank products”)
<b>POS</b>	positivo
<b>RT-PCR</b>	transcripción reversa acoplada a PCR (“reverse transcriptase PCR”)
<b>RRV</b>	cepa de simio de rotavirus
<b>RV-A</b>	rotavirus A
<b>SIDA</b>	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>ssDNA</b>	DNA de cadena sencilla
<b>ssRNA</b>	RNA de cadena sencilla
<b>SV</b>	virus Sapporo o sapovirus
<b>T<sub>m</sub></b>	temperatura de desnaturalización (“melting temperature”)
<b>TTV</b>	torque teno virus o anellovirus
<b>VLP</b>	partícula similar a virus (“virus like protein”)
<b>VP</b>	proteína viral estructural (“viral protein”)
<b>ΔG</b>	energía libre de Gibbs
<b>ΔH</b>	diferencia de entalpía
<b>ΔS</b>	diferencia de entropía

## Resumen

La gastroenteritis es una enfermedad caracterizada por causar diarrea y vómito. Puede ser causada por una gran variedad de patógenos entre los que se encuentran los virus. En la práctica clínica sólo se evalúan algunos virus de forma rutinaria, en parte por la falta de herramientas de detección paralela resultando en una gran cantidad de casos sin un agente identificado. En este trabajo desarrollamos un microarreglo de DNA que en un solo ensayo evalúa 128 especies de virus asociados al tracto gastrointestinal de vertebrados. La estrategia de selección de sondas (70meros) estuvo basada en la energía libre de Gibbs de la hibridación entre la sonda y su blanco. Las sondas seleccionadas reconocen específicamente su especie viral y cubren todas las secuencias conocidas al momento del diseño. El microarreglo se validó con 10 especies de virus de referencia y 6 especies más a través de muestras clínicas. Para determinar el límite de detección de la plataforma se evaluaron diferentes cantidades de tres virus con diferente tipo de genoma. El microarreglo es capaz de detectar desde  $10^3$  partículas de virus independientemente del tipo de genoma. Posteriormente se evaluó un grupo de 76 muestras clínicas de niños que presentaron gastroenteritis y los resultados se compararon con PCR diagnóstico. Las muestras con infección sencilla fueron detectadas de forma consistente mediante los dos métodos, mostrando alta especificidad y sensibilidad. Sin embargo, las muestras con coinfección no mostraron buena correlación entre microarreglo y PCR, estas discrepancias fueron analizadas por RT-qPCR y se observó que en la mayoría de las muestras el virus detectado por microarreglo tenía mayor cantidad de material genético presente. El microarreglo desarrollado puede ser actualizado y aplicado a diferentes especies animales para obtener información sobre la variedad de virus circulantes ayudando a entender las infecciones virales gastrointestinales.

## **Abstract**

Gastroenteritis is a medical condition characterized by vomiting and diarrhea. It can be caused by a wide range of pathogens including viruses for which an increasing number of species has been discovered and associated to gastrointestinal tract. However, in the clinical practice testing for only some viruses is the usual routine in part because of lacking parallel detection tools, resulting in a large amount of undiagnosed cases. In this work, we developed a DNA microarray which in one single assay covers 128 virus species, all those associated to the gastrointestinal tract of vertebrates. The probe design was based on Gibbs free energy of the duplex formation between the probe (70mer) and its target. For each virus species, we selected a minimum set of six probes recognizing specifically the target and covering all complete sequences available at the time of design. The microarray was validated with 10 different reference virus species and six more from clinical samples. To determine the detection limit, the platform was tested with different quantities of three viruses of different genome types. The microarray is capable of detecting as few as  $10^3$  viral particles independently of genome type. Additionally a group of 76 clinical samples from children suffering of gastroenteritis was tested and the results were verified by diagnostic RT-PCR. Single virus infections were detected consistently for several viruses by the two methods used showing high microarray specificity and sensitivity. Nevertheless, coinfections not always showed a good correlation. This discrepancies were addressed by RT-qPCR where it was observed that in most cases the virus detected by microarray contained more genetic material. The microarray platform developed can be upgraded and applied to samples of different animal species to produce information about the variety of circulating viruses that will help to understand gastrointestinal viral infections.

# Introducción

## Generalidades sobre gastroenteritis

Gastroenteritis es la inflamación del tracto gastrointestinal definida por un cuadro clínico de diarrea y vómito que además puede ser acompañado de otros síntomas como dolor abdominal, contracciones abdominales, náusea, fiebre y presencia de sangre y/o mucosidad en las heces.

Se estima que a nivel mundial ocurren aproximadamente 1,400 millones de episodios diarreicos y 2.2 millones de muertes anuales a causa de enfermedades diarreicas [1]. La población más afectada son los niños menores de 5 años con aproximadamente 1.8 millones de muertes (17% del total), principalmente en regiones de países en vías de desarrollo como África y el sureste de Asia como resultado de la falta de sanidad e higiene [1]. Aunque las tasas de mortalidad por diarrea son bajas en los países desarrollados, los índices de morbilidad son altos, siendo el principal problema el impacto socioeconómico que genera el combatir este padecimiento, no sólo en el dinero invertido en el tratamiento, sino en las personas que pierden días laborales por la enfermedad o por cuidar al enfermo [2], se estima que a nivel mundial la cantidad total de años de vida potencialmente perdidos (DALY) por enfermedades diarreicas es de 438 000 en países con alto ingreso per-capita y de 59 207 000 en países con bajo ingreso per-capita [3].

En México se presentan aproximadamente 5.5 millones de casos anuales de enfermedades diarreicas agudas (EDA) notificadas al sistema de salud. En conformidad con las estadísticas de otros países, el grupo más afectado son los niños menores de 5 años donde la diarrea representa la segunda causa de enfermedad, generando el 20% de las consultas en servicios de salud y el 10% de los ingresos hospitalarios pediátricos [4].

Además del humano, la mayoría de los vertebrados pueden padecer EDAs, tanto animales de interés comercial o doméstico, como especies silvestres. Dentro del primer grupo se pueden mencionar: bovinos, ovinos, equinos y aves de corral [4–8]. Entre las mascotas afectadas encontramos perros y gatos como las más frecuentes, además de otras pequeñas especies de mamíferos y reptiles [9]. En fauna silvestre se han detectado infecciones en ciervos, jabalíes, lobos, zorros, mapaches, monos e inclusive animales marinos como ballenas y lobos marinos [10–14]. Por una parte las EDAs pueden causar grandes pérdidas económicas para los productores, teniendo como consecuencia a su vez el

desabastecimiento de producto a la población, por otra parte, la fauna silvestre además de sufrir disminuciones en su población, puede funcionar como reservorio de ciertos patógenos [15].

### **Patógenos asociados a gastroenteritis**

La naturaleza de los patógenos asociados a gastroenteritis es amplia e incluye parásitos, bacterias y virus. En el grupo de parásitos encontramos protozoarios como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*, nemátodos como *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Trichuris trichuria*, *Ancylostoma duodenale*, céstodos como *Taenia solium* y *Taenia saginata*, trematodos como *Schistosoma sp.* entre otros. Las bacterias comúnmente asociadas con EDAs son: *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y enterohemorrágica (EHEC), *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Yersinia sp.*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio sp.*, *Aeromonas* mesófilas, *Plesiomonas shigelloides*, *Clostridium difficile*. Entre los virus más importantes se encuentran: *Rotavirus A* (RV-A), Calicivirus (CV), Adenovirus entéricos y Astrovirus para humanos; y Rotavirus, Coronavirus, Circovirus y Pestivirus en animales.

### **Detección de patógenos en casos de gastroenteritis**

Ante tal variedad de patógenos y la similitud en sintomatología que producen, la identificación del agente involucrado en una infección puede ser complicada ya que para cada tipo de patógeno se han desarrollado pruebas específicas. Los métodos de diagnóstico clásicos para bacterias incluyen coprocultivo con medios selectivos. Estas pruebas generalmente se complementan con alguna prueba bioquímica y/o aglutinación con antisueros, también se puede utilizar la detección de enterotoxinas. La detección de parásitos se realiza mediante la identificación microscópica de protozoos, proglótides, larvas o huevos, algunas veces acompañado de tinciones. Para diagnosticar infecciones víricas se emplea la detección de antígenos mediante enzimoimmunoanálisis (EIA), inmunocromatografías (ICG) o aglutinación de partículas de látex, también se puede realizar el aislamiento e identificación de viriones mediante microscopía electrónica, aunque su uso probablemente se restringe a la investigación o los laboratorios de referencia, debido a la disponibilidad de técnicas más sencillas. Dado el tamaño de los agentes virales, estas técnicas pueden aplicarse a la muestra de heces o puede realizarse un

enriquecimiento mediante su propagación en cultivo celular aunque una gran cantidad de virus no han sido adaptados a cultivo o son fastidiosos.

Las técnicas clásicas de detección mencionadas además de requerir generalmente la realización de una prueba por cada patógeno probado, sólo logran identificar un agente etiológico en aproximadamente el 30-50% de los casos, dejando una importante cantidad de casos sin agente causal [17]. Con el surgimiento de la biología molecular la amplificación del material genético del patógeno mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha permitido mejorar tanto la sensibilidad como la especificidad de las pruebas, principalmente en el grupo de agentes virales.

### **Pruebas de detección simultánea**

La lista de virus conocidos que pueden infectar al humano ha aumentado considerablemente en años recientes. Sin embargo, las técnicas de detección clásica fueron desarrolladas en su mayoría para la evaluación individual de patógenos. Evaluar dos o más agentes en una muestra con estas herramientas aumenta los costos, el tiempo y el uso de recursos materiales y humanos. Por lo tanto, las nuevas estrategias de diagnóstico buscan tener la capacidad de evaluar simultáneamente varios patógenos.

La PCR multiplex, es una modificación de la PCR en la que se combinan pares de cebadores diseñados para amplificar las secuencias de varios patógenos en una reacción obteniendo amplicones de diferentes tamaños [18]. La limitante de ésta técnica es la cantidad de cebadores que pueden ser mezclados sin perder o alterar la especificidad de la reacción. Para solucionar esto, se pueden repartir tres o cuatro pares de cebadores en dos o más reacciones.

Actualmente existen en el mercado algunos kits que pueden detectar varios virus por PCR multiplex. Por ejemplo, RespiFinder (PathoFinder, Maastricht, Holanda) permite la detección de hasta 18 virus respiratorios. Sin embargo, los kits comerciales disponibles para detectar virus asociados a gastroenteritis (GastroFinder [PathoFinder], Seeplex Diarrhea ACE [Seegene], xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel [Luminex], FTD Viral gastroenteritis [Fast-Track]) se limitan a los principales virus humanos (Rotavirus, Calicivirus, Astrovirus, Adenovirus), y algunos complementan la detección con otros agentes como algunas bacterias y parásitos mencionados anteriormente.

En los laboratorios de investigación también se han desarrollado ensayos de PCR multiplex para detección de virus entéricos. Al igual que los kits comerciales, estos ensayos se enfocan generalmente en los principales virus humanos mencionados [19–23]. El ensayo desarrollado por Kharmin y colaboradores incluye además algunos virus secundarios (Rotavirus B y C, Enterovirus, Parechovirus y Virus Aichi) para un panel total de 10 virus en 3 sets de reacciones [24].

## **Microarreglos**

Los microarreglos son otra herramienta que puede realizar detección simultánea. Un microarreglo consiste de una matriz de oligonucleótidos (generalmente DNA) fijos en una superficie. Los oligonucleótidos son llamados 'sondas' y sirven para identificar una secuencia blanco por complementariedad. Se pueden utilizar sondas de diferentes tamaños, desde 20 bases hasta amplicones de PCR. La hibridación de la sonda con la secuencia blanco se identifica generalmente mediante fluorescencia.

Los microarreglos se utilizaron inicialmente para comparar la expresión de genes entre dos condiciones [25]. Posteriormente se adecuaron para otros tipos de análisis como detección de polimorfismos [26], inmunoprecipitación de cromatina [27], o detección de splicing alternativo [28]. Para algunas de estas aplicaciones se pueden adquirir plataformas comerciales desarrolladas por compañías como Affymetrix, Agilent o NimbleGen. También pueden producirse microarreglos personalizados.

Un ensayo de microarreglo se realiza en varias etapas. Aunque dependiendo del objetivo se pueden hacer variaciones para cada etapa, un experimento general se realiza de la siguiente forma: Primero se amplifica el material genético, durante la amplificación se pueden incluir nucleótidos modificados que permiten acoplar un fluoróforo. La muestra amplificada se purifica y se “marca” con fluoróforo. La muestra se carga en el microarreglo y se incuba en una cámara húmeda en baño caliente. Al finalizar el tiempo de hibridación el microarreglo se lava para eliminar los residuos de muestra que no hibridaron con las sondas. Finalmente se utiliza un escáner para producir y medir la señal fluorescente. Los datos se almacenan en hojas de cálculo y se analizan para determinar cuáles sondas son positivas y que agente representan.

A continuación se describen algunos de los componentes que deben tomarse en cuenta al desarrollar un microarreglo de detección, con el fin de ajustar sus características al objetivo deseado.



### **Componentes físicos del microarreglo: las sondas y el soporte**

Como se mencionó previamente, las sondas son oligonucleótidos usados para la detección de la secuencia blanco. La longitud de oligonucleótido utilizada depende del grado de discriminación requerido entre secuencias. Así, cuando se requiere distinguir dos secuencias muy similares, es recomendable utilizar sondas cortas (~20 nt). Por otra parte, la sensibilidad de la sonda aumenta con la longitud, se ha reportado que sondas de 60 nucleótidos son hasta 4 veces más sensibles que sondas de 25 nucleótidos [29]. Al usar sondas muy largas (como los amplicones) se debe tener precaución de que no incluyan estructuras secundarias que puedan obstaculizar o impedir el acceso de la sonda con la secuencia blanco.

La cantidad de sondas por secuencia blanco también es importante. El microarreglo tiene la ventaja de evaluar varios blancos a la vez, esta característica se puede usar para interrogar diferentes regiones de una misma secuencia blanco. Esta “redundancia” hace a la prueba más confiable y menos vulnerable a mutaciones espontáneas que pudieran afectar el desempeño de una sonda.

Los oligonucleótidos pueden ser sintetizados directamente en el soporte o se pueden “imprimir”. Cada punto en la matriz se denomina 'spot' y contiene un conjunto de sondas de secuencia única. La principal diferencia entre la síntesis directa y la “impresión” es la cantidad de spots que se pueden generar. La síntesis *in-situ* permite obtener una mayor densidad de spots (hasta ~6.5 millones) [30] y es usada por plataformas con alta densidad como los microarreglos producidos por Affymetrix, y usan generalmente sondas cortas. La “impresión” de sondas produce microarreglos con menor densidad, hasta ~40,000 spots con una maquina “casera” [31] o 250,000 spots en compañías comerciales (Agilent) y generalmente se usa para oligonucleótidos más largos, esta tecnología también se caracteriza por un menor costo de producción. Las dos técnicas de producción de microarreglos han sido estandarizadas para obtener microarreglos con spots de alta calidad.

El soporte donde se fijan las sondas debe tener características especiales. Debe tener una superficie uniforme donde se puedan producir los spots con forma y tamaño adecuados, debe tener baja autofluorescencia y debe tener alta capacidad para retener los spots [32]. El material más usado que reúne las primeras dos características son las laminillas de vidrio, para el tercer requerimiento las laminillas son tratadas químicamente para mejorar la retención.

## **Procesamiento de la muestra**

La extracción del material genético de la muestra se puede hacer con varios métodos. Es importante que el método seleccionado sea eficiente en la liberación de los ácidos nucleicos y que los proteja de la degradación [33]. Cuando la muestra proviene de un virus cultivado el protocolo de extracción por Trizol puede ser suficiente. Sin embargo, cuando los virus provienen de muestras de heces, es importante considerar la eliminación de inhibidores de la PCR como grasas, celulosa, glicógenos y compuestos fenólicos, que pueden provenir de la dieta del individuo [34]. También es recomendable utilizar un paso de enriquecimiento o concentración.

En los estudios que utilizan RNA como material genético de inicio generalmente sintetizan primero la cadena complementaria de DNA (cDNA) ya que es más estable (menos propensa a la degradación) [35]. La amplificación del material genético dependerá principalmente de las secuencias de interés y de las sondas utilizadas para su identificación. Si las secuencias de interés son muy específicas o comparten una secuencia en común, puede realizarse amplificación dirigida. Esto consiste en realizar la PCR con cebadores específicos, degenerados o PCR multiplex. Cuando el material genético es muy diverso en secuencia, puede utilizarse amplificación independiente de secuencia. Los cebadores utilizados son de secuencia al azar y varían entre 6-20 nucleótidos [31].

La tercera consideración para amplificar el material es la compatibilidad con el método de marcaje. Para incorporar fluoróforo en la muestra hay dos opciones principales. El marcaje directo que consiste en la incorporación de nucleótidos marcados durante la amplificación [36][36], mientras el marcaje indirecto es el acoplamiento de fluoróforo en nucleótidos modificados mediante una reacción química posterior a la amplificación [37]. Las polimerasas usadas en las reacciones de amplificación presentan diferentes afinidades y eficiencias en la incorporación tanto de nucleótidos marcados como nucleótidos modificados [36–38]. Una variación del marcaje indirecto es el uso e incorporación de nucleótidos acoplados a biotina, para posteriormente detectar la biotina con estreptavidina acoplada a fluoróforo, esta estrategia es usada en los microarreglos de Affymetrix [30].

## **Hibridación y obtención de imágenes**

Una vez marcada, la muestra se carga en el microarreglo y éste se coloca en una cámara de hibridación. Para promover la interacción uniforme y adecuada entre sondas y secuencias blanco la hibridación se lleva a cabo a temperatura constante, entre 40-65°C, dependiendo de la plataforma. La temperatura es un factor muy importante en la hibridación ya que es uno de los factores que determinan la formación del duplex de DNA [39,40]. Para mantener la temperatura homogénea, la cámara de hibridación se puede sumergir en agua o se puede utilizar un horno con o sin rotación. Por lo tanto, la cámara de hibridación debe sellar herméticamente para evitar la inundación, la evaporación o la fuga de la muestra. Otros factores que modifican la astringencia es la concentración de sales y el uso de desnaturalizantes como la formamida, ambos como parte del buffer de hibridación [41,42].

Al microarreglo donde se hibridan dos muestras, cada una con fluoróforo diferente, sobre un mismo arreglo se denomina microarreglo de dos canales porque se requiere de dos láseres para “leer” el microarreglo. Cuando el ensayo sólo contiene un fluoróforo, se denomina microarreglo de un canal, esta modalidad es usada por los microarreglos de Affymetrix [30].

La lectura de los microarreglos se realiza con un escáner especializado. El escáner se sincroniza con un programa que permite ajustar los parámetros de la lectura como el área para escanear o la intensidad de los láseres. Primero se hace una lectura de exploración para ubicar visualmente la gradilla de spots y evaluar la calidad de la hibridación. En este paso se pueden identificar problemas como evaporación de la muestra, precipitación de fluoróforo o presencia de ruido, entre otros [43]. En la siguiente lectura se hace la adquisición de la imagen final. Por último se identifica la ubicación exacta de los spots y se determina la intensidad de señal que representa cada uno.

## **Temperatura de desnaturalización y energía libre de Gibbs**

La temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) es la temperatura a la cual la mitad de los duplex de DNA contenidos en una muestra se encuentran en estado de hélice y la otra mitad en estado de plegamiento al azar. Para realizar la predicción o cálculo de la  $T_m$  de los oligonucleótidos se puede escoger entre varias fórmulas, la más sencilla es la de Wallace [44] donde básicamente cada nucleótido A y T aporta 2°C y cada nucleótido G y C aporta 4°C.

$$T_m = 2^\circ C * (A+T) + 4^\circ C * (C+G) \quad (1)$$

Este método por su sencillez es aplicable sólo a oligonucleótidos pequeños y cuando no se requiere de un valor estricto y/o preciso. Un segundo método muy usado, es el basado en contenido de GC [44].

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) + 16.6 * \log [M] - 500/L \quad (2)$$

Donde M es la concentración de sales y L es la longitud del oligonucleótido. Sin embargo esta ecuación no toma en cuenta la cadena complementaria y por lo tanto, tampoco la presencia de apareamientos erróneos.

El tercer método es denominado el método de Nearest-Neighbor (vecino más cercano), el cual está basado en la evaluación de los valores termodinámicos de los nucleótidos contiguos (vecinos) durante la formación del duplex. Por lo tanto se requiere de los valores de  $\Delta H$  y  $\Delta S$ , dichos valores se encuentran disponibles para los 10 posibles apareamientos Watson-Crick de 'vecinos más cercanos' (AA/TT, AT/TA, TA/AT, CA/GT, GT/CA, CT/GA, GA/CT, CG/GC, GC/CG, GG/CC) [46,47], e inclusive para todas las combinaciones de posibles apareamientos erróneos [48–52]. La fórmula para calcular la  $T_m$  por vecino más cercano es:

$$T_m = \frac{\Sigma \Delta H}{\Sigma \Delta S * \ln([oligo]/F)} + f * [Na^{+2}] - 273.15 \quad (3)$$

donde  $\Sigma \Delta H$  y  $\Sigma \Delta S$  corresponden a la sumatoria de los valores termodinámicos de cada par de hibridaciones Watson-Crick a lo largo de toda la cadena más los valores termodinámicos de inicio; R es la constante de los gases ( $R=1.987$  cal/mol K); [oligo] es la concentración molar de oligonucleótido utilizada; F es el factor de corrección de la concentración de los oligonucleótidos, usado cuando las cadenas a hibridar no son autocomplementarias;  $[Na^{++}]$  es la concentración molar de sales; f es el factor de corrección para la concentración de sales, determinado hasta el momento únicamente para sodio; y 273.15 es el factor de conversión a grados Celsius. Si en esta ecuación suponemos  $F=1$  (cadenas autocomplementarias),  $f=1$  (sin corrección de sales) y  $[Na^{++}] = 0$  obtenemos la representación más sencilla, al eliminar el efecto que pudieran tener las sales sobre la hibridación entre las cadenas del duplex. Si suponemos que los dos oligonucleótidos a hibridar se encuentran en la misma concentración,  $F=1$  se utiliza para indicar que el duplex es de naturaleza autocomplementaria, como los palíndromos o

polímeros. A su vez, cuando se tienen cadenas que no son auto-complementarias (que es el escenario esperado en este trabajo) a F le corresponde un valor de 4 [47].

Con los valores de la entalpía y entropía se puede obtener la energía libre de Gibbs del oligonucleótido con la fórmula (4) y añadiendo un factor de corrección de sales de sodio [47] se obtiene la fórmula (5). Donde N corresponde a la cantidad de grupos fosfato (que generalmente es la longitud del oligonucleótido - 1).

$$\Delta G_{oligo} = \Sigma \Delta H - T * \Sigma \Delta S \quad (4)$$

$$\Delta G_{corr} = \Delta G_{oligo} - (0.114 * (N - 1) * \ln[Na^{+2}]) \quad (5)$$

## **Descripción de los principales virus gastrointestinales humanos**

### **Rotavirus**

El género *Rotavirus*, perteneciente a la familia *Reoviridae*, son virus no envueltos, de aproximadamente 100 nm de diámetro, formados de 3 capas concéntricas de proteína y con un genoma compuesto de 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA). Los rotavirus se dividen en siete grupos (A-G), los grupos A, B y C se han encontrado tanto en humanos como en animales, mientras que los grupos D-G solo se han encontrado en aves. Los *Rotavirus* del grupo A (el grupo más importante en salud humana), se clasifican en serotipos y genotipos basados en la reactividad del virus a anticuerpos neutralizantes y mediante la similitud de los genes de las proteínas de la capa externa VP4 y VP7 [53,54]. Debido a la naturaleza segmentada del genoma de rotavirus, se ha propuesto la clasificación de cada segmento de forma que la nomenclatura del virus estaría compuesta por la combinación de 11 genotipos. Aunque puede parecer complejo establecer nombres de 11 códigos por la cantidad de combinaciones posibles, se ha observado que en realidad son relativamente pocas las combinaciones (de 11 genotipos) que se pueden encontrar en humanos, a lo que se ha denominado constelaciones [55]. Las tres principales constelaciones encontradas en humanos son: Wa-like, DS-1-like, AU-1-like; otras constelaciones menos frecuentes son originadas mediante rearrreglos como Wa-DS-like, human-bovine-like, y artiodactyl bovine-like [55].

La identificación de rotavirus en los cuatro primeros días de la presencia de síntomas, se puede realizar con relativa facilidad mediante ELISA debido a la gran cantidad de virus presente en las heces, además existe una gran cantidad de técnicas utilizadas en laboratorios de diagnóstico como electroforesis del RNA viral, ensayo de hemaglutinación reversa pasiva (RHPA), aglutinación en látex, ensayos inmunoenzimáticos (EIA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) entre otros [56]. Si se desea determinar el serotipo, las técnicas más usadas son ELISA y RT-PCR, usando anticuerpos monoclonales o cebadores específicos respectivamente. Por otra parte se ha implementado la detección y tipificación de rotavirus mediante microarreglos de DNA. En un primer reporte, se logró el diseño de un microarreglo con oligonucleótidos de ~20-30 bases capaz de identificar los cinco genotipos G de mayor relevancia clínica (G1-G4 y G9) [57]. En la secuela de ese trabajo, el microarreglo fue expandido con la adición de oligonucleótidos para subtipificación de cinco genotipos P (P[4], P[6], P[8], P[9], P[14]) y cinco genotipos G adicionales (G5, G6, G8, G10 y G12) [58].

Existen dos vacunas contra rotavirus aprobadas por la FDA (Administración de alimentos y medicamentos por sus siglas en inglés), Rotateq (Merck Research) y Rotarix (GlaxoSmithKline). Estas vacunas ofrecen según sus fabricantes, protección de más del 85% contra diarrea severa causada por rotavirus y entre 74-79% contra cualquier grado de diarrea en la primer temporada post-vacunación [59]. En México se introdujeron y se han aplicado ambas vacunas de forma masiva desde 2007 [60].

### **Astrovirus**

Los astrovirus, miembros de la familia *Astroviridae*, son virus no envueltos, de 28-35 nm de diámetro, su superficie tiene apariencia de estrella de seis picos y su genoma esta compuesto de RNA de cadena sencilla (ssRNA) de polaridad positiva. Los astrovirus infectan tanto humanos como otros animales; en humanos se ha establecido como una de las causas comunes de diarrea viral en niños [61]. La mayoría de las infecciones en especies de mamíferos están asociadas a gastroenteritis, mientras las infecciones en especies aviares han sido relacionadas con patologías intestinales y extraintestinales como nefritis y hepatitis. En años recientes usando secuenciación masiva se han encontrado una gran variedad de astrovirus en diferentes huéspedes [11,62–65]. Basados en el origen del virus y su estructura genómica, la familia *Astroviridae* se divide en dos géneros: *Mamastrovirus* que infecta mamíferos, incluyendo humanos y *Avastrovirus* que comprende virus aislados de aves. No se ha observado relación serológica entre astrovirus de diferentes especies, por lo que los serotipos son asignados por especie de origen. De

esta forma, los astrovirus humanos (HAstV) son divididos en ocho serotipos (HAstV-1 a HAstV-8). Los astrovirus son identificados tradicionalmente por microscopía electrónica aunque se requiere de un microscopista con experiencia ya que solo cerca del 10% de las partículas tendrá la característica forma de estrella [61]. Para realizar tipificación se han desarrollado ensayos inmuno-enzimáticos (EIA) y técnicas moleculares (RT-PCR), siendo esta última la más utilizada y desarrollada en los últimos años para tipificación de astrovirus humanos [66]. Por otro lado, se tiene el reporte de la generación de dos microarreglos para la detección de astrovirus. Jaaskelainen y colaboradores (2006) [67] desarrollan un microarreglo para la detección de norovirus y astrovirus en un solo ensayo, el set de oligonucleótidos para astrovirus incluye tres sondas para detección universal de astrovirus y cinco sondas para subtipificación de los serotipos 1-5. Es importante mencionar que los oligonucleótidos diseñados tienen longitudes de 15-19 nucleótidos. El segundo reporte es el desarrollo de un microarreglo capaz de detectar los ocho serotipos de HAstV reportados hasta el momento. En este caso el microarreglo contiene oligonucleótidos de 17-18 nucleótidos obtenidos del análisis de las secuencias genómicas del ORF1b de astrovirus, donde se codifica la polimerasa viral [68].

## **Calicivirus**

Los calicivirus son virus no envueltos de aproximadamente 27-40 nm, su genoma está compuesto de ssRNA de polaridad positiva. De los seis géneros que componen la familia *Caliciviridae*, sólo dos géneros contienen a los principales virus gastrointestinales humanos: *Norovirus* y *Sapovirus*. A su vez, cada género contiene sólo 1 especie: virus Norwalk (NV) y virus Sapporo (SV) respectivamente [69]. Los calicivirus infectan individuos de todos los grupos de edad pero son frecuentemente encontrados en epidemias ocasionadas por consumo de comida contaminada, en comunidades semicerradas como guarderías, asilos o cruceros [70]. Los norovirus se clasifican con base en la secuencia de la proteína VP1 en 6 genogrupos que a su vez contienen más de 40 genotipos. El genogrupo GII es el más prevalente, seguido del genogrupo I [71]. Los sapovirus se clasifican en 5 genogrupos y a su vez se subdividen en genotipos pero no existe un consenso sobre esta subdivisión, aunque recientemente se ha propuesto [72]. Los genogrupos GI, GII, GIV y GV de sapovirus infectan humanos mientras que el genogrupo GIII infecta cerdos [73]. Hasta el momento no existe una vacuna contra ningún calicivirus, aunque se están realizando pruebas para desarrollar una vacuna contra norovirus usando VLPs (partículas parecidas al virus) [74]. Actualmente la técnica más usada para la detección de los calicivirus es RT-PCR, combinada con secuenciación [70]. También se cuenta con kits comerciales de

ELISA para detectar antígeno viral en especímenes clínicos. La detección de norovirus por microarreglo se ha reportado en varios trabajos [67,75–77]. Las 4 plataformas desarrolladas están enfocadas a identificar únicamente los genogrupos GI y GII usando sondas cortas (~20 nt). El diseño del microarreglo es diferente en cada caso, por ejemplo el trabajo de Vinje (2000) [75] utiliza membrana de nitrocelulosa como soporte (estrictamente no considerado microarreglo); en el trabajo de Jaaskelainen (2006) las sondas contienen un espaciador de 9 nucleótidos para separarlas del soporte al que están fijadas [67]; las sondas usadas por Brinkman (2009) son de 48 nt pero consisten de 2 secciones, 24 nucleótidos aparean con un oligonucleótido fijado al soporte (oligo de captura) y 24 nt son para el reconocimiento del virus [76]; finalmente para asegurar la especificidad de la detección, las sondas utilizadas por Mattison están dirigidas a 3 regiones diferentes de un mismo amplicon [77].

## **Adenovirus**

Los virus de la familia *Adenoviridae* infectan una gran cantidad de especies de vertebrados, desde peces hasta humanos. Los adenovirus humanos (HAdV) se encuentran agrupados en el género *Mastadenovirus*, y son caracterizados por ser virus no envueltos con genoma de DNA de doble cadena de aproximadamente 70 nm de diámetro [78]. En base a su resistencia a la neutralización por antisueros, los 69 serotipos de adenovirus humanos se agrupan en siete subgrupos (A-G), los cuáles corresponden a las seis especies de adenovirus humanos. La infección con adenovirus tiene un gran espectro de patologías que afectan los sistemas gastrointestinal, ocular y respiratorio, de modo que los serotipos asociados a gastroenteritis con mayor frecuencia son el 40 y 41, pertenecientes a la especie “adenovirus humano F”, por lo que se denominan adenovirus entéricos [78,79]. Con gastroenteritis se han asociado también, aunque de forma menos frecuente, las especies A, C y G [79,80]. Para la identificación de adenovirus entéricos existen diversas técnicas, desde el cultivo celular, en células Graham 293 (específicas para los serotipos HAdV40 y HAdV41), detección mediante anticuerpos monoclonales en ensayos de inmunofluorescencia (IF) o ELISA, aglutinación en látex, y PCR entre otros. La prueba comercial aprobada por la FDA, Adenoclone (Meridian Biosciences, Inc) es una de las más usadas para detección directa en heces y especímenes oculares o respiratorios, aunque es menos sensible que la inmunofluorescencia o el crecimiento en cultivos celulares. Hasta la fecha, los trabajos que reportan la detección de adenovirus por microarreglo se enfocan únicamente en las especies definidas como respiratorias, pertenecientes a las especies B, C y E [81,82]. A pesar de esto, uno de los



microarreglos inicialmente diseñado para patógenos respiratorios también fue capaz de identificar adenovirus en muestras de heces [83].

### **Virus secundarios y virus nuevos**

Los virus que se pueden encontrar en tracto gastrointestinal pero que no forman parte del grupo principal de virus patogénicos pueden ser llamados virus secundarios. Estos virus tienen en común una baja prevalencia por lo que generalmente no son incluidos en el diagnóstico rutinario y rara vez son incluidos en los estudios epidemiológicos. Esta situación promueve que la información sobre estos virus y el conocimiento sobre su papel en las infecciones intestinales sean escasos.

En este grupo están algunos virus reconocidos como patogénicos en humanos pero que son estudiados en pocas ocasiones, por ejemplo Aichi virus y parechovirus humano (HPeV), ambos de la familia *Picornaviridae*, que han sido asociados con gastroenteritis en niños, pero su papel en la infección ha sido cuestionado por la alta presencia de los virus en coinfecciones y en individuos sanos así como la alta seroprevalencia en adultos [84–87].

En individuos inmunodeprimidos como aquellos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) la diarrea es una importante manifestación clínica [88]. Los virus comúnmente encontrados en muestras de individuos inmunodeprimidos pertenecen a la familia *Herpesviridae* (Citomegalovirus, Virus Herpes simplex) [89]. Además se han encontrado diversos virus como picobirnavirus humanos, bocavirus humano (HBoV), parechovirus humano, virus Aichi, polyomavirus JC, virus de Hepatitis B, enterovirus, cosavirus [88–90].

Con el desarrollo y uso de las herramientas moleculares de detección se han encontrado nuevos virus pertenecientes a las familias de los principales virus patogénicos en humanos, como las familias *Adenoviridae* [80] y *Astroviridae* [64]. También se identificaron nuevas especies e inclusive se definieron nuevos géneros en la familia *Picornaviridae* como el virus Saffold [91], Cosavirus humano [92], Parechovirus humano 8 [93] y Salivirus [94]. Otros virus identificados en humanos destacan porque pertenecen a familias de virus que típicamente producen diarrea en animales como *Coronaviridae* (torovirus humano, coronavirus humano NL63 y HKU1) [95,96], *Picobirnaviridae* (picobirnavirus humano) [97], *Parvovirinae* (bocavirus humano) [98]. En animales se han identificado

virus circulando en especies diferentes a las ya conocidas, como astrovirus porcino [65] y astrovirus de murciélago [62], kobuvirus bovino [99] y anellovirus porcino [100].

En años recientes con el uso de tecnologías de secuenciación de última generación se han descubierto nuevos virus en muestras de todo tipo de animales vertebrados como virus Aichi canino [101], adenovirus en primates [102], astrovirus en ciervos [11], norovirus en caninos [103] y en bovinos [104] o sapovirus en murciélagos [105]. Estos nuevos virus han ampliado nuestro conocimiento sobre la gran diversidad de virus existentes y circulantes. Es importante caracterizar la relevancia de estos virus en la patogénesis de las enfermedades diarreicas, así como determinar su prevalencia epidemiológica y caracterizar sus cualidades biológicas.

## **Hipótesis**

El desarrollo de un microarreglo para la detección de patógenos virales servirá para detectar de forma específica los virus presentes en el tracto gastrointestinal de vertebrados.

## **Objetivo general**

Diseñar y validar un microarreglo de DNA para detección de múltiples agentes virales asociados al tracto gastrointestinal de vertebrados.

## **Objetivos particulares**

- Identificar los virus conocidos que se asocian al tracto gastrointestinal de vertebrados.
- Crear bases de datos con las secuencias de los agentes virales identificados anteriormente.
- Diseñar sondas que puedan ser utilizadas para la identificación de los agentes virales.
- Producir microarreglos para la detección de los agentes virales seleccionados.
- Validar el microarreglo con cepas de referencia.
- Probar el microarreglo con muestras clínicas de pacientes que presentan gastroenteritis

## **Materiales y Métodos**

### **Virus, células y muestras clínicas**

Se obtuvieron 14 lisados virales de 10 especies de virus diferentes (Tabla 1) que fueron generosamente donados por diferentes laboratorios. Los lisados virales corresponden a cepas de virus cultivados, con excepción de las muestras de virus Norwalk y virus Sapporo que son muestras clínicas previamente caracterizadas. La cepa de rotavirus de simio RRV se propagó en monocapas de células MA104 y el virus se purificó mediante gradientes de Cesio como se ha descrito en trabajos previos [106]. Un grupo de 76 muestras clínicas de niños menores de 5 años que presentaron cuadros clínicos de diarrea se obtuvieron a través del Dr. Juan Francisco Contreras (Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México) en la temporada invernal de Octubre 2004 a Marzo 2005, previa autorización de los padres o tutor(es). Las muestras se analizaron para rotavirus mediante la prueba de 'rotaforesis', la cual consiste en identificar la presencia de los segmentos de dsRNA que conforman el genoma del virus mediante su separación por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). En estas muestras no se realizó búsqueda de algún otro agente infeccioso. Las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su posterior uso.

**Tabla 1.** Lisados virales

Familia	Género	Especie	Cepa	Sondas (positivas/total)
Astroviridae	Mammastrovirus	Astrovirus humano	Yuc8	4/4
Adenoviridae	Mastadenovirus	Adenovirus humano C <sup>a</sup>	Adv5	10/13
Caliciviridae	Vesivirus	Calicivirus felino <sup>b</sup>	F9	14/22
	Norovirus	Virus Norwalk <sup>b</sup>	*	8/12
	Sapovirus	Virus Sapporo <sup>b</sup>	*	5/14
Flaviviridae	Pestivirus	Virus de diarrea viral bovina 1 <sup>d</sup>	NADL	6/6
	Flavivirus	Virus Dengue 4 <sup>c</sup>	-	9/9
Paramyxoviridae	Respirovirus	Virus parainfluenza bovina 3 <sup>d</sup>	SF-4	9/9
Reoviridae	Rotavirus	Rotavirus A	RRV	22/42
			TFR-41	14/42
			UK	19/42
			Wa	21/42
			T1L	11/25
	Orthoreovirus	Ortoreovirus mamífero <sup>e</sup>	T3D	19/25

<sup>a</sup> Dr. Ramón Gonzalez, FC-UAEM

<sup>b</sup> Dra. Lorena Gutiérrez, CINVESTAV-IPN.

<sup>c</sup> Dra. Rosa Ma. Del Angel, CINVESTAV-IPN.

<sup>d</sup> Dra. Rosa E. Sarmiento, FMVZ-UNAM

<sup>e</sup> M.D. Terrence S. Dermody, Vanderbilt University School of Medicine

\* muestras clínicas de referencia

## Virus de interés

Para obtener una lista de los virus conocidos que se han asociado al tracto gastrointestinal en vertebrados, se realizó una búsqueda exhaustiva en la base de datos de literatura científica *PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica de EE. UU.). La búsqueda de los reportes que contenían virus asociados al tracto gastrointestinal se realizó con base en diferentes términos relacionados con gastroenteritis. Se recuperaron reportes que presentaran además de los términos principales “virus” o “viral”, uno o más términos clave, entre los que se incluyen, el nombre del padecimiento (“gastroenteritis”), los síntomas que se presentan (“diarrhea”, “diarrhoea”, “diarrhoeic”, “inflammation”, “vomiting”, “abdominal cramp”, “fever”), las muestras o sitio anatómico donde se detectó el virus (“stool”, “feces”, “fecal”, “gastroenteric”,

“gastrointestinal”, “enteric”, “intestine”, “colon”), entre otras palabras clave (“infection”, “infectious”, “diagnosis”, “detection”, “discovery”, “transmission”, “association”).

## **Generación y manejo de bases de datos de secuencias de virus**

El análisis de secuencias de ácidos nucleicos individuales o en bases completas que a continuación se describe así como la manipulación de ciertos programas se realizó mediante “scripts” escritos en lenguaje Perl o R. El conjunto de scripts se encuentra disponible en Dropbox con el siguiente enlace:

<https://www.dropbox.com/sh/tmfjnbretcbqm9z/AABciNS0-Xa1kSYow7wfWicMa?dl=0>

En primer lugar se obtuvieron todas las secuencias de virus del repositorio del NCBI disponibles hasta febrero de 2009 (v150.0). Esta base de datos inicial se depuró filtrando sólo secuencias completas pertenecientes a los virus de interés. Para cubrir este objetivo se realizó una lista con los diferentes nombres y abreviaciones con que se identifica a cada virus. De esta forma, se colectaron en archivos las secuencias de cada especie de virus de interés. Los archivos de cada especie de virus se organizaron jerárquicamente en carpetas por Familia, Género y Especie siguiendo la clasificación establecida por el ICTV (Comité internacional para la taxonomía de virus). A partir de estos archivos de secuencias de los virus de interés se realizó la construcción de una “base de datos de secuencias blanco” y una “base de datos de secuencias de origen”.

Debido a la importancia humana de algunas especies de virus, éstas pueden encontrarse sobre-representadas en las bases de datos. Utilizar secuencias que no aportan variedad biológica a nuestra base de datos, no es útil. Por lo tanto, se utilizó el programa CD-HIT [107] para eliminar la redundancia de secuencias en cada especie de virus de nuestra base de datos. El comando utilizado fue:

```
$ cd-hit-est -i input_file -o output_file -c 0.99
```

La eliminación de redundancia se llevó a cabo a diferentes niveles dependiendo de la cantidad de secuencias disponible. Se utilizaron filtros (opción '-c') de 99% para archivos con 1 a 99 secuencias; 97% para archivos con 100-999 secuencias y 95% para archivos con más de 1000 secuencias. El conjunto de archivos de secuencias de virus resultado de eliminar redundancia, conforma nuestra “base

de datos de secuencias blanco”, es decir, son todas las secuencias de cada especie de virus que las sondas deben reconocer.

De la base de datos de secuencias blanco se seleccionó un genoma completo representativo de cada especie de virus para conformar la “base de datos de secuencias de origen”, es decir, las secuencias que se procesarían y analizarían para obtener las sondas. En aquellos virus cuyo genoma completo aún no estaba reportado, se seleccionaron secuencias de genes completos.

### **Cálculo de la formación del duplex en la hibridación**

Para evaluar la hibridación de una sonda con su secuencia blanco se utilizó la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) y la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ). Ambos cálculos se hicieron mediante el método de 'vecino más cercano' descrito anteriormente [46]. Como se mencionó en introducción, las fórmulas utilizadas son:

$$T_m = \frac{\Sigma \Delta H}{\Sigma \Delta S * \ln([oligo]/F)} + f * [Na^{+2}] - 273.15 \quad (3)$$

$$\Delta G_{oligo} = \Sigma \Delta H - T * \Sigma \Delta S \quad (4)$$

$$\Delta G_{corr} = \Delta G_{oligo} - (0.114 * (N - 1) * \ln[Na^{+2}]) \quad (5)$$

Estas fórmulas fueron aplicadas a oligonucleótidos de diferentes tamaños (70, 60 o 50 nt) acoplados a secuencias con apareamiento perfecto (0 mismatches) o imperfecto (5,10 o 20 mismatches). Los resultados se utilizaron para analizar el comportamiento de la hibridación entre 10,000 oligonucleótidos de secuencia al azar con diferentes secuencias blanco. De la misma forma se analizaron los resultados de los alineamientos locales de las sondas con secuencias blanco de virus para determinar los valores termodinámicos de las posibles hibridaciones.

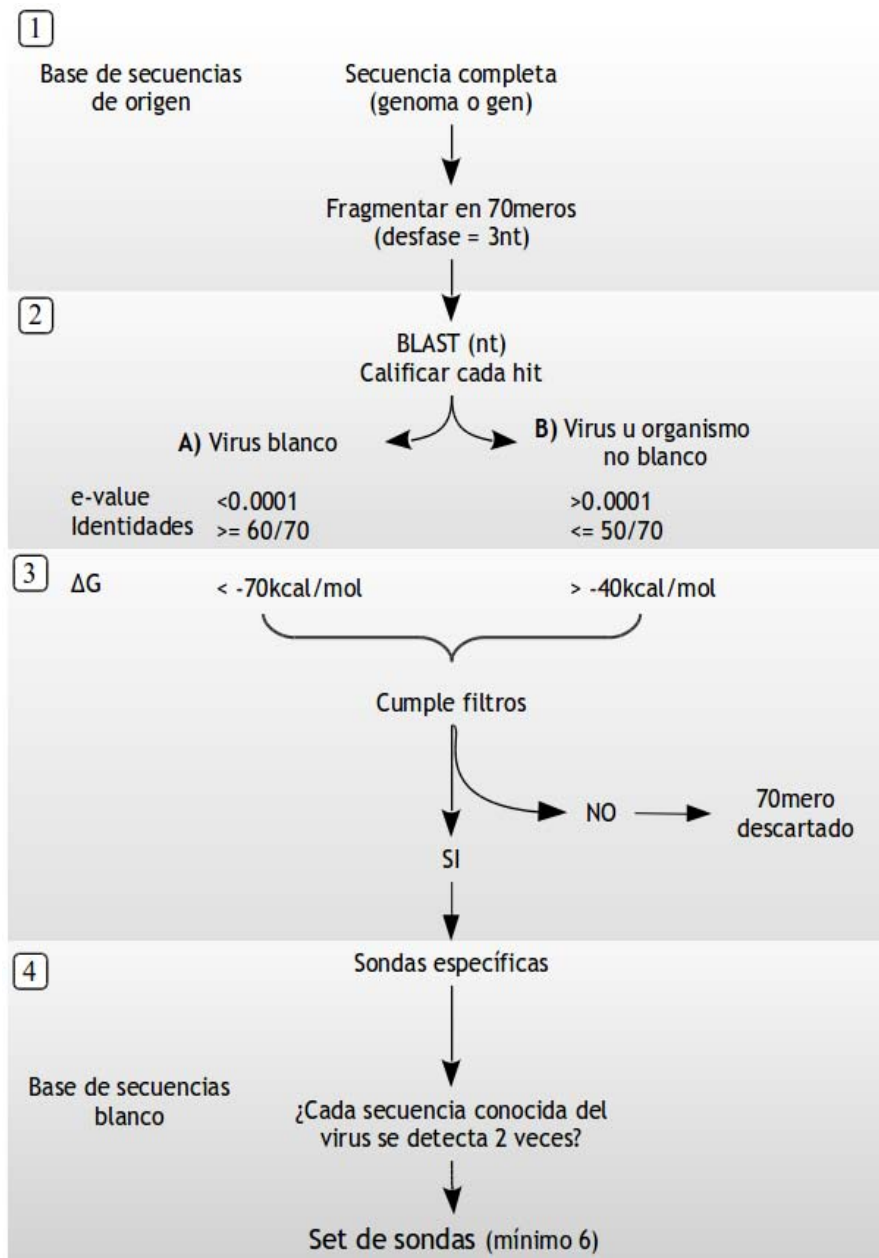
## **Estrategia de selección de sondas**

La Figura 1 ejemplifica el flujo de trabajo seguido para seleccionar las sondas de cada virus. El procedimiento para una secuencia es descrito a continuación, el mismo procedimiento fue aplicado a cada especie de virus.

Al inicio la secuencia de origen (genoma completo) es fragmentada consecutivamente en oligonucleótidos de 70 bases (setentámero/70mero) con un desfase de 3 nucleótidos entre 70meros. Cada setentámero se comparó con la base de secuencias de nucleótidos 'nt' del genbank mediante un alineamiento local (BLAST).

En el resultado del blast se calificó la especificidad y calidad del alineamiento de la sonda con cada 'hit' obtenido. El objetivo fue evaluar que las sondas reconocieran secuencias de su propia especie dentro de los siguientes criterios: identidades de nucleótidos 60/70, e-value < 0.0001 y  $\Delta G < -70$  kcal/mol. Además las sondas no debían reconocer secuencias de otras especies con  $\Delta G < -40$  kcal/mol y 50/70 identidades de nucleótidos.





**Figura 1.** Estrategia de selección de sondas. Se muestran los 4 pasos generales del flujo de trabajo para la selección de sondas aplicado a cada virus de interés. La base de secuencias de origen contiene los representantes de cada especie que se procesan de la siguiente forma, (1) La secuencia se fragmenta consecutivamente en 70meros con un desfase de 3 nt, (2) cada 70mero se somete a BLAST usando la base de secuencias 'nt'; en el resultado se califica cada hit obtenido, en primer lugar se determina la especie u organismo al que pertenece la secuencia, dependiendo de esto, el alineamiento debe o no pasar los filtros establecidos de e-value e identidades; (3) se evalúa el comportamiento experimental mediante la  $\Delta G$  de hibridación. Las pre-sondas que cumplen con estos filtros se denominan sondas específicas. (4) Entre estas sondas se selecciona un grupo de forma que cada secuencia conocida del virus (en la base de secuencias blanco) tenga hibridación con dos sondas de preferencia en regiones diferentes.

Entre las sondas especie-específicas se realizó la selección de un set de 6 sondas (si era posible) que preferentemente no presentaran empalme, es decir mapearan en diferentes partes del genoma del virus, y que en conjunto lograran que cada genoma del virus correspondiente de la base de secuencias blanco fuera reconocido por al menos dos sondas. Debido a la variabilidad dentro de una especie en algunos casos fue necesario utilizar dos o más secuencias de origen y cada secuencia se procesó como se ha descrito previamente.

### **Hibridación *in silico***

Para tener una perspectiva visual del reconocimiento de secuencias blanco por parte de las sondas seleccionadas se implementó un ensayo de hibridación *in silico*. Se seleccionó un genoma representativo por cada virus de interés o en su defecto un gen completo. Después se calculan todas las posibles  $\Delta G$  de hibridación entre la secuencia y una sonda, recorriendo el alineamiento sonda-secuencia una posición a la vez. Al finalizar los cálculos se selecciona la mejor  $\Delta G$  (la más negativa) entre una sonda y una secuencia. El proceso es repetido para cada sonda con cada una de las secuencias representativas seleccionadas. El resultado es ilustrado en un heatmap (gráfico de intensidades) donde cada celda representa la mejor  $\Delta G$  de hibridación esperada entre una secuencia y una sonda. Una hibridación exitosa es representada en gradientes de azul y se define como una  $\Delta G \leq -50$  kcal/mol, mientras que la inexistencia de hibridación es representada en gradientes de gris y se define como una  $\Delta G \geq -49$  kcal/mol. Estos límites fueron definidos con base en los resultados del análisis de hibridación entre oligonucleótidos y secuencias blanco descrito más adelante.

### **Producción de microarreglos**

Los setentámeros seleccionados para reconocer específicamente cada especie de virus de interés fueron sintetizados por Illumina - Oligator (Illumina Inc. EE. UU.). Los oligonucleótidos fueron resuspendidos en una concentración de 400 pmol en buffer 3xSSC (0.45M NaCl, 45 mM citrato de sodio pH 7.0), e impresos sobre laminillas con recubrimiento epóxico en la unidad de Microarreglos del Prostate Centre en el Hospital de Vancouver, Canadá. Cada punto impreso representa una sonda específica para una especie de virus, además cada punto contiene 4 pmol de spike-70, un setentámero sin secuencia

biológica complementaria conocida, que se usa para localizar los puntos en el área del microarreglo. Las laminillas se conservaron en una cámara libre de humedad hasta su uso.

### **Purificación de ácidos nucleicos**

El material genético de lisados de virus (sobrenadantes de cultivo celular de cepas de referencia) se extrajo usando el kit PureLink Viral RNA/DNA (Invitrogen, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de las muestras clínicas y los controles positivos de los virus Norwalk y Sapporo, se usaron 100 mg de heces que fueron homogeneizadas con 100 mg de perlas de vidrio de 150-212  $\mu\text{m}$  (Sigma, EE. UU.), 100  $\mu\text{l}$  de cloroformo y 800  $\mu\text{l}$  PBS (NaCl 136 mM, KCl 2.6 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.76 mM en  $\text{H}_2\text{O}$  mQ) usando un batidor de perlas (Biospec Products, EE. UU.). Posteriormente el homogenado se centrifugó por 10 minutos a 2000 x g, el sobrenadante se recolectó en filtros Spin-X de 22  $\mu\text{m}$  de poro (Costar, NY) y se centrifugó a 5000 x g durante 10-20 minutos. Las muestras filtradas fueron tratadas con Turbo DNase (Ambion, EE. UU.) y RNasa (Sigma, EE. UU.) por 30 minutos a 37°C en baño María e inmediatamente al término se enfriaron en hielo. Después se extrajeron los ácidos nucleicos de 200  $\mu\text{l}$  usando el kit de purificación PureLink Viral RNA/DNA siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ácidos nucleicos de los lisados de virus o de las muestras clínicas se eluyeron en agua libre de nucleasas, se alicuotaron, se cuantificaron en el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, EEUU) y se almacenaron a -70°C para su posterior uso.

### **Amplificación y marcaje de muestras**

El proceso de amplificación y marcaje del material genético extraído de lisados virales o de muestras clínicas se realizó en tres pasos que se describen a continuación. Se realizó la transcripción reversa usando SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, EE. UU.) y el cebador-A (5'-GTTTCCCAGTAGGTCTC<sub>9</sub>-3'). Después se generó la cadena complementaria de DNA (cDNA) en dos rondas de síntesis con la enzima Sequenase 2.0 (USB, EE. UU.). El cDNA producido se amplificó (ronda B) con polimerasa KlenTaq (Sigma, EE. UU.) o Taq (New England Biolabs, EE. UU.) usando el cebador-B (5'-GTTTCCCAGTAGGTCTC-3') [que corresponde a la secuencia 5' del cebador A] en 30 ciclos del siguiente programa: 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 50°C, 1 minuto a 72°C. La segunda

amplificación (ronda C) incluyó nucleótidos modificados aminoallyl-dUTP (TriLink, EE. UU.) en una proporción de 7:3 con dTTP que se incorporaron mediante 20 ciclos de PCR bajo las mismas condiciones descritas previamente y usando 5 µl del producto de la ronda B como material de inicio. Los productos de la amplificación (en adelante llamados muestra) fueron purificados con el kit DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research, EE. UU.). El acoplamiento de fluoróforos Cy-3 a la muestra (referencia o clínica) y Cy-5 a la probe-70 se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (GE HealthCare, EE. UU.). Brevemente, se mezclaron 9 µl de muestra, 1 µl de buffer de carbonatos 0.1 M pH 9 (0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>), 5 µl de fluoróforo (diluido en 50 µl de DMSO) y 1 µl de agua. La reacción de acoplamiento se llevo a cabo durante 90 minutos en ausencia de luz a temperatura ambiente con agitación suave. Al termino del acoplamiento las muestras se purificaron nuevamente usando el kit DNA Clean & Concentrator-5 y la incorporación de fluoróforo se cuantificó por NanoDrop (NanoDrop Technologies, DE).

### **Preparación de laminillas e hibridación**

Las laminillas que contienen impreso el microarreglo requieren un tratamiento previo a ser usadas, el cual se describe brevemente. Las laminillas fueron tratadas con una solución de lavado (50mM etanolamina, 0.1 % SDS, 0.1M Tris pH 9) durante 15 minutos a 50°C, seguido de dos lavados en agua destilada, después se secaron por centrifugación durante 5 minutos a 500 rpm. Las laminillas procesadas se cargaron con 30 µl de la siguiente combinación, muestra marcada con Cy3, probe-70 marcada con Cy5 en buffer 3xSSC. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y ésta se sumergió en baño María a 65°C durante 8-12 horas. Después de la incubación las laminillas se lavaron en las siguientes soluciones de forma consecutiva: 2xSSC (65°C), 2xSSC, 1xSSC, 0.2xSSC y posteriormente se secaron por centrifugación a 500 rpm durante 5 minutos.

### **Obtención de imágenes y análisis de datos**

Las laminillas se analizaron con un escaner Axon GenePix 4000B (Molecular Devices, EE. UU.) sincronizado con el programa GenePix Pro 6.0 para obtener y detectar la intensidad de señal de cada punto y los datos fueron almacenados. En primer lugar, la calidad de cada punto se calificó con los

siguientes parámetros, tamaño y forma del punto (calificado como bueno/malo/ausente), el porcentaje de saturación de señal del canal verde (%F532 saturated < 5) y la proporción de señal del canal verde sobre la señal de fondo del mismo canal [(%F532 > B532 + 2 SD) > 50%]. Los puntos con buena calidad fueron usados para generar el valor de señal de fondo de la hibridación. La normalización de las intensidades de señal se hizo con la siguiente fórmula:  $(F532i/F532m)-(B532i-B532m)$ , donde F532i y B532i son los valores de la intensidad de señal y la señal de fondo del punto “i” respectivamente; y F532m y B532m son la sumatoria de todos los valores de intensidad de señal y de señal de fondo del microarreglo respectivamente.

La significancia estadística de las intensidades en las muestras de referencia se obtuvo mediante el algoritmo de producto de rangos (RP) usando un mínimo de 3 réplicas técnicas [108]. Se registraron los valores de rango de las muestras de referencia para generar un valor de corrección aplicado al análisis de datos de muestras experimentales. En el caso de las muestras clínicas, posterior al control de calidad aplicado a cada spot, las intensidades de señal se transformaron a valores z y se calcularon los valores p y la tasa de falsos positivos usando el paquete fdrtool [109] en R. Las especies de virus positivas se definieron como aquellas que tuvieron al menos dos sondas con un valor  $p < 0.05$  y una tasa de falsos negativos  $< 0.01$ .

### **Límites de detección del microarreglo**

Con el objetivo de determinar la cantidad de partículas virales que pueden ser detectadas por el microarreglo, se usaron tres virus de referencia con diferente tipo de genoma: RV-A con RNA de doble cadena (dsRNA), astrovirus humano de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva (ssRNA+) y adenovirus humano con DNA de doble cadena (dsDNA). El RNA se extrajo de RV-A purificado por gradiente de cesio (cepa RRV) y de células MA104 (usadas para la propagación de RV-A). Se calculó el peso en nanogramos del genoma de RV-A con la siguiente fórmula:  $[\text{longitud del genoma (bp)} \times 325] / 6.022 \times 10^{23}$ . Se analizaron por microarreglo diluciones decrecientes de RNA de RV-A equivalentes desde  $1 \times 10^8$  hasta 10 partículas, mezcladas o no con un exceso de RNA (50 ng) de células MA104. De igual forma se procesaron e hibridaron en microarreglos, diluciones decrecientes de material genético extraído de lisados titulados de astrovirus humano o adenovirus humano equivalentes desde  $1 \times 10^7$  a 100 partículas.

## **Panel de PCR diagnóstico y PCRs de confirmación**

La comparación de resultados del microarreglo se hizo usando como estándar de oro un panel de PCRs de diagnóstico. El material genético extraído de las muestras clínicas fue utilizado en reacciones de RT-PCR usando el kit One-Step RT-PCR (Qiagen, EE. UU.) o el kit SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen, EE. UU.). Para confirmar la presencia de otros virus se realizaron RT-PCRs de confirmación en muestras específicas. Se generó cDNA con SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, EE. UU.) y la amplificación se realizó con polimerasa Taq (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Los cebadores utilizados tanto para las reacciones de diagnóstico como para las pruebas de confirmación se encuentran en la Tabla suplementaria 1 del Anexo 2. Las reacciones de PCR para detección de RV-A incluyeron una incubación de 5 minutos en agua hirviendo y enfriamiento inmediato en hielo justo antes de la reacción. Las condiciones de amplificación para RV-A, HAstV y CV fueron: 30 minutos a 50°C, 15 minutos a 95°C; 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C, 1 minuto a 72°C y extensión final de 5 minutos a 72°C. La condiciones de RT-PCR para adenovirus humano fueron: 30 minutos a 50°C, 15 minutos a 95°C; 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C y extensión final de 5 minutos a 72°C. El programa de amplificación para enterovirus humano fue: 30 minutos a 50°C, 15 minutos a 95°C; 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C, 30 segundos a 72°C con extensión de 5 minutos a 72°C. La amplificación de parechovirus humano fue: 30 minutos a 50°C, 15 minutos a 95°C; 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 48°C, 1 minuto a 72°C y extensión final de 5 minutos a 72°C. La confirmación de TTV se realizó por PCR semi-anidado, las condiciones de la primer ronda fueron: 2 minutos a 94°C; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C y extensión final de 5 minutos a 72°C. La segunda ronda uso 30 ciclos del mismo programa. El bocavirus humano fue detectado mediante Seeplex RV15 OneStep ACE Detection (Seegene, EE. UU.). Los productos fueron visualizados en geles de agarosa de 2% excepto por HEV y TTV que requirieron geles de 3.5% debido al tamaño pequeño del amplicon.

## **Detección de virus por RT-PCR y PCR en tiempo real**

La cantidad de material genético de los virus RV-A, HAdV, HEV, NV, HAstV se determinó mediante RT-PCR o PCR en tiempo real. Se extrajo RNA/DNA de cultivos de virus como se mencionó anteriormente y se cuantificaron los ácidos nucleicos por NanoDrop. La detección de RV-A requirió incubación en agua hirviendo por 5 minutos y enfriado inmediato en hielo. La amplificación de los virus con genoma de RNA (RV-A, HAstV, NV y HEV) se realizó en dos pasos. Primero se hizo transcripción reversa con 3  $\mu$ l de RNA (5 ng), 0.125  $\mu$ l de (50 U/ $\mu$ l) SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, EE. UU.), 0.25  $\mu$ l de inhibidor de RNasa (20 U/ $\mu$ l), 12.5  $\mu$ l de SyBr Green Master Mix 2X (Applied Biosystems, EE. UU.), 1  $\mu$ l del primer cebador y agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 24  $\mu$ l. Las muestras fueron incubadas por 30 minutos a 48°C seguido de la inactivación de la transcriptasa por 10 minutos a 90°C. En el segundo paso se añadió a la reacción 1  $\mu$ l del segundo cebador para un volumen total de 25  $\mu$ l. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: para HAstV y RV-A el programa de amplificación consistió de 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C; el programa de amplificación de NV fue 5 minutos a 95°C; 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 20 segundos a 48°C y 45 segundos a 60°C; para HEV fue 10 minutos a 95°C, 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C; y en el caso de HEV ambos cebadores se añadieron antes de la PCR dado que la transcripción reversa se llevó a cabo con hexameros aleatorios. La amplificación de HAdV consistió de 3  $\mu$ l de DNA (5 ng), 12.5  $\mu$ l de SYBR Green Master Mix 2X y 1  $\mu$ l de cada primer en un volumen total de 25  $\mu$ l por reacción. Las condiciones fueron: 95°C por 8 minutos, 45 ciclos de 30 segundos a 95°C, 20 segundos a 55°C y 20 segundos a 72°C. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un ABI Prism 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems, EE. UU.). Se evaluaron las curvas de disociación en busca de productos no específicos. Se obtuvieron los valores de Ct correspondientes a la detección de secuencias específicas de cada virus en ensayos por triplicado de las muestras que presentaban coinfecciones. Los cebadores para la detección de CV, HAdV y HEV están diseñados para reconocer su blanco a nivel género [73,110,111].

## Resultados

Una parte de las observaciones y resultados obtenidos durante el desarrollo de este proyecto fueron publicados en el Journal of Clinical Microbiology con el título “DNA microarray for detection of gastrointestinal viruses” (Anexo 1 y material suplementario en Anexo 2).

### Virus asociados al tracto gastrointestinal

Nuestro primer objetivo fue identificar los virus de vertebrados conocidos hasta el momento, que pueden estar presentes en tracto gastrointestinal para incluir en el microarreglo. Para ello se realizó una extensa búsqueda de artículos y reportes científicos en el repositorio del NCBI de los virus que pueden encontrarse en el tracto gastrointestinal de los vertebrados.

Las especies de interés que se identificaron están distribuidas en 17 familias virales en las que están contenidos 55 géneros y a su vez una lista de 128 especies de virus (Tabla suplementaria 2, Anexo 2). En esta lista se encuentra el grupo principal de virus asociados a gastroenteritis en humanos: rotavirus A (RV-A), calicivirus humanos (HuCV: virus Norwalk [NV] y virus Sapporo [SV]), astrovirus humano (HAstV) y adenovirus humano (HAdV); además se identificaron virus encontrados en pacientes inmunodeprimidos como citomegalovirus; virus que afectan a animales domésticos: circovirus, coronavirus, parvovirus y pestivirus; virus de diferentes animales de vida silvestre como astrovirus de murciélago, astrovirus de pato, coronavirus murino, coronavirus aviar; e inclusive familias, géneros y especies nuevas de virus, algunos de los cuales aún no se ha confirmado su participación en patogénesis como el género *Cosavirus* (cosavirus humano) y el género *Salivirus* (salivirus A), ambos en la familia *Picornaviridae*.

Debido a que la detección se realiza con base en contenido genético de los virus, podemos resaltar que desde este punto de vista, las especies de interés comprenden cinco de las siete clases de genomas según la clasificación de virus de Baltimore que está basada en parte en el tipo de genoma del virus [112]: virus de RNA de cadena sencilla (ssRNA) tanto de polaridad positiva (clase IV) como negativa (clase V), virus de RNA de cadena doble (dsRNA; clase III), virus de DNA de cadena sencilla (ssDNA; clase II) y de cadena doble (dsDNA; clase I). Hay virus con genoma contenido en una sola cadena y también hay otros cuyo genoma es segmentado (*Arenaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Picobirnaviridae*, *Reoviridae*). Por último, la longitud de los genomas varía entre 1.8 kilobases (kb) [e.g. *Circoviridae*]



hasta más de 30 kb (e.g. *Coronaviridae*), siendo un caso extremo la subfamilia *Herpesvirinae* con más de 230 kb. Esta característica es importante debido a que entre más grande es un genoma, más sondas pueden generarse de diferentes regiones, pero este aumento incremento implica un mayor análisis.

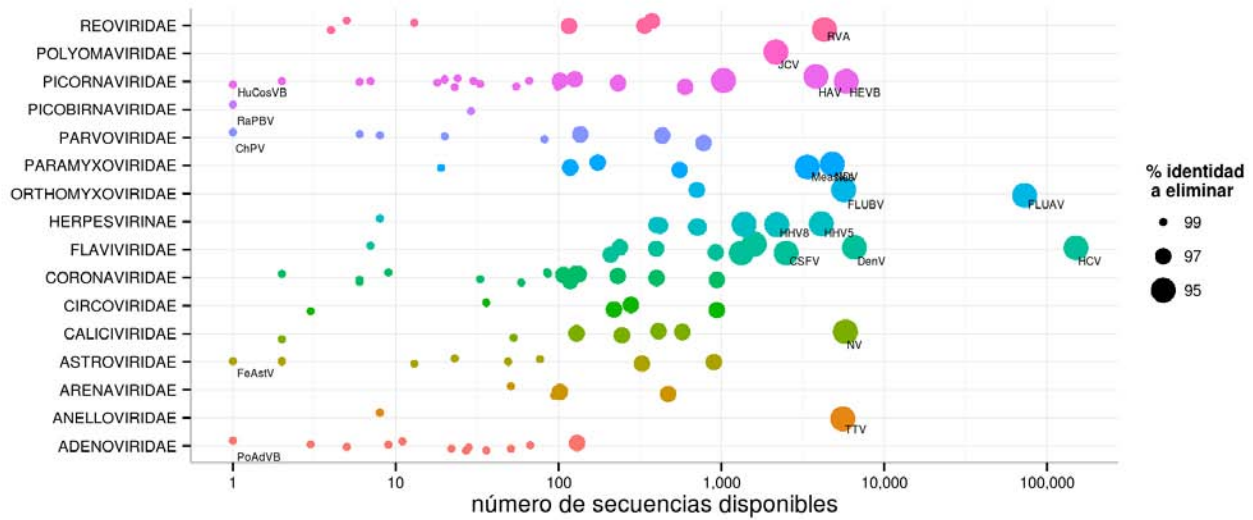
### **Generación de bases de datos de secuencias**

En total se obtuvieron más de 800 mil secuencias de virus. Las secuencias obtenidas se filtraron para separar y retener únicamente las secuencias completas de virus de interés. Se identificaron 302,802 secuencias de interés entre genomas y genes. A pesar de la gran cantidad de secuencias, el número de secuencias por virus era muy variable. Un pequeño grupo de virus (n=12) representaba poco más del 90% de las secuencias (273,491). Se observó que el mayor número de secuencias disponibles pertenece a dos o tres especies por familia (Fig. 2A). El virus más sobre representado era el virus de la Hepatitis C (HCV) con aproximadamente la mitad de las secuencias disponibles (150,857), le seguían el virus de Influenza A y el virus de Dengue con 72,844 y 6,569 respectivamente. Por el contrario, hubo 5 virus de los que sólo se obtuvo una secuencia (Adenovirus Porcino B, Astrovirus Felino, Parvovirus de pollo, Picobirnavirus de conejo y Cosavirus humano B). Por otra parte se obtuvieron 1322 genomas para 83 virus (promedio=11 genomas/virus, sin tomar en cuenta virus segmentados) y de 19 virus no se obtuvo un genoma completo.

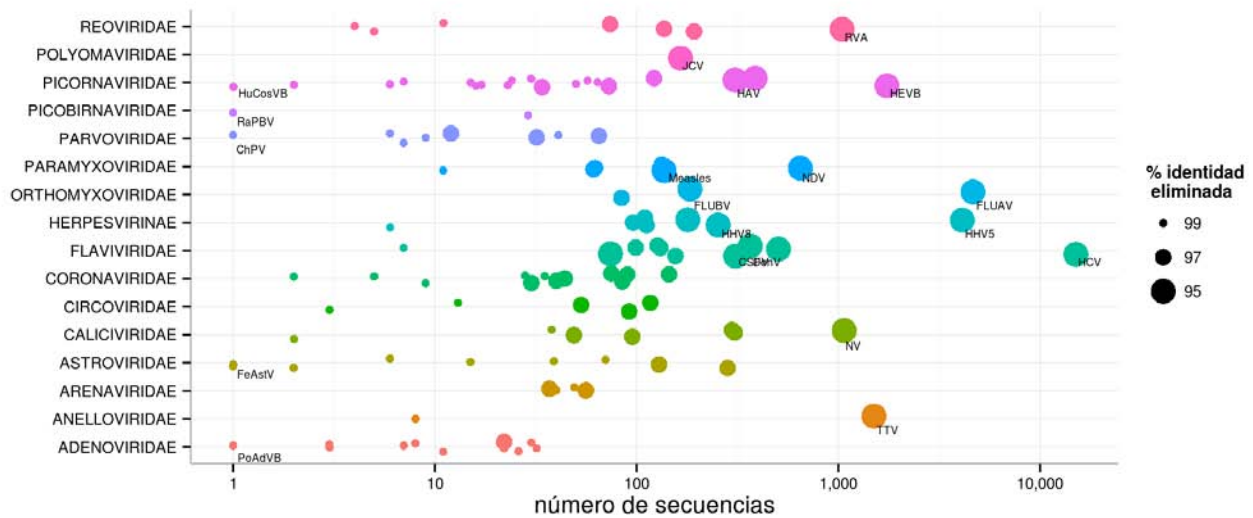
La gran cantidad de secuencias disponibles para algunos virus, sugería que existe cierto grado de redundancia. Debido a que no tiene sentido analizar secuencias que son casi idénticas, decidimos eliminar la redundancia aplicando diferentes límites de porcentaje de similitud (95-99%). El porcentaje eliminado dependió del número de secuencias disponibles por especie (Fig. 2A). Los virus (n=59) a los que se aplicó el filtro de 99% de similitud, eliminaron en promedio el 20% de sus secuencias, 22 de estos virus no eliminaron ninguna. Los virus a los que se aplicaron filtros de 97 y 95% eliminaron al menos el 25 y el 62% de sus secuencias respectivamente (Fig. 3). Los virus que estaban sobre-representados mantuvieron una cantidad mayor de secuencias respecto a los demás virus (Fig. 2B).

Finalmente la base de datos de secuencias de interés quedó compuesta por 38,296 secuencias. En promedio cada virus está representado por 120 secuencias (mediana = 37). Este conjunto de secuencias fue organizado jerárquicamente por Familia, Género y Especie.

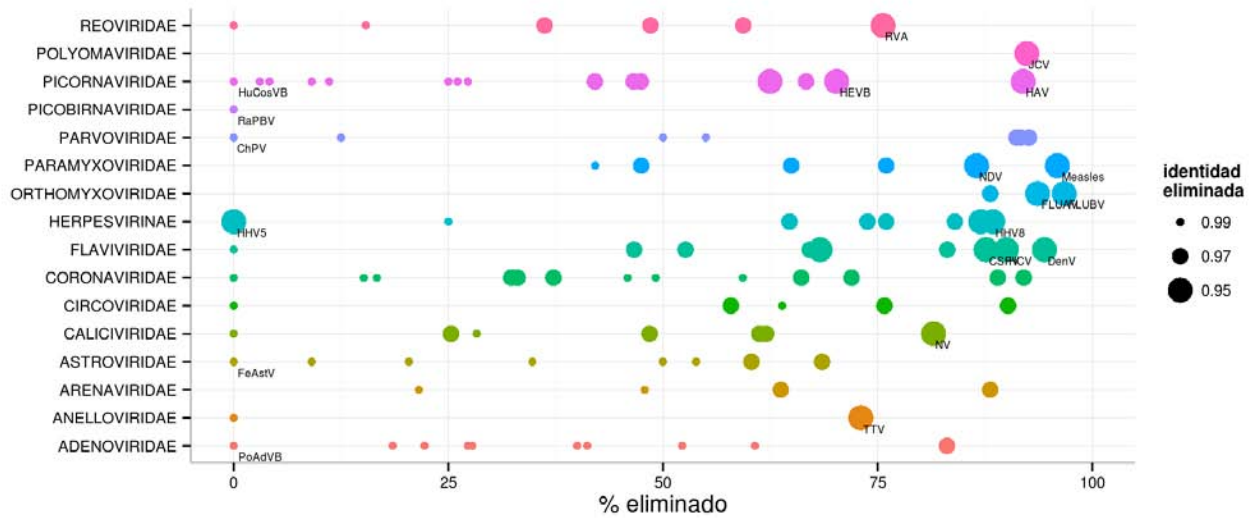
A)



B)



**Figura 2.** Distribución de las secuencias de virus. Se obtuvieron todas las secuencias de virus del repositorio del NCBI. Se separaron las secuencias correspondientes a los virus de interés. Se muestra el número de secuencias por virus dentro de su familia correspondiente (color). El tamaño del punto corresponde al porcentaje de identidad a eliminar [panel A] o ya eliminado [panel B] (>95, 97 o 99%). Se indica el acrónimo de los virus con un número excesivo de secuencias (RVA, Rotavirus A; JCV, Polyomavirus JCV; HAV, virus de la Hepatitis A; HCV, virus de la Hepatitis C; HEVB, Enterovirus Humano B; HHV5, virus herpes humano 5; HHV8, virus herpes humano 8; Measles, virus del Sarampión; NDV, virus de NewCastle; FLUAV, virus de Influenza A; FLUBV, virus de Influenza B; DenV, virus Dengue; NV, virus Norwalk; TTV, Torque Teno Virus) y el acrónimo de los virus con sólo una secuencia (HuCosVB, cosavirus humano B; RaPBV, picobirnavirus de conejo; ChPV, parvovirus de pollo; FeAstV, astrovirus felino; PoAdVB, adenovirus porcino B).



**Figura 3.** Niveles de reducción de redundancia. Se muestra el porcentaje de eliminación de secuencias en los virus agrupados por familia (color), al aplicar diferentes grados de eliminación de identidad (> 95, 97 o 99%).

Al conjunto de las secuencias obtenidas después de aplicar filtros de redundancia se le denominó base de secuencias blanco. Estas secuencias representan para nosotros el universo mínimo de secuencias que las sondas deben reconocer de su especie correspondiente. Por otra parte se tomó por lo menos una secuencia representativa por cada especie de virus para ser procesada y diseñar las sondas. Al conjunto de estas secuencias se le denominó base de datos de secuencias de origen.

### Variabilidad en las secuencias de interés

Como se mencionó anteriormente los virus que nos interesa detectar presentan diferentes características que son importantes para establecer la estrategia de selección de sondas especie-específicas. Una de esas características es el grado de identidad en su secuencia. Generalmente los criterios de demarcación de especies de virus son establecidos por la similitud en secuencia [113]. Dos virus que pertenecen a la misma especie deben compartir generalmente más del 70% en secuencia. Para definir cuál era la

identidad entre los virus de nuestro interés, se realizaron alineamientos de secuencias completas y se obtuvo el porcentaje de identidad entre especies de las principales familias de virus.

Los resultados nos muestran que el promedio de identidad entre los virus de una familia es del 45%, entre más grande es la familia menor identidad puede haber entre sus miembros. Aunque este valor puede parecer bajo, también observamos que dentro de una familia, las especies más cercanas pueden compartir hasta ~70% de identidad, como se ejemplifica en la Tabla 2 para la familia *Adenoviridae* y en el Anexo 3 para otras especies en algunas de las principales familias de virus de interés. Esta información se usó en la estrategia de selección como se explicará más adelante.

**Tabla 2.** Identidad entre especies de la familia *Adenoviridae*

Género	Especie (identidad intraespecie)	Identidad (%)	
Atadenovirus	Bovine Adenovirus D		
	Canine Adenovirus	44	
	Human Adenovirus A	44 54	
	Human Adenovirus B (87%)	43 55 63	
	Human Adenovirus C	41 54 63 68	
	Human Adenovirus E	41 54 62 79 70	
	Mastadenovirus	Human Adenovirus F	42 55 67 65 64 65
		Human Adenovirus G	41 54 57 66 66 67 74
		Ovine Adenovirus A	46 54 54 55 54 53 54 54
		Porcine Adenovirus A	39 53 53 57 57 60 56 58 53
Porcine Adenovirus C		44 54 54 56 55 56 55 56 66 56	

### Implementación de la estrategia de selección de sondas

Nuestro siguiente objetivo consistió en generar y seleccionar las sondas que detecten de forma específica cada especie de virus de interés. La estrategia planificada consta de 4 pasos generales (Fig. 1): comienza con (1) la generación de oligonucleótidos en los que (2) se evalúa su especificidad y (3) su desempeño de hibridación experimental. Posteriormente del grupo de sondas específicas (4) se selecciona un grupo tal que cada secuencia en la base de secuencias blanco sea reconocida al menos

dos veces, de preferencia por sondas diseñadas de regiones diferentes. El grupo seleccionado debía ser de mínimo seis sondas.

Para realizar la evaluación de los oligonucleótidos primero determinamos sus capacidades para obtener reconocimiento especie-específico. Una vez definidas las capacidades se aplicarían filtros de selección para determinar si la sonda era específica y si funcionaría adecuadamente en las condiciones experimentales deseadas. El análisis de alineamientos locales y el valor de la  $T_m$  de los oligonucleótidos, son dos formas de aplicar filtros de selección usadas en otros trabajos [31]. Por lo tanto, para comprobar y establecer los parámetros de selección se realizó la siguiente serie de pruebas.

### **Evaluación de los parámetros de hibridación**

Los oligonucleótidos que usaríamos como sondas son de setenta nucleótidos (70mero). Para comparar su capacidad de hibridación teórica se utilizaron además oligonucleótidos de otras dos longitudes: sesenta nucleótidos (60mero) y cincuenta nucleótidos (50mero). Los tres tamaños de oligonucleótido se evaluaron con base en la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) y la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ). Se comparó la hibridación teórica con su complementario perfecto y con secuencias que presentaban diferente número (5, 10 o 20) de malos apareamientos (“mismatches”) introducidos al azar y sin repeticiones en los sitios de sustitución.

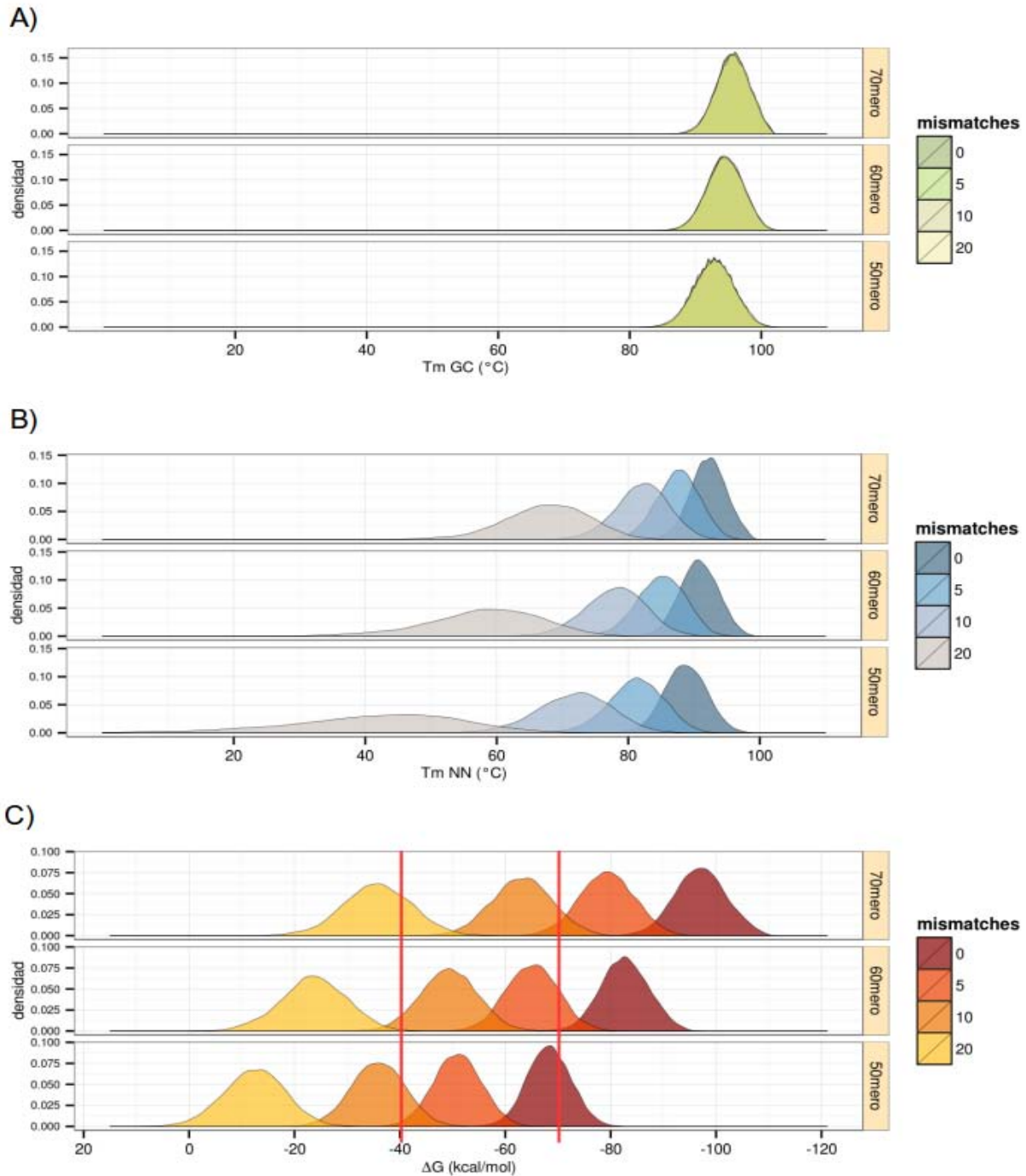
Los setentámeros ( $n=10,000$ ) fueron generados de forma aleatoria con base en tripletes de DNA (codones), con un contenido de GC en el rango de 28-65% que es el contenido de GC presente en la secuencia de los virus de interés. Para comparar con mayor precisión los resultados de las tres longitudes analizadas, los 70meros fueron recortados a 60 y 50 nucleótidos de forma que compartieran la misma secuencia.

Para cada combinación de longitud de oligonucleótido y secuencia complementaria con o sin mismatches se calculó la  $T_m$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) por los métodos de contenido de GC y por 'vecino más cercano', además se hizo el cálculo de la  $\Delta G$  (kcal/mol). Estos métodos fueron descritos en la introducción y en la sección de materiales y métodos.

Mediante el método de contenido de GC, el rango de  $T_m$  en setentámeros fue de 90-101 $^{\circ}\text{C}$ . El rango de  $T_m$  en 60meros y 50meros fue de 88-101 $^{\circ}\text{C}$  y 87-99 $^{\circ}\text{C}$  respectivamente (Fig. 4A). Se observó que no existe una diferencia notable entre la distribución de la  $T_m$  en las tres longitudes de oligonucleótidos.

Además, el rango de  $T_m$  no cambia en ninguna longitud cuando se introducen mutaciones, debido a que la fórmula de 'contenido de GC' no toma en cuenta la cadena complementaria y por lo tanto la presencia de mismatches no es considerada, este efecto se observa en el empalme de los colores de las curvas en la figura 4A. Por otra parte, usando el método de 'vecino más cercano' el rango de  $T_m$  en oligonucleótidos complementarios perfectos fue de 85-99°C para 70meros; 83-99°C para 60meros y de 80-97°C para 50meros (Fig. 4B). Aunque las diferentes longitudes tienen un rango similar cuando las cadenas son complementarios perfectos, la introducción de mismatches provoca que el rango de  $T_m$  de la población se desfase. Además, mientras más sustituciones se introducen, se aumenta la dispersión de la  $T_m$ . En el caso de  $\Delta G$ , los valores de hibridación mostraron rangos de -83 a -110 kcal/mol en 70meros; -70 a -95 kcal/mol en 60meros y -57 a -80 kcal/mol en 50meros (Fig. 4C). Los valores de  $\Delta G$  presentan un mayor desfase en comparación con los valores de  $T_m$  en las dos condiciones evaluadas, longitud de oligonucleótido y número de mismatches.

Estos resultados nos indican que el cálculo de la  $T_m$  por contenido de GC no es un parámetro útil para diferenciar el comportamiento de un oligonucleótido al hibridar con diferentes secuencias. Por el contrario los cálculos de  $T_m$  y  $\Delta G$  usando el método de 'vecino más cercano' producen valores que nos permiten predecir las diferencias en la hibridación de oligonucleótidos con secuencias que no son complementarias perfectas. Estos cambios son más evidentes cuando se analizan los valores de  $\Delta G$ , e inclusive como población tienen un comportamiento más consistente (menor dispersión). Por lo tanto, se decidió utilizar la  $\Delta G$  como la estrategia de selección para evaluar el comportamiento de las sondas en condiciones experimentales.



**Figura 4.** Efecto de malos apareamientos en la  $T_m$  y  $\Delta G$  de oligonucleótidos. Se introdujeron diferentes cantidades (0, 5, 10 o 20) de malos apareamientos (“mismatches”) en la cadena complementaria de 10,000 oligonucleótidos de tres longitudes diferentes (70, 60 y 50meros) de secuencia al azar. Se muestra el efecto de la introducción de mismatches en: la  $T_m$  calculada por el método de contenido de GC (panel A) o la  $T_m$  (panel B) y la  $\Delta G$  (panel C) mediante el método de vecino más cercano (NN).

## **Alcance de hibridación en oligonucleótidos**

Tener un valor que nos permita establecer las diferencias en la hibridación de un oligonucleótido con cadenas no complementarias perfectas, y que además nos permita definir si estas diferencias afectan negativamente su posible comportamiento experimental, es de gran utilidad para nosotros. Esto es debido a que, como se mencionó anteriormente, los virus dentro de una especie pueden presentar diferentes grados de variación en su secuencia. Por lo tanto, nos interesa saber cuál es la capacidad de un 70mero para hibridar con secuencias de diferente grado de similitud.

Para este objetivo analizamos los valores de  $\Delta G$  calculados entre tres longitudes de oligonucleótidos (70mero, 60mero, y 50mero) y secuencias con cuatro grados de variación (0, 5, 10 o 20 malos apareamientos) ya presentados anteriormente (Fig. 4C). Esta vez, las observaciones las enfocamos a la cantidad de mismatches y su relación con los valores de  $\Delta G$ .

En la Figura 4C se observa que los 70meros reducen su valor promedio de  $\Delta G$  a -80 kcal/mol cuando se enfrentan a secuencias con 5 mismatches aleatorios, los 60meros promedian -67 kcal/mol y los 50meros -52 kcal/mol. Cuando la secuencia a hibridar hace 10 mismatches aleatorios con los oligonucleótidos, la  $\Delta G$  promedio de los 70meros, 60meros y 50meros es -63 kcal/mol, -50 kcal/mol y -37 kcal/mol respectivamente. En la última condición evaluada (20 mismatches aleatorios) los 70meros promedian -37 kcal/mol; los 60meros, -23 kcal/mol y los 50meros -18 kcal/mol (Fig. 4C). Como era esperado, los setentámeros por su longitud 'soportan' mayor cantidad de malos apareamientos de forma que su  $\Delta G$  disminuye menos al incrementar los mismatches, en comparación con las otras longitudes de oligonucleótidos.

Se ha reportado que en condiciones experimentales dos oligonucleótidos (50-70 bp) pueden hibridar cuando comparten >75% en secuencia [114–117]. Por lo tanto los 70meros pueden hibridar con secuencias que presentan hasta 18 mismatches. Como se describió previamente, la similitud entre dos secuencias de una misma especie es  $\geq 70\%$  (Tabla 2 y Anexo 3), en un 70mero esto es más de 50 nt. Por el contrario dos secuencias de diferente especie pueden tener hasta 70% de identidad en secuencia, en 70meros esto corresponde aproximadamente a dos secuencias con al menos 20 malos apareamientos. Esto quiere decir que las sondas deben hibridar con secuencias de >70% identidad y no deben hibridar con secuencias de <70%. La relación de estas premisas con los valores de  $\Delta G$  descritos en Figura 4C nos ayuda a establecer valores diferenciales de  $\Delta G$  que las sondas deben presentar entre secuencias blanco y no blanco.



Por lo tanto, se estableció que el valor mínimo de  $\Delta G$  entre una sonda y una secuencia blanco debía ser -70 kcal/mol, es decir en un 70mero se permiten en promedio 5 mismatches (Fig. 4C). Para evitar que una sonda reconozca una secuencia no blanco, la  $\Delta G$  de esta interacción debe ser máximo -40kcal/mol, esto indica que debe haber al menos 20 mismatches (Fig. 4C). El intervalo de  $\Delta G$  entre las secuencias blanco y no blanco (de -70 a -40 kcal/mol) tiene el propósito de proporcionar una zona de seguridad.

### **Integración de la estrategia de selección**

Los resultados anteriores fueron integrados a la estrategia de selección de la siguiente forma. Las secuencias de origen se fragmentaron en oligonucleótidos de 70 bases. Para evaluar las posibles hibridaciones de cada 70mero se realizó BLAST usando la base de secuencias de nucleótidos 'nt'. De esta forma obtenemos alineamientos con secuencias de una gran variedad de organismos, además de las secuencias de virus. El uso de BLAST también nos permite obtener alineamientos más flexibles en cuanto a la presencia de malos apareamientos.

En cada 70mero se analizaron todos los hits que arrojó el blast. En cada hit se verificó en primer lugar a qué organismo pertenecía la secuencia, después se evalúan los filtros. Para ser tomado como sonda buena, el e-value del alineamiento debía ser menor a 0.0001. Dado el tamaño de la base de datos (> 9.5 millones de secuencias) consideramos que este valor era suficiente para descartar las sondas que reconocieran secuencias no específicas. Después, se evaluó que las identidades del alineamiento fueran al menos 60/70, es decir que tuvieran al menos el 85% de identidad (que es el promedio de identidad dentro de una especie). Posteriormente se calculó la  $\Delta G$  del alineamiento (Fig. 1).

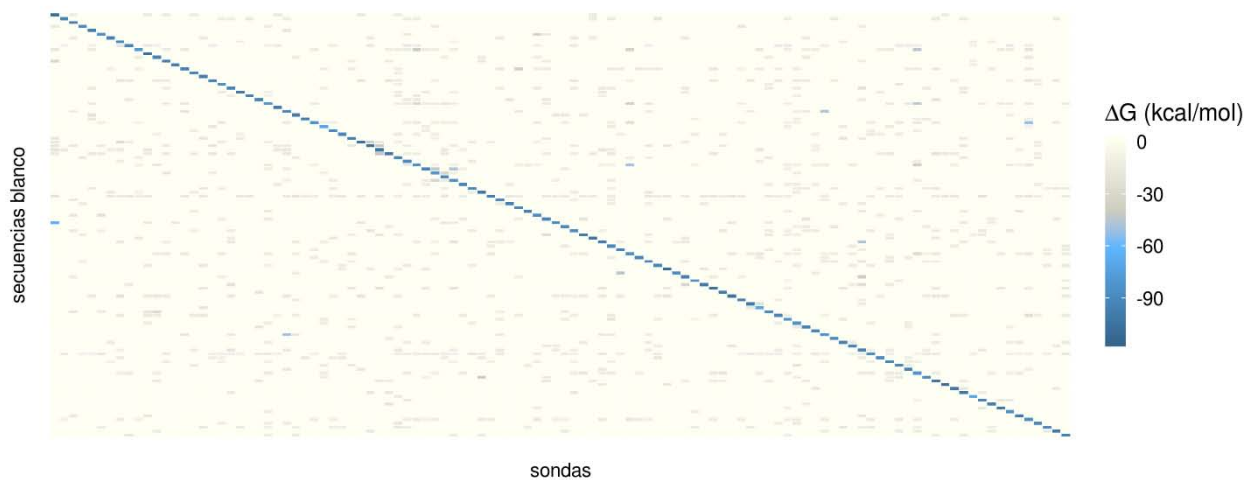
Si el hit era con el virus de interés correspondiente, el alineamiento debía pasar adecuadamente los filtros de e-value e identidades; y la  $\Delta G$  debía ser menor a -70 kcal/mol (Fig. 1). Con este valor se permite que el 70mero tenga algunos malos apareamientos con su blanco y que además pueda soportar algunos mismatches más sin cambiar demasiado su  $\Delta G$ . Es decir, se permiten principalmente alineamientos con hasta 5 mismatches, lo que nos da en promedio  $\Delta G=-80$ kcal/mol. Si esa secuencia de interés presentara más variación, la sonda sería capaz de “soportar” una cantidad extra de mismatches.

Por el contrario si el hit era con una secuencia que no debe reconocer (e.g. otra especie de virus u otro organismo), entonces el alineamiento debía fallar los filtros de e-value e identidades; y además, la  $\Delta G$  debía ser mayor a -40 kcal/mol (Fig. 1, opción B). Es decir, los hits con secuencias no-específicas

debían ser realmente malos alineamientos. Al grupo de 70meros que producen alineamientos de buena calidad con secuencias de interés y alineamientos de mala calidad con secuencias de no-interés, se les considera sondas específicas.

El último paso involucra la comparación con la base de secuencias blanco. Las secuencias dentro de esta base representan la variabilidad conocida de cada especie de virus que nos interesa detectar. Por lo tanto, se escogió un grupo de sondas que en conjunto reconociera cada secuencia en la base de secuencias blanco al menos dos veces. Este grupo debía ser de mínimo seis sondas y de preferencia las sondas debían reconocer diversas regiones del genoma.

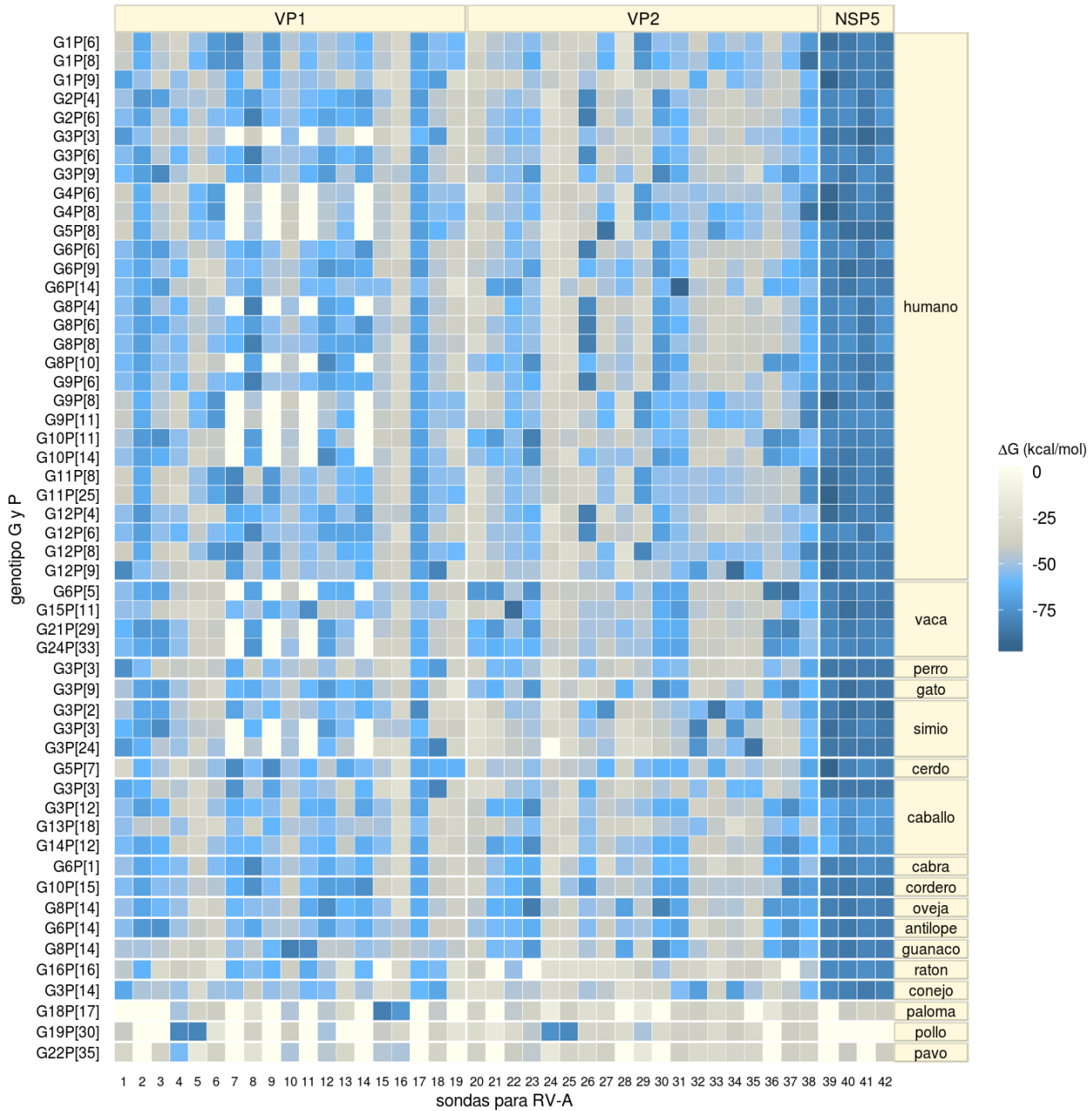
Aplicando esta estrategia a secuencias de 128 virus logramos seleccionar un grupo de 1256 sondas de 70nt (Tablas suplementarias 2 y 3 de Anexo 2). En promedio contamos con ~10 sondas por virus. Los virus con mayor número de sondas son Rotavirus A (42 sondas), Alphacoronavirus 1 (28 sondas) y Ortoreovirus de mamífero (25 sondas). Sin embargo, hubo algunas especies (n=18) de las que no logramos obtener el set mínimo de seis sondas, aún así se incluyeron las sondas disponibles para cada especie (de 2 a 5 sondas). Las sondas fueron sintetizadas e impresas en laminillas como se indica en los materiales y métodos, cada laminilla contiene 2 arreglos de sondas.



**Figura 5.** Hibridación *in silico* de las sondas seleccionadas. Se muestra el valor de  $\Delta G$  calculado entre el set completo de sondas ( $n=1246$ ) y secuencias de virus blanco ( $n=138$ ). La escala de color representa en azul (-110 a -50 kcal/mol) los valores de  $\Delta G$  donde se espera hibridación y de gris a blanco (-49 a 0 kcal/mol) los valores donde no se espera hibridación.

### Hibridación *in-silico*

Con el objetivo de detectar y cubrir la variabilidad de las secuencias dentro de una especie, durante el proceso de selección se establecieron varios filtros (e-value, identidades,  $\Delta G$ ). Entre esos filtros se determinó que el valor de  $\Delta G$  representaba un parámetro con el que se obtiene una aproximación al comportamiento de la sonda en condiciones experimentales. Por lo tanto utilizamos este valor para simular *in silico* la interacción de las sondas con secuencias representativas que deberían reconocer de forma específica, representando el valor de hibridación en un gráfico de intensidades de color (Fig. 5). Debido a la cantidad tanto de secuencias blanco representativas ( $n=138$ ) como de sondas ( $n=1256$ ) que se analizaron, la simulación de esta hibridación se muestra sólo como ejemplo ilustrativo del set completo. Para obtener un representación visual más clara se realizaron hibridaciones *in silico* con un virus de gran variabilidad y con suficientes secuencias reportadas, rotavirus A.

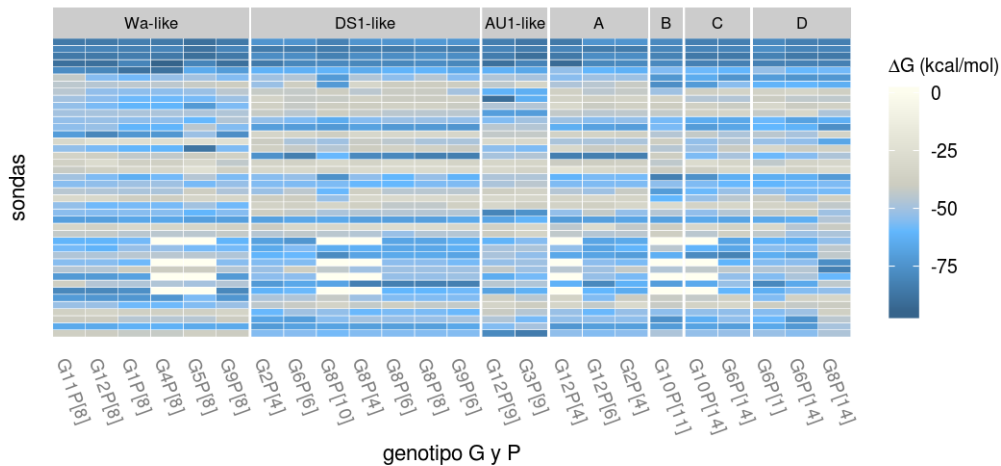


**Figura 6.** Detección *in silico* de genotipos G/P de rotavirus A. Se obtuvieron los segmentos 1, 2 y 11 (VP1, VP2, NSP5, respectivamente) de las cepas de rotavirus que representan y están disponibles para los genotipos G y P conocidos y se calculó la  $\Delta G$  de hibridación con las sondas seleccionadas para rotavirus A. Se muestra en tonos de azul las sondas (columnas, n=42) que se espera reconozcan las cepas (renglones) correspondientes; y en escala de gris a blanco aquellas relaciones sonda-cepa que no serán reconocidas. Las combinaciones de genotipos son principalmente encontradas en diferentes huéspedes indicados con las etiquetas de la columna derecha.

Rotavirus se clasifica con base en las proteínas de cápside externa VP7 y VP4 en genotipos G y P, lo que ha permitido diferenciar 27 genotipos G y 35 genotipos P respectivamente, lo que conduce a una gran cantidad teórica de posibles variantes del virus [54]. A pesar del gran número de posibles variantes, sólo se han detectado algunas combinaciones de genotipos G y P en humanos [55]. Para la detección de rotavirus por microarreglo seleccionamos tres segmentos del genoma: VP1, VP2 y NSP5, los cuales representan segmentos más conservados que las proteínas de capa externa. Para evaluar si la variación conocida de los genotipos G/P de rotavirus podría ser reconocida por el microarreglo, se recolectaron los genomas de los representantes disponibles y se calculó su  $\Delta G$  de hibridación. Se obtuvieron 21 y 23 genomas correspondientes a aislados virales de los diferentes genotipos G y P respectivamente. En los genotipos G 7, 17, 20, 23, 26 y 27; y en los genotipos P 13, 20-23, 26, 28, 32 y 34 no fue posible obtener las secuencias correspondientes a nuestros segmentos de interés (VP1, VP2 y NSP5).

En los resultados de la simulación además de presentarse en un heatmap, se muestran agrupadas las combinaciones de genotipo G/P por el huésped en el que son encontradas con mayor frecuencia (Fig. 6). En esta simulación se observó que con el uso de sondas generadas a partir de los segmentos VP1, VP2 y NSP5, se pueden detectar en teoría la mayoría de los distintos rotavirus A determinados por los genotipos de los segmentos G y P. Es importante notar que, como se mencionó anteriormente, no todos los genotipos se han encontrado en humanos por lo que hay secuencias que provienen de una gran variedad de especies domésticas y silvestres. El único virus que no fue claramente reconocido fue el genotipo G22P[35] que pertenece a una cepa aislada de pavo. Para mejorar la probabilidad de detectar los rotavirus de aves es necesario añadir sondas específicas para este grupo.

La constante agrupación de genotipos de los 11 segmentos del genoma en diferentes rotavirus humanos, ayudó a establecer la clasificación de rotavirus humanos en constelaciones [55]. Para analizar el desempeño de las sondas frente a las constelaciones de rotavirus A humanos, se obtuvieron representantes de las constelaciones Wa-like, DS1-like, AU1-like y de las rearreglantes 'Wa-like x DS1-like', 'Wa-like x bovino', 'humano bovino-like' y 'artiodáctilo bovino-like' y se realizaron hibridaciones *in silico* con las sondas seleccionadas para rotavirus A (Fig. 7). En los resultados pudimos comprobar que las sondas seleccionadas reconocen en teoría todos los representantes disponibles de las tres constelaciones principales y de las constelaciones de rearreglantes más frecuentes.



**Figura 7.** Hibridación *in silico* de las principales constelaciones de rotavirus. Se obtuvieron los segmentos 1, 2 y 11 (VP1, VP2 y NSP5) de las cepas de rotavirus que representan las principales constelaciones (combinación de genotipos de los 11 segmentos del virus) encontradas en humanos (Wa-like, DS-1-like y AU-1-like), además de las constelaciones de recombinantes más frecuentes (A = rearreglante Wa-like x DS-1-like; B = rearreglante Wa-like x bovino; C = Humano bovino-like; D = Artiodáctilo bovino-like) y se calculó la  $\Delta G$  de hibridación con las sondas seleccionadas para rotavirus A. Se muestra en tonos de azul (-90 a -50 kcal/mol) aquellas sondas que reconocen la cepa correspondiente y en escala de gris a blanco (-49 a 0 kcal/mol) la relación sonda-cepa que no hibridan. Se observa que todas las cepas evaluadas son reconocidas al menos por dos sondas. Además, diferentes sondas reconocen diferentes constelaciones aunque no hay un patrón definido para cada constelación.

### Validación del microarreglo con virus de referencia

La evaluación inicial del microarreglo se realizó con 14 lisados virales de 10 diferentes especies de virus (Tabla 1). Se extrajo RNA de virus de referencia y se procesó para hibridar con los microarreglos. Entre los virus validados se encuentran 4 de los principales patógenos humanos (RV-A, NV, SV, HAstV) y varios virus no-humanos (calicivirus felino, virus de la diarrea bovina 1, virus de parainfluenza bovina 3). Las 10 especies de virus fueron detectadas de forma adecuada. Además es importante resaltar que para dos especies (RV-A y reovirus) se analizó más de una cepa. Este resultado sugiere que las sondas son capaces de reconocer variantes dentro de una especie.

## **Sondas no específicas**

Mediante el análisis estadístico de las réplicas técnicas en los ensayos de validación, se identificaron sondas con comportamiento no específico (n=26). Esto es, sondas que presentaban señal positiva independientemente de la muestra evaluada. Para determinar el origen de la inespecificidad de estas sondas, se analizaron diferentes características.

En primer lugar se revisaron los resultados de blast. En la lista de hits no se encontraron alineamientos no-específicos (de buena calidad) con otros virus. Sin embargo, se encontraron hits de muy mala calidad con secuencias de baja complejidad de origen humano. En segundo lugar se calculó el contenido de GC (%) y se observó que en algunas sondas (n=6) el contenido de GC era superior a 60%. En tercer lugar se analizaron las características de los virus donde provinieron esas sondas. Observamos que la familia y el tipo de genoma no son características compartidas ni mayormente representadas. Sin embargo, a nivel de especie sobresalen tres sondas provenientes de un mismo virus (metapneumovirus aviar) que se originaron de una región de ~300 bp. Usando herramientas de análisis de secuencias se determinó que esta región presenta secuencias de baja complejidad [118,119].

Estos resultados nos sugieren que la inespecificidad de las sondas identificadas tiene diferentes causas como el contenido de GC y la presencia de regiones de baja complejidad. Todas las sondas con reactividad no específica fueron descartadas de análisis posteriores.

## **Determinación de los límites de detección**

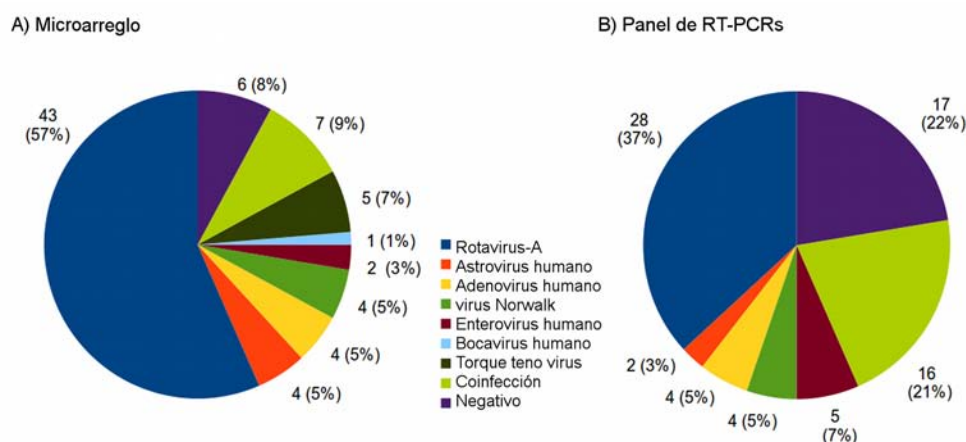
Como siguiente objetivo evaluamos los límites de detección de la plataforma. Se extrajo RNA de partículas de rotavirus purificadas por gradiente de cesio y de lisados de cultivos de astrovirus humano y adenovirus humano C (HAdV-C) con títulos virales conocidos. En el caso de RV-A se realizó el cálculo del peso en nanogramos del material genético contenido en una partícula del virus el cual está compuesto de 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA); una partícula de RV-A contiene aproximadamente  $1.94 \times 10^{-8}$  ng. Por otra parte se extrajo RNA de células MA104 utilizadas para la propagación de rotavirus A. Con estas herramientas se procesaron e hibridaron cantidades decrecientes de RNA viral correspondientes desde:  $10^8$  hasta 10 partículas virales con o sin la adición de 50ng de RNA celular. Con base en el análisis de las hibridaciones pudimos observar que el límite de detección

de RV-A, HAstV y HAdV-C es de  $1 \times 10^3$  partículas virales, además el límite decreció a  $1 \times 10^4$  partículas cuando se añadió RNA celular a la muestra de RV-A.

### Análisis de muestras clínicas

Para validar el desempeño de la plataforma con muestras clínicas, se obtuvo un grupo de 76 muestras de heces de niños menores de 5 años que presentaron diarrea aguda durante la temporada de invierno de 2004-2005 en Monterrey, Nuevo León. Al tiempo de recolección, las muestras fueron analizadas mediante rotaforesis, una técnica que evalúa la presencia de dsRNA de rotavirus mediante electroforesis.

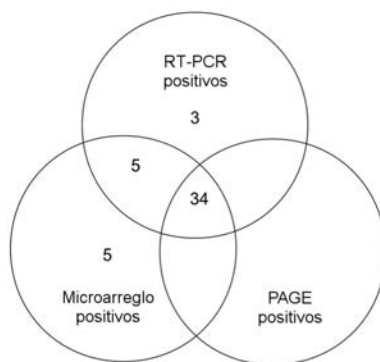
En nuestro laboratorio las muestras fueron procesadas desde la purificación de ácidos nucleicos hasta la hibridación de microarreglos. De las 76 muestras se encontró al menos un agente viral en 70 muestras y 6 muestras resultaron negativas (Fig. 8). Entre las 70 muestras positivas en 63 se identificó sólo un agente viral mientras que en 7 se encontró más de un virus. Los virus encontrados y su distribución en muestras positivas fue la siguiente: 44 RV-A, 5 HAstV, 4 HAdV, 5 NV, 1 SV, 5 HEV, 2 HPeV, 12 TTV y 1 bocavirus humano (HBoV). En las muestras con más de un agente viral ( $n = 7$ ) las combinaciones encontradas fueron: 3 HEV/TTV, 1 NV/TTV, 1 HEV/HAstV/TTV, 1 RV-A/HPeV/TTV y 1 HEV/SV/HPeV/TTV (Fig. 8). Es importante señalar que con los datos obtenidos con el microarreglo no es posible determinar si la presencia de un virus está relacionada a la patogenicidad.



**Figura 8.** Prevalencia de virus en muestras clínicas. Un grupo de 76 muestras clínicas de niños que presentaron gastroenteritis fue analizado mediante microarreglo (A) o mediante un panel de 5 PCR's diagnóstico para los 5 principales virus gastrointestinales (B). Las coinfecciones indican muestras con al menos 2 virus identificados. Negativo son las muestras donde no se identificaron virus.



La evaluación inicial de las muestras por rotaforesis (diagnóstico de RV-A), detectó 34 muestras positivas. Como se mencionará mas adelante, se utilizó PCR de punto final para confirmar la presencia de 5 principales virus gastrointestinales, entre ellos RV-A. Encontramos que todas éstas muestras identificadas originalmente como positivas para RV-A fueron confirmadas tanto por PCR como por microarreglo (Fig. 9). Adicionalmente se identificaron 13 muestras positivas de las cuales 3 fueron identificadas únicamente por PCR y 5 únicamente por microarreglo, compartiendo 5 positivos mediante ambos métodos (Fig. 9).



**Figura 9.** Identificación de rotavirus A. En un grupo de 76 muestras de gastroenteritis se buscó rotavirus por tres métodos diferentes. Los métodos fueron visualización del material genético del virus por electroforesis, RT-PCR y el microarreglo. Se muestra el número de muestras positivas por cada uno de los métodos mencionados y sus intersecciones.

Para verificar los resultados del microarreglo, se utilizó PCR de punto final. Aunque solo se establecieron protocolos para identificar de forma específica 5 virus considerados de mayor impacto en humanos: RV-A, CV, HAstV, HAdV y HEV. Los cebadores para CV, HAdV y HEV están diseñados para reconocer su blanco a nivel de género. De forma general y descriptiva, la PCR arrojó como resultado 56 muestras positivas y 20 muestras negativas. Entre las muestras positivas, 40 fueron infecciones sencillas y en 16 muestras se identificó más de un virus. La distribución total de virus identificados por PCR fue la siguiente: 42 RV-A, 13 HAdV, 6 CV, 3 HAstV, 9 HEV. Por otra parte, las combinaciones de virus identificadas fueron: 8 RV-A/HAdV, 5 RV-A/HEV, 1 RV-A/CV, 1 HAstV/HEV y 1 CV/HAdV/HEV (Fig. 8).

Si se usan los resultados de las PCRs como “estándar de oro”, la comparación con los resultados del microarreglo a nivel individual es la siguiente. La especificidad en la detección de los 5 grupos de virus (RV-A, HAdV, CV, HAstV y HEV) mediante microarreglo es adecuada (85-100%), al igual que la sensibilidad en detección de RV-A, CV y HAstV (93-100%); sin embargo la sensibilidad de HAdV y HEV fue baja (30 y 42%) [Fig. 10]. Analizando las muestras donde el microarreglo no logró detectar HAdV o HEV, se observó que tales muestras eran positivas por PCR para otro virus, es decir, contenían coinfecciones. Como se mencionó anteriormente el microarreglo detectó solamente 7 coinfecciones mientras por PCR se determinaron 16.

RV-A				HAdV				CV			
	PCR+	PCR-		PCR+	PCR-		PCR+	PCR-		PCR+	PCR-
array +	39	5	44	array +	4	0	4	array +	6	0	6
array -	3	29	32	array -	9	63	72	array -	0	70	70
	42	34	76		13	63	76		6	70	76
	Especificidad 85%			Especificidad 100%			Especificidad 100%			Especificidad 100%	
	Sensibilidad 93%			Sensibilidad 30%			Sensibilidad 100%			Sensibilidad 100%	

HAstV				HEV				
	PCR+	PCR-		PCR+	PCR-		PCR+	PCR-
array +	3	2	5	array +	5	2	7	
array -	0	71	71	array -	7	62	69	
	3	73	76		12	64	76	
	Especificidad 97%			Especificidad 97%			Especificidad 97%	
	Sensibilidad 100%			Sensibilidad 42%			Sensibilidad 42%	

**Figura 10.** Especificidad y sensibilidad del microarreglo. Se utilizó un panel de 5 PCRs (rotavirus A [RV-A], astrovirus humano [HAstV], adenovirus humano [HAdV], calicivirus [CV] y enterovirus humano [HEV]) para evaluar un grupo de 76 muestras clínicas. Los resultados se compararon con los obtenidos por el microarreglo. Se muestran la sensibilidad y especificidad del microarreglo, comparado con la prueba de RT-PCR o PCR correspondiente.

Las coinfecciones que fueron detectadas por microarreglo pero que no fueron detectadas por PCR incluyen virus que no fueron analizados por PCR (TTV, HPeV) pero que fueron confirmados posteriormente mediante la amplificación y secuenciación. Por otro lado, analizando las combinaciones encontradas por PCR que el microarreglo detectó como infecciones sencillas, se observó que en su mayoría contenían RV-A (14 de 16). Esta diferencia en la identificación de coinfecciones tuvo como consecuencia la baja sensibilidad en la detección de segundo virus: HAdV (30%) y HEV (42%).

Es importante resaltar que el análisis de muestras clínicas nos permitió complementar la validación con la detección de 6 especies adicionales de virus (Adenovirus humano F [HAdV-F], Adenovirus humano A [HAdV-A], Parechovirus humano [HPeV], Enterovirus humano B [HEV-B], Enterovirus humano C [HEV-C] y Torque teno virus [TTV]) de los que no se contaba con una cepa de referencia.

### **Análisis de coinfecciones**

Las discrepancias en número de coinfecciones detectadas entre microarreglo y PCR en las muestras clínicas y la consecuente baja sensibilidad en la detección de HAdV y HEV, nos condujo a realizar un análisis más detallado de éstas muestras. Se sabe por estudios previos que, durante la etapa aguda de la infección, rotavirus puede producir grandes cantidades de progenie viral. Debido a esto, decidimos analizar por PCR en tiempo real las muestras con coinfección que presentaron discrepancias en la identificación de los virus entre PCR y microarreglo. Los virus analizados fueron RV-A, HAdV, NV, HAstV y HEV.

Se observó que en 7 de las 8 muestras con la combinación RV-A/HAdV detectada mediante PCR, la cantidad de rotavirus era superior a la cantidad de adenovirus (Tabla 3). No fue sorprendente por lo tanto, que en dichas muestras el microarreglo sólo detectó rotavirus. Una situación similar sucedió con las coinfecciones HAstV/HEV, NV/RV-A y NV/HEV/HAdV donde el virus presente en mayor cantidad fue el único detectado por microarreglo. Estos resultados nos indicaban que al existir una diferencia pronunciada en la cantidad de los virus coinfectantes, el microarreglo identificaría sólo al de mayor presencia. Sin embargo, en la combinación RV-A/HEV observamos que a pesar de que enterovirus estaba en mayor cantidad el microarreglo identificó RV-A. Esto pudo deberse a la cantidad de sondas disponibles para cada virus, 42 para rotavirus y 8 para enterovirus.

**Tabla 3.** Cuantificación de ácidos nucleicos virales en muestras con coinfección

RT-PCR <sup>a</sup>	Microarreglo <sup>b</sup>	RV-A <sup>c</sup>	HAdV	HEV	NV	HAstV
RV-A <sup>c</sup>	RV-A	21.9 <sup>f</sup>				
HAdV	HAdV		14.7			
HEV	HEV			23.8		
<sup>d</sup> NV	NV				19.6	
HAstV	HAstV					14.8
RV-A/HAdV	RV-A	<b>20.5<sup>g</sup></b>	37.6			
RV-A/HAdV	RV-A	<b>22.5</b>	28.4			
RV-A/HAdV	RV-A	<b>28.2</b>	41.3			
RV-A/HAdV	RV-A	<b>28.6</b>	44.5			
RV-A/HAdV	RV-A	<b>29.1</b>	43.8			
RV-A/HAdV	RV-A	<b>29.2</b>	43.4			
RV-A/HAdV	RV-A	<b>30.4</b>	30.6			
RV-A/HEV	RV-A	29.2		<b>25.4</b>		
RV-A/HEV	RV-A	29.2		<b>27.3</b>		
RV-A/HEV	RV-A	29.6		<b>28.5</b>		
RV-A/HEV	RV-A	30.8		<b>27.8</b>		
RV-A/HEV	HEV	38.4		<b>28</b>		
RV-A/NV	NV	30.1			<b>23.6</b>	
HAstV/HEV	HAstV			28		<b>23.2</b>
NV/HEV/HAdV	NV		34.1	28.4	<b>20.7</b>	
NTC <sup>h</sup>		36.4	44.5	33.7	33.7	29.9

<sup>a</sup> virus identificado por RT-PCR

<sup>b</sup> virus identificado por microarreglo

<sup>c</sup> virus determinado por RT-PCR en tiempo real, RV-A (rotavirus A), HAdV (adenovirus humano), HEV (enterovirus humano), NV (virus Norwalk), HAstV (astrovirus humano)

<sup>d</sup> NV se detecta a nivel género como calicivirus

<sup>e</sup> Muestras con infección sencilla se usaron como control

<sup>f</sup> Valores de Ct obtenidos por RT-PCR en tiempo real

<sup>g</sup> el valor más bajo de Ct para cada muestra se indica en negritas

<sup>h</sup> NTC control sin templado

## Discusión

Las infecciones del tracto gastrointestinal son un importante problema de salud tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. El conocimiento de los agentes que infectan el tracto gastrointestinal contribuye a mejorar el manejo de las enfermedades que se pueden derivar de una infección, desde conocer los datos epidemiológicos hasta la realización de programas de manejo y/o prevención de enfermedades.

Uno de los principales problemas en la detección de virus es la cantidad de posibles agentes presentes en las muestras clínicas versus la cantidad de agentes que permite evaluar cada prueba realizada, que generalmente es individual. La detección rutinaria de patógenos virales frecuentemente deja 30-50% de los casos sin un agente identificado [16], ya que por lo general no se busca la presencia de virus considerados secundarios o “raros”. Por otra parte, en años recientes se han identificado nuevos virus en muestras intestinales [80,94,120,121] de los que no se ha establecido su importancia en la patología de enfermedades diarreicas, lo que incentiva su estudio. Por lo tanto, para reunir información sobre la diversidad y prevalencia de los virus encontrados en tracto gastrointestinal se requiere de las herramientas de detección adecuadas. En este trabajo se desarrolló un microarreglo para detección de virus asociados al tracto gastrointestinal que permite en teoría la detección en paralelo de más de 100 virus que se han identificado en el tracto gastrointestinal de vertebrados.

Mediante la revisión de literatura científica donde se reportara la presencia o asociación de un virus al tracto gastrointestinal obtuvimos una lista de 128 especies de virus. Se incluyeron virus provenientes de todo tipo de huésped vertebrado y asociados o no a patogénesis. Esta amplitud permite usar el microarreglo para monitoreo de transmisión zoonótica de virus, y es útil en estudios de medicina veterinaria.

Las secuencias disponibles de todos estos virus fueron recolectadas de la base de datos del NCBI. Se obtuvieron >300,000 secuencias de virus de interés. Sin embargo, observamos que sólo unos pocos virus constituían más de la mitad de las secuencias disponibles. Aunque era esperado encontrar diferencias en la abundancia de secuencias, debido a la importancia en salud de ciertos virus y/o su uso como modelo experimental, estas cifras muestran el gran sesgo que existe en la generación y disponibilidad de secuencias, que a su vez puede reflejar la escasez de conocimiento sobre la variabilidad de ciertas especies virales. El acceso y uso de las nuevas tecnologías, como secuenciación

de nueva generación, ha tenido como consecuencia que la cantidad y disponibilidad de secuencias de virus en las bases de datos se haya duplicado desde que se usó para el diseño de sondas (>800,000 secuencias), hasta el momento de redacción de este texto (>1.6 millones de secuencias). Aunque la disponibilidad de secuencias sigue siendo desproporcionalmente sesgada, éste aumento puede ser importante tanto para verificar el desempeño de las sondas que se seleccionaron como para la obtención o actualización de nuevas sondas.

La detección por microarreglo esta basada en la hibridación del material genético del patógeno con una sonda fijada a un soporte. Esta característica es de gran utilidad para detectar virus que son fastidiosos o no cultivables. Existen diferentes modalidades de microarreglos que varían en sus características dependiendo del nivel de detección para el que están diseñados. Las sondas, el procesamiento de muestras y el análisis de datos son características que se modifican para las necesidades del estudio. Los microarreglos de detección mediante re-secuenciación permiten la identificación de mutaciones en la secuencia del agente analizado, pero requieren de una gran cantidad de sondas para un solo agente [83,122], lo que puede aumentar el costo de producción y la complejidad del análisis de datos. Los microarreglos de detección mediante subtificación son usados en estudios epidemiológicos y utilizan generalmente menos sondas y de longitud corta (~20nt) pero se desarrollan principalmente para estudiar sólo una especie [57,68,75]. Por otra parte los microarreglos usados para descubrir nuevos virus requieren de una gran cantidad de sondas con poca especificidad y el análisis de datos se vuelve complejo [123].

La mayoría de los microarreglos reportados para detección de los principales virus entéricos humanos lo hacen mediante la subtificación del virus [57,58,67,68,75–77,124–127]. Esto implica que comparten características en diseño como: detección de un solo agente, usan sondas cortas (~20 nt) y la muestra se amplifica mediante PCR dirigido al virus de interés.

En nuestro trabajo buscamos identificar una gran cantidad de especies de virus. Las sondas que utilizamos para reconocimiento especie-específico son de 70 nucleótidos de longitud (70mero) y provienen de la fragmentación de genomas representativos de cada virus. Entre las ventajas de usar 70meros se ha reportado que producen más señal en comparación con sondas de longitudes más cortas (20-30nt) o más largas (100 nt o amplicones de PCR) [114,128,129]. Las sondas más largas son capaces de hibridar con secuencias que presentan cierto grado de variabilidad y pueden presentar mejor sensibilidad que sondas más pequeñas [116,130].

Para determinar los criterios de selección óptimos para nuestro proyecto, se realizaron diversas pruebas. El análisis de la hibridación de 70meros con secuencias de diferente grado de identidad (desde 0 a 20 mismatches) nos permitió establecer el alcance y rango de desempeño de los 70meros. Además, se determinó que el valor termodinámico de  $\Delta G$  representaba el mejor parámetro para evaluar el desempeño experimental de las sondas. En otros trabajos se ha sugerido que la  $\Delta G$  debe ser uno de los criterios primarios de selección [114,131].

Con estos resultados y el análisis descriptivo de las secuencias que nos interesaba detectar, se establecieron filtros (identidades y  $\Delta G$ ) que nos permitieron obtener el mejor rendimiento de las sondas manteniendo su especificidad a nivel de especie. Seleccionamos un límite de mínimo 60/70 identidades (85%) para definir el reconocimiento de una secuencia blanco y de máximo 50/70 identidades (70%) para las secuencias no-blanco que podrían hibridar (Fig. 1). Se ha reportado que un porcentaje de identidad mayor a 75% puede causar hibridación cruzada [114–117]. De la misma forma se definió un valor mínimo de  $\Delta G < -70\text{kcal/mol}$  para las secuencias blanco y máximo  $\Delta G > -40\text{kcal/mol}$  para secuencias no-blanco. La ventana establecida entre lo que se debe y lo que no se debe reconocer por identidad y por  $\Delta G$  nos proporciona un espacio de confianza para la detección específica [114,128].

Durante el análisis de los criterios de selección, también se evaluaron oligonucleótidos de otros tamaños (60 y 50meros). El uso de éstas longitudes de oligonucleótidos para detección especie-específica de virus también es factible. Inclusive se pueden usar ambas longitudes en un microarreglo para detectar niveles taxonómicos diferentes como género y especie (cuando los virus de interés presentan regiones conservadas a estos niveles), como lo han demostrado otros trabajos [132]. Sin embargo, debido a su menor tamaño y por lo tanto menor “soporte” de malos apareamientos, para usar 60meros o 50meros en nuestro proyecto se necesitaría una mayor cantidad de sondas para poder detectar las variantes existentes en una especie. Aumentar la cantidad de sondas en el arreglo no era una limitante ya que la tecnología usada para la producción de microarreglos en este trabajo permitía imprimir arreglos de hasta 250,00 puntos (ahora es 1 millón; [www.agilent.com](http://www.agilent.com)).

La validación del microarreglo fue realizada con 10 especies de virus de referencia. Aunque esta cantidad representa un pequeño porcentaje (8%) del rango total de detección teórica, las cepas usadas incluyen los principales virus gastrointestinales humanos y además algunos virus de origen no-humano. Adicionalmente, mediante el uso de muestras clínicas se logró identificar otras especies de virus de las que no contábamos con una cepa de referencia (HAdV-F y HAdV-A, HBoV, HPeV, HEVB, HEVC,

TTV). Este resultado refuerza la probabilidad de que las sondas para los demás virus, que no pudimos validar, sean capaces de identificar su blanco. Sin embargo, es recomendable que la validación se lleve a cabo con una referencia o una muestra bien caracterizada. Así mismo, la correcta detección de 4 cepas de rotavirus de diferente origen sugiere que el microarreglo puede reconocer diferentes variaciones de un mismo virus. Este resultado se complementa con los ensayos de hibridación *in silico* de las sondas de rotavirus, donde observamos que es muy probable que se puedan detectar diferentes cepas conocidas de rotavirus A.

Además de validar las sondas específicas identificamos algunas sondas con comportamiento no-específico. No es clara la razón por la cual este grupo de sondas muestra reactividad no-específica, ya que no mostró una sola característica en común, sino características particulares entre las que se determinó el alto contenido de GC y la presencia de regiones de baja complejidad. Otros motivos sobre mal desempeño que se han identificado y analizado en el uso de sondas “largas” son la presencia de estructuras secundarias y la accesibilidad de hibridación de la sonda [133,134]. Sin embargo, las fallas derivadas se reflejan como señal no-específica cuando la sonda es el elemento que contiene el fluoróforo o cuando se usan técnicas enzimáticas para la obtención de señal [76,125], características que no presenta nuestra plataforma. En nuestro caso, se esperaba que los filtros establecidos en la estrategia de selección eliminaran este tipo de sondas, ya que producirían alineamientos con alta probabilidad de ser no-específicos (e-value) o con probable hibridación experimental ( $\Delta G$ ) no específica. Otra razón por la que no se limitó el contenido de GC en el proceso de selección, es el porcentaje de GC tan variable entre los virus de interés (28-71%). Sin embargo, los resultados sugieren que es necesario establecer límites a estos dos parámetros. El límite al contenido de GC se puede aplicar desde la fragmentación de secuencias mientras que la presencia de baja complejidad se puede filtrar en los parámetros del BLAST. Las sondas con reactividad no específica fueron descartadas de análisis posteriores.

Una característica importante a determinar en una prueba es el límite de detección, que en el microarreglo fue  $1 \times 10^{-3}$  partículas. Obtuvimos resultados similares con virus de diferente tipo de genoma, astrovirus humano (ssRNA+), adenovirus humano C (dsDNA) y rotavirus A (dsRNA). Esto nos indica que los diferentes tipos de genoma no son factores que limiten la detección, al menos individualmente. Estos resultados correlacionan con el límite de detección reportado en otros microarreglos independientemente del tipo de genoma del virus estudiado [81,124,126]. Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los microarreglos de detección usan la PCR para amplificar la



muestra. Por lo tanto, el límite de detección de los microarreglos es similar al de la PCR y generalmente es mejor que los métodos de diagnóstico clásico [82,135].

Posterior a la validación del microarreglo con virus de referencia se analizó un pequeño grupo (n=76) de muestras clínicas. El porcentaje de muestras positivas obtenido fue alto (92% de muestras identificadas) en comparación con estudios donde se analizan varios virus usando métodos alternativos como PCR monoplex (<35%) [136,137], PCR multiplex (23-57%) [20,22,24], e inclusive PCR multiplex de virus y bacterias (57%) [138]. Aunque no hubo un proceso de pre-selección de las muestras, el alto porcentaje de muestras positivas puede estar influenciado por la temporada de recolección de las muestras (invierno), la cual es reconocida por la alta prevalencia de gastroenteritis viral en niños [17]. Es importante mencionar que no podemos descartar que alguna muestra posea algún otro agente infeccioso. Aparte de la metodología, otros factores que pueden influir en el porcentaje de detección son los grupos de edad estudiados y las fluctuaciones estacionales.

A pesar del pequeño grupo de muestras analizado, la predominancia de rotavirus como el principal agente correlaciona con los reportes de otros países [139] y de México [140,141]. También correlacionan en el orden de prevalencia los calicivirus y astrovirus humanos [66,73,142–144]. La prevalencia de otros virus como los adenovirus humanos no es clara en México debido a la escasez de información [144].

Es de interés resaltar que se identificaron algunas muestras con virus que comúnmente no se buscan, principalmente por ser considerados virus secundarios: HPeV que ha sido asociado previamente con gastroenteritis [84] y dos virus cuya significancia patogénica gastroentérica no es clara: HBoV y TTV [145,146]. También encontramos Adenovirus humano A, una especie de adenovirus que es poco frecuente encontrar en tracto gastrointestinal [79,80] ya que adenovirus humano F es la especie comúnmente encontrada. Sobre estos virus se tiene poca información epidemiológica y su presencia en México es un incentivo para estudiarlos con mayor detalle.

Para corroborar y comparar los resultados obtenidos por el microarreglo, analizamos en muestras clínicas la presencia de 5 principales especies virales asociadas a gastroenteritis (RV-A, HAdV, CV, HAsV, HEV) mediante RT-PCR diagnóstico con el set de oligonucleótidos previamente descritos. Usando estas pruebas pudimos evaluar el desempeño del microarreglo a nivel individual en 5 grupos de virus. Observamos que la especificidad del microarreglo es buena (85-100%) entre los virus 5 evaluados pero, mientras que el microarreglo tuvo una alta sensibilidad en la detección de 3 virus (RV-

A, CV y HAstV), presentó una baja sensibilidad en la detección de un par de virus: HAdV 30% y HEV 42%. Una posible razón es que las muestras clínicas donde se detectaron HAdV y HEV contenían además otro virus, es decir presentaban coinfecciones. En otros trabajos de microarreglos la especificidad reportada es similar (>90%) pero la sensibilidad es superior (>83%) [57,75,81,126,147]. La diferencia en la sensibilidad con otros microarreglos puede deberse a que están enfocados a detectar un solo agente y para esto utilizan amplificación dirigida, mientras que nosotros utilizamos amplificación al azar. Por lo tanto, al amplificar directamente un virus, dejan de lado la posibilidad de detectar coinfecciones.

En el conjunto de los resultados del microarreglo y la PCR de las muestras clínicas, se observa que de las 11 especies diferentes de virus identificadas, la mayoría (9 especies) estuvieron presentes en por lo menos 1 coinfección. Los dos virus que no tuvieron parte en una coinfección fueron adenovirus humano A y enterovirus humano C, probablemente porque sólo 1 muestra fue positiva para cada uno de estos virus. Ésta es una observación muy interesante ya que nos sugiere que hay una gran circulación de diferentes virus, posiblemente dando lugar a más infecciones mixtas de lo esperado.

Las coinfecciones que encontramos en mayor número son RV/HAdV (n=8) y RV/HEV (n=5). Previamente se ha reportado que la coinfección RV/NV es la más común [148] aunque también se ha registrado que es muy común encontrar HAdV en coinfección con RV [148,149]. Los datos dependen en parte de la cantidad y tipo de virus buscados en cada estudio, que generalmente se limita al grupo principal de virus. Con el aumento en el número de virus conocidos, en años recientes esta estrategia de búsqueda ha ido cambiando. En el caso de los virus respiratorios se ha comentado inclusive que es difícil publicar un estudio epidemiológico sin realizar la búsqueda de todos los virus conocidos al momento del estudio [145]. En este sentido el microarreglo como herramienta de detección presenta la ventaja de evaluar en un ensayo muchos virus que pueden ser de diferente grado de interés, tanto virus principales como virus secundarios o raros.

Realizar la búsqueda de virus secundarios o raros y contar con las herramientas para su detección es importante porque: 1) No se sabe si en una coinfección la presencia de otro virus afecta la patogénesis del virus típico; 2) Los programas de vacunación contra Rotavirus que es considerado el principal agente, podrían dar paso a la prevalencia de algún otro virus; y 3) De igual forma, la efectividad de los programas de vacunación podría verse afectada (disminución de efectividad) por la presencia de otro virus.

El punto 2 es una excelente oportunidad para implementar el uso de un microarreglo de amplio espectro, para identificar los virus que se están introduciendo o emergiendo después de combatir rotavirus [60]. Respecto al primer punto, se ha reportado que la presencia de coinfecciones virus-bacteria esta relacionado a la severidad de la enfermedad [150], sin embargo las coinfecciones virus-virus gastrointestinales requieren de mayor estudio [148].

En las combinaciones de virus detectadas por microarreglo es interesante resaltar que todas contienen TTV, un virus de alta prevalencia en adultos y que no se ha determinado como patogénico, pero se ha visto que su título puede aumentar en presencia de algunas enfermedades [146]. En general, el TTV fue detectado en hibridaciones con poca señal que podría relacionarse a la cantidad del material genético en la muestra. Dos virus (HPeV y SV) reconocidos como patogénicos, sólo se encontraron en coinfecciones, aunque esto es probablemente resultado del pequeño grupo de muestras analizadas (76 muestras clínicas) y bajo nivel de muestras positivas para estos virus (2 y 1 respectivamente). SV forma parte de la familia *Caliciviridae* donde el agente principal es el virus Norwalk.

Como se mencionó previamente, se encontraron algunas diferencias en la identificación de virus presentes en coinfecciones. A través de los resultados de PCR cuantitativo de los virus involucrados en las coinfecciones observamos que, en la mayoría de los casos el virus detectado por microarreglo correspondía al de mayor presencia en la muestra, posiblemente 'opacando' segundo virus.

Estos resultados se pueden analizar desde dos perspectivas: la muestra y la metodología. Debido a que la muestra representa un punto único en el desarrollo de la infección, no es posible establecer en qué etapa de la infección se encuentra cada virus o cuál infecto primero. Por lo tanto con las muestras clínicas usadas en este trabajo sólo podemos conocer la presencia (por microarreglo y PCR) y la cantidad de virus (por qPCR). Para conocer detalladamente el desempeño del microarreglo en muestras con coinfección tendríamos que hacer combinaciones graduales de dos virus con título conocido.

Desde punto de vista metodológico, la dificultad para detectar coinfecciones reside principalmente en la etapa de amplificación de la muestra. Para detectar una gran variedad de virus utilizamos amplificación aleatoria a diferencia de otros trabajos que utilizan amplificación dirigida. Entonces cada fragmento presente en la muestra tiene en teoría la misma probabilidad de ser amplificado. Pero, si la cantidad de material genético viral es baja en comparación con el material contaminante (p ej del huésped) la sensibilidad puede disminuir, como se observó en la disminución del límite de detección al agregar un exceso de DNA celular. Una situación similar puede ocurrir si la muestra contiene dos o más

virus en cantidades desproporcionadas. El virus más abundante puede acaparar los reactivos disminuyendo la amplificación del segundo virus. Si la diferencia en cantidades es excesiva, la amplificación del segundo virus puede ser nula. En otros estudios se ha observado que la amplificación con cebadores semialeatorios (porción aleatoria + porción conocida) puede provocar una amplificación preferencial de ciertas regiones del genoma [151]. Para resolver este problema, en el trabajo de Lee y colaboradores [152], se diseñaron cebadores semialeatorios con base en las secuencias que deben ser amplificadas. En nuestro trabajo para detectar cada virus se seleccionaron sondas de más de una región del genoma, por lo tanto si existiera amplificación preferencial probablemente resultaría en la detección de sondas sólo de una región. Nuestros resultados sugieren que no hay amplificación preferencial con nuestro protocolo, ya que en las hibridaciones con rotavirus A obtenemos señal positiva en sondas que representan 3 diferentes segmentos del genoma.

Existen otras herramientas que se han desarrollado o están en proceso de desarrollo para su adaptación al diagnóstico de virus. Por un lado en la detección de ácidos nucleicos están la PCR multiplex, la PCR digital [153] y la secuenciación de última generación (NGS) y por otra parte la espectrometría de masas [154] en la detección por proteómica. De éstas herramientas sólo se discutirán la PCR múltiple y la NGS.

La PCR múltiple se ha desarrollado para buscar distintos virus de interés en un mismo ensayo de amplificación usando varios pares de cebadores, sin embargo la cantidad de cebadores a combinar en una reacción, es limitada. Para aumentar el número de organismos analizados, se pueden organizar en 2 o más juegos de cebadores, de forma que no obstaculicen o afecten la amplificación. De esta forma se han desarrollado kits comerciales que evalúan hasta 17 patógenos, pero de éstos sólo 4 o 5 son agentes virales por lo que varios virus son descartados [138]. En un enfoque interesante, Svraka (2010) [19] y colaboradores desarrollan un ensayo multiplex para 6 virus, repartidos en 3 grupos de cebadores. En este trabajo se propone el uso del 1<sup>er</sup> grupo de cebadores para análisis rutinario; se incluye el 2<sup>do</sup> grupo cuando el análisis es con fines epidemiológico y se incorpora el 3<sup>er</sup> grupo cuando el análisis está destinado para los virus “raros”. De esta forma se optimiza el uso de los reactivos dependiendo del objetivo buscado. La desventaja de los ensayos PCR multiplex es la pérdida de sensibilidad en comparación al PCR monoplex [20,22].

Por su parte, el uso de secuenciación de última generación (NGS), permite obtener un panorama muy detallado del material genético contenido en la muestra. De esta forma se han encontrado virus en

nuevos huéspedes, nuevas variantes de virus y hasta especies virales nuevas [92,94,121]. La posibilidad de obtener secuencias de virus no buscados o virus no conocidos ha promovido que la NGS se piense usar como prueba de diagnóstico. Pero existen tres inconvenientes, el costo, el análisis de los datos y la determinación de positivos. En cuanto a los costos, se espera que disminuyan lo suficiente conforme la tecnología de producción mejore. Por otra parte, debido a la cantidad y complejidad de los resultados obtenidos, el análisis además de ser complejo, requiere de poder computacional a veces no tan accesible, por lo tanto algunos grupos han buscado automatizar y reducir el tiempo de análisis [155]. Por último, la sensibilidad en la obtención de información es tanta que es difícil establecer la interpretación de presencia o causalidad cuando se obtienen 1 o 2 'lecturas' de un virus [156]. Por el momento la NGS representa una alternativa en aquellos casos donde se han descartado las opciones disponibles y/o se requiere de un mayor conocimiento del contenido de la muestra.

La amplitud del microarreglo desarrollado en este trabajo permite en teoría detectar más de 100 virus. El amplio espectro de este microarreglo no es estrictamente fijo. Una ventaja de los microarreglos es que la plataforma permite tanto expandirse como reducirse dependiendo de los objetivos del estudio. Si el interés se enfoca en un espectro pequeño de virus (e.g. 20 especies), se puede obtener el subset de sondas correspondiente y producir arreglos más pequeños. Esto permitiría incluir una mayor cantidad de arreglos en una laminilla y por lo tanto analizar más muestras en un solo ensayo. Por otra parte una modificación que se puede hacer para aumentar el espectro de detección es incluir sondas para detectar bacterias o parásitos, tomando en cuenta que la estrategia de obtención de sondas requiere adaptaciones para las características de cada grupo de patógenos [157–159].

El acercamiento entre el laboratorio de investigación y el laboratorio clínico puede ser de gran utilidad para enfocar la adaptación del microarreglo a las necesidades de un estudio. Aunque los microarreglos para detección de virus han sido útiles en casos de infecciones graves como las del sistema nervioso central [160] donde además la cantidad de muestra disponible es muy limitada, se ha sugerido que el uso de los microarreglos en los laboratorios de diagnóstico puede ser a tres niveles, (1) después de las pruebas de detección rápida de antígenos y los ensayos PCR monoplex, especialmente en casos particulares de infecciones severas que requieren hospitalización; (2) después de la primer prueba rutinaria como método de confirmación y ampliación de la información; y (3) como parte de los estudios epidemiológicos que llevan a cabo los centros de referencia [161].

El desarrollo de una herramienta de diagnóstico está sujeto a mejoras y en esta etapa del proyecto nuestro enfoque de detección funcionó y aunque experimentamos algunas dificultades, existen propuestas para resolverlas. La realización de este microarreglo no solo implica la adaptación de tecnología para uso experimental y/o diagnóstico, sino que además nos presentó evidencia de la presencia de otras especies de virus en circulación en México (HPeV, HBoV, TTV) de los cuales no se tienen datos y que presentan oportunidades para un mejor estudio y conocimiento de las gastroenteritis virales en México.

## Conclusión

En este trabajo se realizó el desarrollo y validación de un microarreglo para detección de virus asociados al tracto gastrointestinal. Al definir las especies de virus de interés se encontró una gran diversidad de virus asociados al tracto gastrointestinal. Sin embargo, al generar las bases de datos de secuencias, se observó que existe una gran diferencia entre las secuencias disponibles para cada virus. La estrategia de selección de sondas basada en parámetros termodinámicos permitió establecer los filtros adecuados para el diseño de sondas especie-específicas de 70 nucleótidos, de esta forma se obtuvieron 1256 sondas para detección de 128 especies de virus de interés. Posterior a la producción de los microarreglos, se logró validar el correcto funcionamiento de la plataforma mediante el análisis de 10 virus de referencia y 6 virus más en muestras clínicas. Se estableció el límite de detección del microarreglo en  $10^3$  partículas virales y no se vio afectado por el tipo de genoma que posea el virus analizado, y la adición de un exceso de material genético celular provocó la disminución del límite en un logaritmo. Se logró la correcta detección de infecciones sencillas en muestras clínicas de niños que presentaban gastroenteritis, mientras que se encontraron dificultades en la detección de coinfecciones. La resolución de las limitantes en la detección de coinfecciones requiere de otros análisis. Cada etapa de desarrollo del microarreglo puede ser ajustada o trasladada a otras aplicaciones, por ejemplo la estrategia de selección puede ser aplicada a virus asociados a otros padecimientos o bien las sondas obtenidas pueden utilizarse en otro tipo de plataformas de detección en paralelo que permiten mayor automatización. Asimismo, puede realizarse el diseño de sondas para otros grupos de patógenos involucrados en gastroenteritis, como las bacterias. La aplicación del microarreglo de detección de virus será de gran utilidad para analizar y evaluar la presencia y dinámica de los agentes virales asociados a gastroenteritis a nivel poblacional.

## Perspectivas

- Mantenimiento de base de datos. Obtener las nuevas secuencias de virus de la base de datos pública y curar nuestra base de secuencias para tener una mejor representación de la variabilidad de virus.
- Actualización de sondas. Como consecuencia del mantenimiento de la base de secuencias de virus, se debe evaluar el desempeño de las sondas ya seleccionadas, para determinar si es necesaria su sustitución o modificación.
- Selección de sondas a otros niveles taxonómicos. Dado que la estrategia de selección de sondas resulto exitosa, se podrían realizar los ajustes necesarios para diseñar sondas que reconozcan secuencias en otro nivel diferente al de especie, como géneros (nivel superior) o subtipos (nivel inferior).
- Evaluación de niveles de detección en coinfecciones. Tomando en cuenta los factores de una coinfección como: el número de virus involucrados, características del genoma y la abundancia de cada agente en la muestra, se pueden planificar diferentes ensayos para determinar el comportamiento y los límites de detección en coinfecciones.
- Analizar muestras de diferente origen. Hasta el momento el microarreglo solo ha sido probado con muestras clínicas de niños menores de 5 años que presentaban gastroenteritis en periodo invernal. Podrían usarse muestras de otro grupo de edad, otras estaciones del año o de otras especies animales.



## Referencias

1. Matthews Z. World health report 2005: make every mother and child count. World Health Organization. 2005. 409-11 p.
2. Parashar UD, Bresee JS, Glass RI. The global burden of diarrhoeal disease in children. *Bull World Health Organ.* 2003;81(4):236.
3. World Health Organization. The Global Burden of Disease: 2004 update. Update. Geneva; 2008.
4. Salud S de. SINAVE/DGE/SALUD/Panorama Epidemiológico y Estadístico de la Mortalidad en México 2010. *Dir Gen Epidemiol.* 2012;15-151.
5. Foster DM, Smith GW. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* Elsevier Ltd; 2009;25(1):13-36.
6. Reuter G, Pankovics P, Delwart E, Boros Á. Identification of a novel astrovirus in domestic sheep in Hungary. *Arch Virol.* 2012;157(March 2009):323-7.
7. Koo BS, Lee HR, Jeon EO, Han MS, Min KC, Lee SB, et al. Molecular survey of enteric viruses in commercial chicken farms in Korea with a history of enteritis. *Poult Sci.* 2013;92:2876-85.
8. Tse H, Chan WM, Tsoi HW, Fan RYY, Lau CCY, Lau SKP, et al. Rediscovery and genomic characterization of bovine astroviruses. *J Gen Virol.* 2011;92:1888-98.
9. Shan T, Li L, Simmonds P, Wang C, Moeser A, Delwart E. The Fecal Virome of Pigs on a High-Density Farm. *J Virol.* 2011;85(22):11697-708.
10. Li L, Pesavento P a., Shan T, Leutenegger CM, Wang C, Delwart E. Viruses in diarrhoeic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses. *J Gen Virol.* 2011;92:2534-41.
11. Smits SL, Van Leeuwen M, Kuiken T, Hammer AS, Simon JH, Osterhaus ADME. Identification and characterization of deer astroviruses. *J Gen Virol.* 2010;91:2719-22.
12. Bodewes R, van der Giessen J, Haagmans BL, Osterhaus ADME, Smits SL. Identification of multiple novel viruses, including a parvovirus and a hepevirus, in feces of red foxes. *J Virol.* 2013;87:7758-64.
13. Phan TG, Kapusinszky B, Wang C, Rose RK, Lipton HL, Delwart EL. The fecal viral flora of wild rodents. *PLoS Pathog.* 2011;7(9).
14. Li L, Shan T, Wang C, Côté C, Kolman J, Onions D, et al. The fecal viral flora of california sea lions. *J Virol.* 2011;85(19):9909-17.
15. Wang Y, Tu X, Humphrey C, McClure H, Jiang X, Qin C, et al. Detection of viral agents in fecal specimens of monkeys with diarrhea. *J Med Primatol.* 2007;36:101-7.
16. Simpson VR. Wild animals as reservoirs of infectious diseases in the UK. *Vet J.* 2002;163:128-46.
17. Dennehy PH. Viral gastroenteritis in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(1):63-4.

18. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR : Optimization and Application in Diagnostic Virology Multiplex PCR : Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(4):559–70.
19. Svraka S, Van Der Veer B, Duizer E, Dekkers J, Koopmans M, Vennema H. Novel approach for detection of enteric viruses to enable syndrome surveillance of acute viral gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1674–9.
20. Van Maarseveen NM, Wessels E, de Brouwer CS, Vossen ACTM, Claas ECJ. Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of Adenovirus group F, Astrovirus, Rotavirus group A, Norovirus genogroups I and II, and Sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays. *J Clin Virol.* 2010;49:205–10.
21. Pham NTK, Trinh QD, Chan-It W, Khamrin P, Shimizu H, Okitsu S, et al. A novel RT-multiplex PCR for detection of Aichi virus, human parechovirus, enteroviruses, and human bocavirus among infants and children with acute gastroenteritis. *J Virol Methods.* Elsevier B.V.; 2010;169(1):193–7.
22. Liu J, Kibiki G, Maro V, Maro A, Kumburu H, Swai N, et al. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. *J Clin Virol.* Elsevier B.V.; 2011;50(4):308–13.
23. Feeney SA, Armstrong VJ, Mitchell SJ, Crawford L, Mccaughey C, Coyle P V. Development and clinical validation of multiplex TaqMan assays for rapid diagnosis of viral gastroenteritis. *J Med Virol.* 2011;83:1650–6.
24. Khamrin P, Okame M, Thongprachum A, Nantachit N, Nishimura S, Okitsu S, et al. A single-tube multiplex PCR for rapid detection in feces of 10 viruses causing diarrhea. *J Virol Methods.* Elsevier B.V.; 2011;173(2):390–3.
25. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science.* 1995. p. 467–70.
26. Hacia JG. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nature Genetics.* 1999. p. 42–7.
27. Zeller KI, Haggerty TJ, Barrett JF, Guo Q, Wonsey DR, Dang C V. Characterization of Nucleophosmin (B23) as a Myc Target by Scanning Chromatin Immunoprecipitation. *J Biol Chem.* 2001;276:48285–91.
28. Johnson JM, Castle J, Garrett-Engle P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, et al. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science.* 2003;302:2141–4.
29. Chou C-C, Chen C-H, Lee T-T, Peck K. Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:e99.
30. Dalma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, Miyada CG. [1] The Affymetrix GeneChip Platform: An Overview. *Methods Enzymol.* 2006;410(06):3–28.
31. Kreil DP, Russell RR, Russell S. Microarray oligonucleotide probes. *Methods Enzymol.* 2006;410:73–98.
32. Hessner MJ, Meyer L, Tackes J, Muheisen S, Wang X. Immobilized probe and glass surface chemistry as variables in microarray fabrication. *BMC Genomics.* 2004;5:53.

33. Halstead FD, Lee A V., Couto-Parada X, Polley SD, Ling C, Jenkins C, et al. Universal extraction method for gastrointestinal pathogens. *J Med Microbiol.* 2013;62:1535–9.
34. Oikarinen S, Tauriainen S, Viskari H, Simell O, Knip M, Virtanen S, et al. PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. *J Clin Virol.* 2009;44:211–4.
35. Brownstein M. [11] Sample Labeling: An Overview. *Methods Enzymol.* 2006;410(06):222–37.
36. Giller G, Tasara T, Angerer B, Mühlegger K, Amacker M, Winter H. Incorporation of reporter molecule-labeled nucleotides by DNA polymerases. I. Chemical synthesis of various reporter group-labeled 2'-deoxyribonucleoside-5'-triphosphates. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(10):2630–5.
37. Anderson JP, Angerer B, Loeb L a. Incorporation of reporter-labeled nucleotides by DNA polymerases. *Biotechniques.* 2005;38(2):257–64.
38. Vora GJ, Vora GJ, Meador CE, Meador CE, Stenger D a, Stenger D a, et al. Nucleic Acid Amplification Strategies for DNA Microarray-Based Pathogen Detection. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(5):3047–54.
39. Neal SJ, Westwood JT. [10] Optimizing Experiment and Analysis Parameters for Spotted Microarrays. *Methods Enzymol.* 2006;410(06):203–21.
40. Koltai H, Weingarten-Baror C. Specificity of DNA microarray hybridization: Characterization, effectors and approaches for data correction. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(7):2395–405.
41. Fuchs J, Fiche JB, Buhot A, Calemczuk R, Livache T. Salt concentration effects on equilibrium melting curves from DNA microarrays. *Biophys J.* 2010;99(September):1886–95.
42. Fuchs J, Dell'Atti D, Buhot A, Calemczuk R, Mascini M, Livache T. Effects of formamide on the thermal stability of DNA duplexes on biochips. *Anal Biochem. Elsevier Inc.;* 2010;397(1):132–4.
43. Timlin J a. [6] Scanning Microarrays: Current Methods and Future Directions. *Methods Enzymol.* 2006;411(06):79–98.
44. Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phiX 174 DNA: The effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res.* 1979;6(6):3543–58.
45. Wetmur JG. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1991;26(788840062):227–59.
46. SantaLucia J, Allawi HT, Seneviratne PA. Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability. *Biochemistry.* 1996;35:3555–62.
47. SantaLucia J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(February):1460–5.
48. Peyret N, Seneviratne PA, Allawi HT, SantaLucia J. Nearest-neighbor thermodynamics and NMR of DNA sequences with internal A-A, C-C, G-G, and T-T mismatches. *Biochemistry.* 1999;38:3468–77.
49. Allawi HT, Santalucia J. Thermodynamics of internal C · T mismatches in DNA. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(11):2694–701.

50. Allawi HT, SantaLucia J. Nearest-neighbor thermodynamics of internal A·C mismatches in DNA: Sequence dependence and pH effects. *Biochemistry*. 1998;37(98):9435–44.
51. Allawi HT, Santalucia J. Thermodynamics of internal C · T mismatches in DNA. *Biochemistry*. 1997;26(96):2694–701.
52. Allawi HT, SantaLucia J. Nearest neighbor thermodynamic parameters for internal G??A mismatches in DNA. *Biochemistry*. 1998;37(97):2170–9.
53. Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. In: R. Lamb, R. Krug DK, editor. *Fields Virology*. 6th ed. 2001. p. 1996.
54. Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol*. 2008;82(7):3204–19.
55. Matthijnssens J, Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol*. Elsevier B.V.; 2012;2(4):426–33.
56. Schwarz B-A, Bange R, Vahlenkamp TW, John R, Müller H. Detection and quantitation of group A rotaviruses by competitive and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 2002;105:277–85.
57. Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, Hoshino Y, Chumakov K, Kapikian a Z. Detection and Genotyping of Human Group A Rotaviruses by Oligonucleotide Microarray Hybridization. *J Clin Microbiol*. 2002;40(7):2398–407.
58. Honma S, Chizhikov V, Santos N, Tatsumi M, Timenetsky MDCST, Linhares AC, et al. Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], and P[14]) and VP7 (G1 to G6, G8 to G10, and G12) genes. *J Clin Microbiol*. 2007;45(8):2641–8.
59. Pérez-Vargas J, Isa P, López S, Arias CF. Rotavirus vaccine: Early introduction in Latin America - Risks and benefits. *Arch Med Res*. 2006;37:1–10.
60. Patel MM, Parashar UD, Santosham M, Richardson V. The rotavirus experience in Mexico: Discovery to control. *Clin Infect Dis*. 2013;56:548–51.
61. Méndez E, Arias CF. Astroviruses. 5th ed. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 2007. 3177 p.
62. Chu DKW, Poon LLM, Guan Y, Peiris JSM. Novel astroviruses in insectivorous bats. *J Virol*. 2008;82(June):9107–14.
63. Finkbeiner SR, Holtz LR, Jiang Y, Rajendran P, Franz CJ, Zhao G, et al. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *Virol J*. 2009;6:161.
64. Finkbeiner SR, Li Y, Ruone S, Conrardy C, Gregoricus N, Toney D, et al. Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. *J Virol*. 2009;83(20):10836–9.
65. Indik S, Valíček L, Smíd B, Dvoráková H, Rodák L. Isolation and partial characterization of a novel porcine astrovirus. *Vet Microbiol*. 2006;117:276–83.

66. Walter JE, Mitchell DK, Guerrero ML, Berke T, Matson DO, Monroe SS, et al. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico City. *J Infect Dis.* 2001;183:681–6.
67. Jääskeläinen AJ, Maunula L. Applicability of microarray technique for the detection of noro- and astroviruses. *J Virol Methods.* 2006;136:210–6.
68. Brown DW, Gunning KB, Henry DM, Awdeh ZL, Brinker JP, Tzipori S, et al. A DNA oligonucleotide microarray for detecting human astrovirus serotypes. *J Virol Methods.* 2008;147:86–92.
69. Green KY. *Caliciviridae: The noroviruses.* 5th ed. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 3177 p.
70. Glass RI, Parashar UD, Estes MK, New T, Oct B. *Norovirus Gastroenteritis Current Concepts.* Text. 2009;361:4–10.
71. Robilotti E, Deresinski S, Pinsky B a. *Norovirus.* *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(1):134–64.
72. Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. *Comprehensive Review of Human Sapoviruses.* *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(1):32–53.
73. Farkas T, Zhong WM, Jing Y, Huang PW, Espinosa SM, Martinez N, et al. Genetic diversity among sapoviruses. *Arch Virol.* 2004;149:1309–23.
74. Richardson C, Bargatze RF, Goodwin R, Mendelman PM. *Norovirus virus-like particle vaccines for the prevention of acute gastroenteritis.* *Expert Rev Vaccines.* 2013;12:155–67.
75. Vinjé J, Koopmans MPG. Simultaneous detection and genotyping of “Norwalk-like viruses” by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol.* 2000;38(7):2595–601.
76. Brinkman NE, Fout GS. Development and evaluation of a generic tag array to detect and genotype noroviruses in water. *J Virol Methods.* 2009;156:8–18.
77. Mattison K, Corneau N, Berg I, Bosch A, Duizer E, Gutiérrez-Aguirre I, et al. Development and validation of a microarray for the confirmation and typing of norovirus RT-PCR products. *J Virol Methods.* Elsevier B.V.; 2011;173(2):233–50.
78. Wold WSM, Marshall S, Horwitz. *Adenoviruses.* 5th ed. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 3177 p.
79. Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. *Viruses causing gastroenteritis.* *Clin Microbiol Infect.* 2003;9:247–62.
80. Jones MS, Harrach B, Ganac RD, Gozum MM a, Dela Cruz WP, Riedel B, et al. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol.* 2007;81(11):5978–84.
81. Lin B, Vora GJ, Thach D, Walter E, Metzgar D, Tibbetts C, et al. Use of oligonucleotide microarrays for rapid detection and serotyping of acute respiratory diseases-associated adenoviruses. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):3232–9.

82. López-Campos G, Coiras M, Sánchez-Merino JP, López-Huertas MR, Spiteri I, Martín-Sánchez F, et al. Oligonucleotide microarray design for detection and serotyping of human respiratory adenoviruses by using a virtual amplicon retrieval software. *J Virol Methods*. 2007;145:127–36.
83. Woo PCY, Lau SKP, Choi GKY, Fung HT, Shek KC, Miao J, et al. Resequencing microarray for detection of human adenoviruses in patients with conjunctivitis. *J Clin Virol*. 2010;47:282–5.
84. Baumgarte S, De Souza Luna LK, Grywna K, Panning M, Drexler JF, Karsten C, et al. Prevalence, types, and RNA concentrations of human parechoviruses, including a sixth parechovirus type, in stool samples from patients with acute enteritis. *J Clin Microbiol*. 2008;46(1):242–8.
85. Chhabra P, Payne DC, Szilagyi PG, Edwards KM, Staat MA, Shirley SH, et al. Etiology of viral gastroenteritis in children <5 years of age in the United States, 2008-2009. *J Infect Dis*. 2013;208:790–800.
86. Ramani S, Kang G. Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. *Curr Opin Infect Dis*. 2009;22:477–82.
87. Reuter G, Boros Á, Pankovics P. Kobuviruses - a comprehensive review. *Reviews in Medical Virology*. 2011. p. 32–41.
88. Grohmann GS, Glass RI, Pereira HG, Monroe SS, Hightower AW, Weber R, et al. Enteric Viruses and Diarrhea in HIV-Infected Patients. *New England Journal of Medicine*. 1993. p. 14–20.
89. Silva RC, Benati FJ, Pena GP a, Santos N. Molecular characterization of viruses associated with gastrointestinal infection in HIV-positive patients. *Brazilian J Infect Dis*. Elsevier; 2010;14(6):549–52.
90. Oude Munnink BB, Canuti M, Deijns M, de Vries M, Jebbink MF, Rebers S, et al. Unexplained diarrhoea in HIV-1 infected individuals. *BMC Infect Dis*. *BMC Infectious Diseases*; 2014;14(1):22.
91. Jones MS, Lukashov V V., Ganac RD, Schnurr DP. Discovery of a novel human picornavirus in a stool sample from a pediatric patient presenting with fever of unknown origin. *J Clin Microbiol*. 2007;45(7):2144–50.
92. Kapoor A, Victoria J, Simmonds P, Slikas E, Chieochansin T, Naeem A, et al. A highly prevalent and genetically diversified Picornaviridae genus in South Asian children. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(51):20482–7.
93. Drexler JF, Grywna K, Stöcker A, Almeida PS, Ribeiro TCM, Eschbach-Bludau M, et al. Novel human parechovirus from Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(2):310–3.
94. Li L, Victoria J, Kapoor A, Blinkova O, Wang C, Babrzadeh F, et al. A novel picornavirus associated with gastroenteritis. *J Virol*. 2009;83:12002–6.
95. Jamieson FB, Wang EE, Bain C, Good J, Duckmanton L, Petric M. Human torovirus: a new nosocomial gastrointestinal pathogen. *J Infect Dis*. 1998;178:1263–9.
96. Woo PCY, Lau SKP, Huang Y, Yuen K-Y. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009;234:1117–27.

97. Chandra R. Picobirnavirus, a novel group of undescribed viruses of mammals and birds: A minireview. *Acta Virologica*. 1997. p. 59–62.
98. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:12891–6.
99. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Bovine Kobuviruses from Cattle with Diarrhea To the Editor : A new species of. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(6).
100. Huang YW, Ni YY, Dryman B a., Meng XJ. Multiple infection of porcine Torque teno virus in a single pig and characterization of the full-length genomic sequences of four U.S. prototype PTTV strains: Implication for genotyping of PTTV. *Virology*. Elsevier Inc.; 2010;396(2):289–97.
101. Kapoor a., Simmonds P, Dubovi EJ, Qaisar N, Henriquez J a., Medina J, et al. Characterization of a Canine Homolog of Human Aichivirus. *J Virol*. 2011;85(21):11520–5.
102. Wevers D, Metzger S, Babweteera F, Bieberbach M, Boesch C, Cameron K, et al. Novel Adenoviruses in Wild Primates: a High Level of Genetic Diversity and Evidence of Zoonotic Transmissions. *J Virol*. 2011;85(20):10774–84.
103. Martella V, Pinto P, Buonavoglia C. Canine Noroviruses. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract*. Elsevier Inc.; 2011;41(6):1171–81.
104. D’Mello F, Jervis SM, Edwards PM, Oliver SL, Bridger JC. Heterogeneity in the capsid protein of bovine enteric caliciviruses belonging to a new genus. *Virology*. Elsevier Inc.; 2009;387(1):109–16.
105. Tse H, Chan WM, Li KSM, Lau SKP, Woo PCY, Yuen KY. Discovery and genomic characterization of a novel bat sapovirus with unusual genomic features and phylogenetic position. *PLoS One*. 2012;7(4).
106. Zárate S, Espinosa R, Romero P, Méndez E, Arias CF, López S. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J Virol*. 2000;74(2):593–9.
107. Li W, Godzik A. Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 2006;22(13):1658–9.
108. Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P. Rank products: A simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett*. 2004;573:83–92.
109. Strimmer K. A unified approach to false discovery rate estimation. *BMC Bioinformatics*. 2008;9:303.
110. Allard A, Girones R, Juto P, Wadell G. Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. *J Clin Microbiol*. 1990;28(12):2659–67.
111. Rotbart H a. Enzymatic RNA amplification of the enterovirus. *J Clin Microbiol*. 1990;28(3):438–42.
112. Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*. 1971;35(3):235–41.
113. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Virus Research. 2005. 221-222 p.
114. He Z, Wu L, Li X, Fields MW, Zhou J. Empirical Establishment of Oligonucleotide Probe Design Criteria. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(7):3753–60.

115. Flibotte S, Moerman DG. Experimental analysis of oligonucleotide microarray design criteria to detect deletions by comparative genomic hybridization. *BMC Genomics*. 2008;9:497.
116. Hughes TR, Mao M, Jones a R, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol*. 2001;19(April):342–7.
117. Kane MD, Jatko TA, Stumpf CR, Lu J, Thomas JD, Madore SJ. Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:4552–7.
118. Pickett BE, Sadat EL, Zhang Y, Noronha JM, Squires RB, Hunt V, et al. ViPR: An open bioinformatics database and analysis resource for virology research. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(October 2011):593–8.
119. Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, Li W, McAnulla C, et al. InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*. 2014;30(9):1236–40.
120. Victoria JG, Kapoor A, Li L, Blinkova O, Slikas B, Wang C, et al. Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. *J Virol*. 2009;83(9):4642–51.
121. Holtz LR, Finkbeiner SR, Zhao G, Kirkwood CD, Girones R, Pipas JM, et al. Klassevirus 1, a previously undescribed member of the family Picornaviridae, is globally widespread. *Virology*. 2009;6:86.
122. Lin B, Blaney KM, Malanoski AP, Ligler AG, Schnur JM, Metzgar D, et al. Using a resequencing microarray as a multiple respiratory pathogen detection assay. *J Clin Microbiol*. 2007;45:443–52.
123. Urisman A, Fischer KF, Chiu CY, Kistler AL, Beck S, Wang D, et al. E-Predict: a computational strategy for species identification based on observed DNA microarray hybridization patterns. *Genome Biol*. 2005;6(9):R78.
124. Kim JM, Kim SY, Park Y Bin, Kim HJ, Min BS, Cho JC, et al. Simultaneous detection of major enteric viruses using a combimatrix microarray. *J Microbiol*. 2012;50(6):970–7.
125. Lovmar L, Fock C, Espinoza F, Bucardo F, Syvänen AC, Bondeson K. Microarrays for Genotyping Human Group A Rotavirus by Multiplex Capture and Type-Specific Primer Extension. *J Clin Microbiol*. 2003;41(11):5153–8.
126. Shih SR, Wang YW, Chen GW, Chang LY, Lin TY, Tseng MC, et al. Serotype-specific detection of enterovirus 71 in clinical specimens by DNA microchip array. *J Virol Methods*. 2003;111:55–60.
127. Susi P, Hattara L, Waris M, Luoma-Aho T, Siitari H, Hyypiä T, et al. Typing of enteroviruses by use of microwell oligonucleotide arrays. *J Clin Microbiol*. 2009;47(6):1863–70.
128. Wang H-Y, Malek RL, Kwitek AE, Greene AS, Luu T V, Behbahani B, et al. Assessing unmodified 70-mer oligonucleotide probe performance on glass-slide microarrays. *Genome Biol*. 2003;4:R5.
129. Letowski J, Brousseau R, Masson L. Designing better probes: Effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays. *J Microbiol Methods*. 2004;57:269–78.
130. He Z, Wu L, Fields MW, Zhou J. Use of microarrays with different probe sizes for monitoring gene expression. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(9):5154–62.
131. Rouillard JM, Zuker M, Gulari E. OligoArray 2.0: Design of oligonucleotide probes for DNA microarrays using a thermodynamic approach. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:3057–62.



132. Kang XP, Li YQ, Sun QG, Liu H, Zhu QY, Yang YH. Development of a consensus microarray method for identification of some highly pathogenic viruses. *J Med Virol.* 2009;81:1945–50.
133. Koehler RT, Peyret N. Effects of DNA secondary structure on oligonucleotide probe binding efficiency. *Comput Biol Chem.* 2005;29:393–7.
134. Ratushna VG, Weller JW, Gibas CJ. Secondary structure in the target as a confounding factor in synthetic oligomer microarray design. *BMC Genomics.* 2005;6:31.
135. Rovida F, Campanini G, Sarasini A, Adzasehoun KMG, Piralla A, Baldanti F. Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Elsevier Inc.; 2013;75(1):110–1.
136. Medici MC, Tummolo F, Albonetti V, Abelli LA, Chezzi C, Calderaro A. Molecular detection and epidemiology of astrovirus, bocavirus, and sapovirus in Italian children admitted to hospital with acute gastroenteritis, 2008-2009. *J Med Virol.* 2012;84:643–50.
137. Rovida F, Campanini G, Piralla A, Adzasehoun KMG, Sarasini A, Baldanti F. Molecular detection of gastrointestinal viral infections in hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Elsevier Inc.; 2013;77(3):231–5.
138. Coupland LJ, McElarney I, Meader E, Cowley K, Alcock L, Naunton J, et al. Simultaneous detection of viral and bacterial enteric pathogens using the Seeplex® Diarrhea ACE detection system. *Epidemiol Infect.* 2012;141:2111–21.
139. Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(2):304–6.
140. Padilla-Noriega L, Méndez-Toss M, Menchaca G, Contreras JF, Romero-Guido P, Puerto FI, et al. Antigenic and genomic diversity of human rotavirus VP4 in two consecutive epidemic seasons in Mexico. *J Clin Microbiol.* 1998;36(6):1688–92.
141. Rodríguez-Castillo A, Ramírez-González JE, Padilla-Noriega L, Barrón BL. Analysis of human rotavirus G1P[8] strains by RFLP reveals higher genetic drift in the VP7 than the VP4 gene during a 4-year period in Mexico. *J Virol Methods.* 2006;138:177–83.
142. Gutiérrez-Escolano AL, Velázquez FR, Escobar-Herrera J, Saucedo CL, Torres J, Estrada-García T. Human caliciviruses detected in Mexican children admitted to hospital during 1998-2000, with severe acute gastroenteritis not due to other enteropathogens. *J Med Virol.* 2010;82:632–7.
143. Gómez-Santiago F, Ribas-Aparicio RM, García-Lozano H. Molecular characterization of human calicivirus associated with acute diarrheal disease in mexican children. *Virol J.* 2012;9:54.
144. Méndez-toss M, Griffin DD, Calva J, Juan F, Puerto FI, Mota F, et al. Prevalence and Genetic Diversity of Human Astroviruses in Mexican Children with Symptomatic and Asymptomatic Infections Prevalence and Genetic Diversity of Human Astroviruses in Mexican Children with Symptomatic and Asymptomatic Infections Martha Me. *J Clin Microbiol.* 2004;42(1):151–7.
145. Schildgen O. Human Bocavirus: Lessons Learned to Date. *Pathogens.* 2013;2:1–12.

146. Okamoto H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;331:1–20.
147. Chen Q, Li J, Deng Z, Xiong W, Wang Q, Hu YQ. Comprehensive detection and identification of seven animal coronaviruses and human respiratory coronavirus 229E with a microarray hybridization assay. *Intervirology.* 2010;53:95–104.
148. Koh H, Baek SY, Shin J Il, Chung KS, Jee YM. Coinfection of viral agents in Korean children with acute watery diarrhea. *J Korean Med Sci.* 2008;23:937–40.
149. Lindsay B, Ramamurthy T, Gupta S, Sen T, Takeda Y, Rajendran K, Nair GB, et al. Diarrheagenic pathogens in Polymicrobial infections. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(4):606–11.
150. Valentini D, Vittucci a. C, Grandin a., Tozzi a. E, Russo C, Onori M, et al. Coinfection in acute gastroenteritis predicts a more severe clinical course in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32:909–15.
151. Wong CW, Heng CLW, Wan Yee L, Soh SWL, Kartasasmita CB, Simoes E a F, et al. Optimization and clinical validation of a pathogen detection microarray. *Genome Biol.* 2007;8(5):R93.
152. Lee WH, Wong CW, Leong WY, Miller LD, Sung WK. LOMA: a fast method to generate efficient tagged-random primers despite amplification bias of random PCR on pathogens. *BMC Bioinformatics.* 2008;9:368.
153. Sedlak RH, Jerome KR. Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Elsevier Inc.; 2013;75(1):1–4.
154. Piao J, Jiang J, Xu B, Wang X, Guan Y, Wu W, et al. Simultaneous detection and identification of enteric viruses by PCR-Mass assay. *PLoS One.* 2012;7(8).
155. Naccache SN, Federman S, Veeraraghavan N, Zaharia M, Lee D, Samayoa E, et al. A cloud-compatible bioinformatics pipeline for ultrarapid pathogen identification from next-generation sequencing of clinical samples. *Genome Res.* 2014;24:1180–92.
156. Bibby K. Metagenomic identification of viral pathogens. *Trends Biotechnol.* Elsevier Ltd; 2013;31(5):275–9.
157. Guo D, Liu B, Liu F, Cao B, Chen M, Hao X, et al. Development of a DNA microarray for molecular identification of all 46 Salmonella O serogroups. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79:3392–9.
158. Lee DY, Seto P, Korczak R. DNA microarray-based detection and identification of waterborne protozoan pathogens. *J Microbiol Methods.* Elsevier B.V.; 2010;80(2):129–33.
159. Wang Q, Wang S, Beutin L, Cao B, Feng L, Wang L. Development of a DNA microarray for detection and serotyping of enterotoxigenic Escherichia coli. *J Clin Microbiol.* 2010;48(6):2066–74.
160. Leveque N, Van Haecke A, Renois F, Boutolleau D, Talmud D, Andreoletti L. Rapid virological diagnosis of central nervous system infections by use of a multiplex reverse transcription-PCR DNA microarray. *J Clin Microbiol.* 2011;49(11):3874–9.

161. Lévêque N, Renois F, Andréoletti L. The microarray technology: Facts and controversies. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:10–4.

## **Anexos**

### **Anexo 1. Artículo publicado**

# DNA Microarray for Detection of Gastrointestinal Viruses

Miguel A. Martínez,<sup>a</sup> María de los Dolores Soto-del Río,<sup>a\*</sup> Rosa María Gutiérrez,<sup>b</sup> Charles Y. Chiu,<sup>c,d</sup> Alexander L. Greninger,<sup>e</sup> Juan Francisco Contreras,<sup>f</sup> Susana López,<sup>a</sup> Carlos F. Arias,<sup>a</sup> Pavel Isa<sup>a</sup>

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico<sup>a</sup>; Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico<sup>b</sup>; Department of Laboratory Medicine, University of California—San Francisco, San Francisco, California, USA<sup>c</sup>; UCSF-Abbott Viral Diagnostics and Discovery Center, University of California—San Francisco, San Francisco, California, USA<sup>d</sup>; Department of Biochemistry and Biophysics, University of California—San Francisco, San Francisco, California, USA<sup>e</sup>; Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico<sup>f</sup>

Gastroenteritis is a clinical illness of humans and other animals that is characterized by vomiting and diarrhea and caused by a variety of pathogens, including viruses. An increasing number of viral species have been associated with gastroenteritis or have been found in stool samples as new molecular tools have been developed. In this work, a DNA microarray capable in theory of parallel detection of more than 100 viral species was developed and tested. Initial validation was done with 10 different virus species, and an additional 5 species were validated using clinical samples. Detection limits of  $1 \times 10^3$  virus particles of *Human adenovirus C* (HAdV), *Human astrovirus* (HAstV), and group A *Rotavirus* (RV-A) were established. Furthermore, when exogenous RNA was added, the limit for RV-A detection decreased by one log. In a small group of clinical samples from children with gastroenteritis ( $n = 76$ ), the microarray detected at least one viral species in 92% of the samples. Single infection was identified in 63 samples (83%), and coinfection with more than one virus was identified in 7 samples (9%). The most abundant virus species were RV-A (58%), followed by *Anellovirus* (15.8%), HAstV (6.6%), HAdV (5.3%), *Norwalk virus* (6.6%), *Human enterovirus* (HEV) (9.2%), *Human parechovirus* (1.3%), *Sapporo virus* (1.3%), and *Human bocavirus* (1.3%). To further test the specificity and sensitivity of the microarray, the results were verified by reverse transcription-PCR (RT-PCR) detection of 5 gastrointestinal viruses. The RT-PCR assay detected a virus in 59 samples (78%). The microarray showed good performance for detection of RV-A, HAstV, and calicivirus, while the sensitivity for HAdV and HEV was low. Furthermore, some discrepancies in detection of mixed infections were observed and were addressed by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) of the viruses involved. It was observed that differences in the amount of genetic material favored the detection of the most abundant virus. The microarray described in this work should help in understanding the etiology of gastroenteritis in humans and animals.

Gastroenteritis stands among the five principal causes of mortality by disease and morbidity at all ages worldwide. The most affected population is children under 5 years of age, where it accounts for the second cause of postneonatal death, with approximately 2.6 million deceased per year (1). Although the majority of deaths occur in developing countries, diarrheal disease is among the most common causes of illness worldwide, with approximately 4,620 million episodes annually (1). Besides humans, all vertebrate species suffer from enteric diseases. Infections in farm animals can lead to large economic losses, while household pets, such as dogs and cats, are also affected. On the other hand, wild animals, such as deer, monkeys, bats, foxes, wolves, and boars, among others, can act as potential reservoirs for pathogens (2). Gastrointestinal (GI) infections are caused by a variety of pathogens, including parasites, bacteria, and viruses. The characterization of pathogens causing GI infections of viral etiology has led to the establishment of a main group of pathogens (*Rotavirus A* [RV-A], *Norwalk virus* [NV], *Human astrovirus* [HAstV], and *Human adenovirus F* [HAdV-F]) (3) for which specific diagnostic tests were developed (4). Tests for secondary or rare viruses are available but are usually restricted to experimental use. Routine diagnostic methods for viral gastroenteritis are nowadays based on the detection of virus components by immunoassays or by molecular methods (5, 6, 7, 8), with the majority of these tests designed to evaluate only a single pathogen at a time.

The use of two or more specific primer sets (multiplexing) in PCR allows the amplification of several targets in one test. Although multiplex tests are available for diverse viruses (9, 10, 11,

12, 13), facilitating rapid and sensitive detection of the main GI disease agents, these assays are still limited in the number of viruses detected, and the results can be affected by mutations at primer binding sites. On the other hand, DNA microarrays represent an alternative to detect hundreds to thousands of potential pathogens in a single assay. Microarray detection is based on solid-phase hybridization, in which specific probes are deposited on a surface and react with a mixture of labeled nucleic acids. So far, different microarrays have been developed to detect causative infectious agents associated with a number of diseases: respiratory (14, 15, 16), hemorrhagic (17), blood borne (18, 19), and central

Received 8 May 2014 Returned for modification 9 June 2014

Accepted 23 October 2014

Accepted manuscript posted online 29 October 2014

Citation Martínez MA, Soto-del Río MDL, Gutiérrez RM, Chiu CY, Greninger AL, Contreras JF, López S, Arias CF, Isa P. 2015. DNA microarray for detection of gastrointestinal viruses. *J Clin Microbiol* 53:136–145.  
doi:10.1128/JCM.01317-14.

Editor: B. A. Forbes

Address correspondence to Pavel Isa, pavel@ibt.unam.mx.

\* Present address: María de los Dolores Soto-del Río, Department of Animal Pathology, University of Turin, Grugliasco, Turin, Italy.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01317-14>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.01317-14

TABLE 1 Reference virus species used in microarray validation

Family	Genus	Species	Strain <sup>a</sup>	No. of positive probes/total <sup>b</sup>
<i>Astroviridae</i>	<i>Mammastrovirus</i>	<i>Human astrovirus</i>	Yuc8	4/4
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	<i>Human adenovirus C</i>	Adv5	10/13
<i>Caliciviridae</i>	<i>Vesivirus</i>	<i>Feline calicivirus</i>	F9	14/22
	<i>Norovirus</i>	<i>Norwalk virus<sup>c</sup></i>		8/12
	<i>Sapovirus</i>	<i>Sapporo virus<sup>c</sup></i>		5/14
<i>Flaviviridae</i>	<i>Pestivirus</i>	<i>Bovine viral diarrhoea virus 1</i>	NADL	6/6
	<i>Flavivirus</i>	<i>Dengue virus 4</i>		9/9
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Respirovirus</i>	<i>Bovine parainfluenza virus 3</i>	SF-4	9/9
<i>Reoviridae</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Rotavirus A</i>	RRV	22/42
			TFR-41	14/42
			UK	19/42
			Wa	21/42
	<i>Orthoreovirus</i>	<i>Mammalian orthoreovirus</i>	T1L	11/25
		T3D	19/25	

<sup>a</sup> Reference strains were provided by Ramon Gonzalez, FC-UAEM (human adenovirus C), Lorena Gutierrez, CINVESTAV-IPN (feline calicivirus, Norwalk virus, and Sapporo virus), Rosa E. Sarmiento, FMVZ-UNAM (bovine viral diarrhoea virus 1 and bovine parainfluenza virus 3), Rosa María Del Angel, CINVESTAV-IPN (dengue virus 4), and Terrence S. Dermody, Vanderbilt University School of Medicine (mammalian orthoreovirus).

<sup>b</sup> Number of oligonucleotide probes which recognized virus/total number of oligonucleotide probes designed to bind viral species.

<sup>c</sup> Clinical reference samples.

nervous system (20) syndromes. Other broad microarrays have been developed for virus discovery (21); however, a diagnostic microarray specific for viruses found in the GI tract is lacking. Given the recent rise in the number of new viral species (22, 23, 24, 25, 26), diagnostic DNA microarrays represent a possibility for testing their clinical importance and impact on human and animal health.

In this work, the development and validation of a DNA microarray designed to detect in principle more than 100 viral species associated with the GI tract in vertebrates is presented. This microarray was successfully used to identify viruses in a small set of gastroenteritis clinical samples.

## MATERIALS AND METHODS

**Cells, viruses, and clinical samples.** Viruses were either present in our laboratory or kindly provided by different partner laboratories (Table 1). Clinical samples from children presenting gastroenteritis during the winter season from 2004 to 2005 were obtained in Monterrey, Mexico, with the written consent of a parent or guardian. Analysis of human clinical samples was approved by the Bioethics Committee of the Instituto de Biotecnología. The initial screening of samples for RV-A was performed in Monterrey by silver staining of RV-A segmented double-stranded RNAs separated by SDS-PAGE. No previous screening for bacterial or parasitic agents was performed on the group of samples. Triple-layered particles of RV-A strain RRV were purified with a cesium chloride density gradient as described previously (27).

**Microarray probe design.** All virus species that have been either associated with gastroenteritis or found in the gastrointestinal tract were identified by an extensive review of published literature and selected to be included in microarray. All available full-length genomes or complete gene sequences of the selected virus species were obtained from GenBank (up to February 2009), and the proper databases were created. For each virus species, sequence redundancy was eliminated according to sequence

similarity with cutoff values of 95 to 99% using CD-HIT software (28). One sequence for each species was selected as a source for probe production and was processed as described previously (29). Specifically, sequences were consecutively split into 70-mers with a shifting window of 3 nucleotides, with each 70-mer corresponding to a potential probe. The 70-mer-length probes have sufficient size to allow for stringent hybridization conditions while allowing for a certain degree of mismatches, but they are small enough to maintain species specificity (30, 31, 32). Target probes were selected to be included in the microarray by analysis of BLAST results and calculation of hybridization thermodynamics ( $\Delta G$ ) calculated by the nearest-neighbor method (33). For the probe to be considered a good candidate for the microarray, the  $\Delta G$  was required to be at least  $-70$  kcal/mol for homologous sequences and higher than  $-40$  kcal/mol for heterologous sequences. A minimum of 6 nonoverlapping probes from conserved regions in virus genomes were selected for each virus, and each available genome sequence in the target database for given species was recognized by at least two probes. When necessary, due to variability within a species, two or more source sequences were chosen and each single sequence was processed as described above.

**Microarray probe *in silico* analysis.** The hybridization thermodynamics of RV-A selected probes were evaluated *in silico* with VP1, VP2, and NSP5 segments of RV-A strains representing all full-genome G and P genotypes available. The hybridization  $\Delta G$  (kcal/mol) between probe and target was calculated by the nearest-neighbor method. The best probe-target  $\Delta G$  was plotted in a heat map using R. Detection of a target is when the  $\Delta G$  is  $< -50$  kcal/mol.

**Microarray production.** Selected 70-mer probes were synthesized by Illumina Oligator (Illumina Inc., CA, USA). Oligonucleotides were resuspended to 400 pmol in  $3\times$  SSC buffer (0.45 M NaCl, 45 mM sodium citrate, pH 7.0) and spotted onto epoxide-coated glass slides in the Microarray Facility of the Prostate Centre at Vancouver General Hospital, Vancouver, British Columbia, Canada. Each spot contained one specific probe to detect one virus species and 4 pmol of spike70 (a 70-mer without a known biological complementary sequence) (34), used to precisely identify probe spot locations on the microarray. Slides were maintained in a humidity-free chamber until their use.

**Nucleic acid extraction, amplification, and labeling.** Genetic material from virus lysates (cell culture supernatants from reference strains) was extracted with the PureLink viral RNA/DNA kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, USA). For clinical samples and Norwalk and Sapporo virus positive controls, 100  $\mu$ g of stool was added to conical screw-cap tubes containing 100 mg of 150- to 212- $\mu$ m glass beads (Sigma, USA), chloroform (100  $\mu$ l), and phosphate-buffered saline (PBS) up to 1 ml. Samples were homogenized in a bead beater (Biospec Products, USA). After 10 min of centrifugation at  $2,000\times g$ , supernatants were recovered and filtered in Spin-X 22- $\mu$ m-pore filters (Costar, NY) at  $5,000\times g$  for 10 to 20 min. Filtered samples were treated with Turbo DNase (Ambion, USA) and RNase (Sigma, USA) for 30 min at 37°C and immediately chilled on ice. Nucleic acids were then extracted from 200  $\mu$ l using the PureLink viral RNA/DNA kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, USA). Nucleic acids from virus lysates or clinical samples were eluted in nuclease-free water, aliquoted, quantified in NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, DE), and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until further use.

Sample processing and random amplification of nucleic acids were performed essentially as described previously (21, 35, 36). Briefly, reverse transcription was done using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, USA) and primer A (5'-GTTTCCCAGTAGGTCTC<sub>9</sub>-3'). The cDNA strand was generated by two rounds of synthesis with Sequenase 2.0 (USB, USA). The obtained cDNA was then amplified with KlenTaq polymerase (Sigma, USA) or Taq polymerase (New England BioLabs, USA) using primer B (5'-GTTTCCCAGTAGGTCTC-3') by 30 cycles of the following program: 30 s at 94°C, 1 min at 50°C, and 1 min at 72°C. As a last step, the nucleotide analogue aminoallyl-dUTP (TriLink, USA) in a 7:3 ratio with dTTP was incorporated during an additional 20 cycles of PCR

using the same conditions described above and 5  $\mu$ l of product from the previous PCR as starting material. The amplified products were purified with the DNA Clean & Concentrator-5 kit (Zymo Research, USA). Coupling reactions of sample DNA with Cy3 and probe 70 (70-mer complementary to spike 70) with Cy5 dyes (GE HealthCare, USA) were done as described elsewhere (31). Fluorophore-labeled DNA was purified with the Zymo DNA Clean & Concentrator-5 kit, and label incorporation was quantified with NanoDrop.

**Slide preparation, hybridization and scanning.** Microarray slides were treated just before their use with an ethanolamine wash solution (50 mM ethanolamine, 0.1% SDS, 0.1 M Tris, pH 9) for 15 min at 50°C, followed by two washes in distilled water, and they were then dried by centrifugation for 5 min at 500 rpm. Processed slides were loaded with 30  $\mu$ l of a combination of Cy3- and Cy5-labeled DNA in 3 $\times$  SSC buffer, and the hybridization was left to proceed in a sealed chamber submerged in a water bath at 65°C for 8 to 12 h. After incubation the slides were washed consecutively in 2 $\times$  SSC (65°C), 2 $\times$  SSC, 1 $\times$  SSC, and 0.2 $\times$  SSC and dried for 5 min at 500 rpm. Hybridization images were acquired with an Axon GenePix 4000B scanner (Molecular Devices, USA) synchronized with GenePix Pro 6.0 software to detect and measure spot intensities.

**Data analysis.** Hybridization spot intensities were first filtered by the following spot quality control parameters: spot size and shape (denoted as good/bad/absent), channel 532 foreground (F532) signal saturation (% F532 saturated, <5), and F532 signal proportion over channel 532 background (B532) signal [(% > B532 + 2 standard deviations) > 50%]. Spots showing good quality were used to generate microarray level background values. Normalization of intensity values was done with the formula (F532i/F532m) – (B532i-B532m), where F532i and B532i are the foreground and background signals of spot “i,” respectively, and F532m and B532m are the sums of all foreground or background spots, respectively.

The statistical significance of probe intensities in the reference samples was obtained by the rank products algorithm (37) using a minimum of three technical replicates. Rank values from negative-control samples were recorded and used to generate a “spot rank value” included in subsequent spot quality analysis. For clinical samples, z-score transformed intensities and their *P* values were analyzed with the *fdr* tool package (38) in R (39). Positive virus species were defined as having at least two probes with *P* values of <0.05 and false-discovery rates (FDRs) of <0.01.

**Limit-of-detection assays.** In order to determine the amount of virus particles detectable by the microarray, three reference viruses with different genome types were assayed: RV-A double-stranded RNA (dsRNA), HAstV positive single-stranded RNA (ssRNA+), and HadV-C double-stranded DNA (dsDNA). RNA was extracted from purified RV-A strain RRV and MA104 cells. The RV-A genome molecular mass was calculated according to the following formula: (genome length [bp]  $\times$  325)/6.022  $\times$  10<sup>23</sup> (40). Decreasing dilutions of RV-A RNA corresponding to 1  $\times$  10<sup>8</sup> to 10 particles were analyzed alone or mixed with an excess of MA104 cells RNA (50 ng). Similarly, decreasing dilutions of focus-forming unit-titrated cell lysates of HAstV or HAdV-C, corresponding to 1  $\times$  10<sup>7</sup> to 100 virus particles, were extracted, amplified, labeled, and processed using the full microarray protocol as described above.

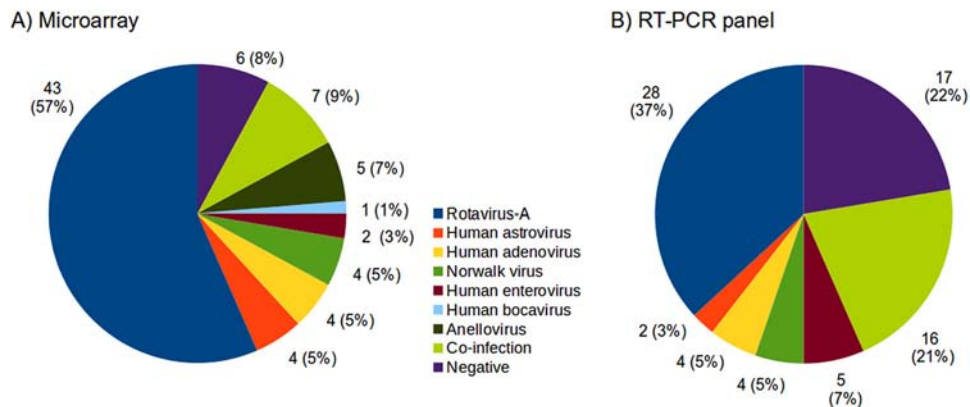
**Conventional diagnostic or confirmatory RT-PCR.** Nucleic acids extracted from clinical samples were used to perform diagnostic reverse transcription-PCR (RT-PCR) using Qiagen’s one-step RT-PCR kit (Qiagen, USA) or SuperScript III one-step RT-PCR with Platinum *Taq* polymerase (Invitrogen, USA). For confirmatory RT-PCR, cDNA was generated with SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, USA), and *Taq* polymerase (New England BioLabs) was used for PCRs following the manufacturer’s instructions. Oligonucleotide primers used in diagnostic or confirmatory RT-PCR are listed in Table S1 in the supplemental material. PCRs for RV-A detection included a 5-min boiling step followed by immediate ice-chilling step just before RT-PCR. Amplification conditions for RV-A, HAstV, and calicivirus (CV) were as follows: 30 min at 50°C; 15 min at 95°C; 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 50°C, and 1 min at

72°C; and a final extension of 5 min at 72°C. RT-PCR conditions for human adenovirus (HAdV) were as follows: 30 min at 50°C; 15 min at 95°C; 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 55°C, and 1 min at 72°C; and a final extension for 5 min at 72°C. The human enterovirus (HEV) amplification program was as follows: 30 min at 50°C; 15 min at 95°C; 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 50°C, and 30 s at 72°C; and final extension for 5 min at 72°C. *Human parechovirus* (HPeV) amplification was as follows: 30 min at 50°C; 15 min at 95°C; 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 48°C, and 1 min at 72°C; and a final extension for 5 min at 72°C. *Anellovirus* (TTV) confirmation was performed as a seminested PCR. Conditions for the first round were as follows: 2 min at 94°C; 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C, and 30 s at 72°C; and a final extension for 5 min at 72°C. The second round used the same program but with only 30 cycles. *Human bocavirus* (HBoV) was detected by Seeplex RV15 OneStep ACE detection (Seegene, USA). PCR products were visualized in 2.0% agarose gels, except for HEV, which required 3.5% gels due to a small amplicon size.

**Semiquantitative RT-PCR and PCR detection of viruses.** One-step real-time RT-PCR and real-time PCR were performed using primers targeting conserved genomic regions (see Table S1 in the supplemental material). RV-A detection required previous sample boiling for 5 min and immediate ice chilling. For the RNA viruses (RV-A, HAstV, NV, and HEV), detection was performed as a two-step process. First, 3  $\mu$ l of RNA (5 ng) was reverse transcribed with 0.125  $\mu$ l (50 U/ $\mu$ l) SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, USA), 0.25  $\mu$ l of RNase inhibitor (20 U/ $\mu$ l), 12.5  $\mu$ l of 2 $\times$  SYBR green master mix (Applied Biosystems, USA), 1  $\mu$ l of the primer, and diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated water in a 24- $\mu$ l final volume. Samples were incubated for 30 min at 48°C, followed by enzyme inactivation for 10 min at 90°C. In the second step 1  $\mu$ l of second primer was added, and PCR was carried out as follows. The HAstV and RV-A amplification program consisted of 10 min at 95°C and 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. The NV amplification program was 5 min at 95°C and 45 cycles of 10 s at 95°C, 20 s at 48°C, and 45 s at 60°C. The HEV program was 10 min at 95°C, 45 cycles of 20 s at 95°C, 20 s at 55°C, and 1 min at 72°C, and final extension of 5 min at 72°C. In the case of HEV, both specific primers were added before PCR, since the RT step was performed using random hexamers. HAdV amplification reaction mixtures consisted of 3  $\mu$ l (5 ng) of DNA, 12.5  $\mu$ l of 2 $\times$  SYBR green master mix, and 1  $\mu$ l of each corresponding primer in a 25- $\mu$ l volume. Conditions were 95°C for 8 min, 45 cycles of 30 s at 95°C, 20 s at 55°C, and 20 s at 72°C, and a final extension of 5 min at 72°C. Amplifications were carried out in an ABI Prism 7500 sequence detector system (Applied Biosystems). Dissociation curves were evaluated for nonspecific products. Threshold cycle (*C<sub>T</sub>*) values corresponding to detection of specific virus sequences were obtained from triplicates of selected samples presenting coinfections and compared for the viruses detected. PCR primer sets for detection of CV, HAdV, and HEV were designed to recognize the target at the genus level (5, 6, 41).

## RESULTS

**Selection of viruses related to gastrointestinal infections.** An advantage of the microarray technology is the capacity to test hundreds and even thousands of targets in a single assay. The main goal of this study was to develop an assay for detection of all viruses that have been found in stool samples from vertebrates, associated or not with gastroenteritis, which should facilitate clinical and epidemiological studies in humans and animals. A deep search of the scientific literature available in public databases resulted in a list of 128 species of viruses reported to be present in the gastrointestinal tract, representing 55 genera that belonged to 17 viral families (see Table S2 in the supplemental material). The list of virus species includes the well-known human gastroenteritis viruses (calicivirus group, rotaviruses, human astroviruses, and enteric adenoviruses), together with some recently described human viruses (*Human adenovirus G* [23], *Human bocavirus* [42],



**FIG 1** Prevalence of viruses in clinical samples. A group of 76 clinical samples from children presenting gastroenteritis was analyzed by the described microarray (A) or by diagnostic RT-PCR for the 5 most common gastrointestinal pathogens (B). Samples with coinfections are shown. Negative, no virus identified.

*Cosavirus* [24], *Saffold virus* [43], and *Salivirus A* [25, 44]). Classical, nonhuman gastrointestinal viruses (coronavirus, circovirus, and pestiviruses) and other new discovered viral agents (at the time of the microarray design) from different animal species, such as animal anelloviruses (45, 46), bat astroviruses (47), and bovine kobuviruses (48), whose participation as pathogens is not well understood, are also included in the microarray. Thus, the virus species of interest encompassed a variety of viruses with different characteristics, such as RNA and DNA genomes, enveloped/non-enveloped virions, segmented or nonsegmented genomes, and single- or double-stranded genomes. All available complete gene or genome sequences were retrieved from a public database (GenBank) and were organized in a taxonomic hierarchical database following the ICTV classification at the date the microarray probes were designed (ICTV, 2009) or, for novel species, as suggested by the discoverer.

**Probe selection and microarray validation.** A set of 1,256 70-mer microarray probes were selected from conserved regions and designed to identify 128 viral species associated with the GI tract, with at least 6 probes designed for each viral species and at least 2 probes corresponding to each sequenced viral genome. To maintain stringent experimental conditions (hybridization at 65°C) while allowing a certain amount of sequence variability, the probes were designed as 70-mers. The highest number of probes covered RV-A (42 probes), *Alphacoronavirus* (28 probes), and mammalian *Orthoreovirus* (25 probes) (see Tables S2 and S3 in the supplemental material). For some viruses, the design of a complete set of 6 oligonucleotides was not possible due to the lack of enough complete sequences; nevertheless, available probes were included for each viral species.

Reference strains for 10 viral species were available for probe validation. These species represent 6 viral families and include 4 main human pathogens (HAstV, NV, SV, and RV-A), other human viruses (mammalian *Orthoreovirus*, HAdV-C, and *Dengue virus 4*), and three nonhuman viruses (*Feline calicivirus*, *Bovine viral diarrhea virus 1*, and *Bovine parainfluenza virus 3*) (Table 1). All reference strains tested were detected as expected, including four different RV-A strains (human strain Wa, simian strain RRV, porcine virus TFR-41, and bovine strain UK) and two different mammalian *Orthoreovirus* strains (T1L and T3D) (Table 1). To test the *in silico* capacity of probes to recognize different and variable strains, 42 probes specific for rotavirus were analyzed with a

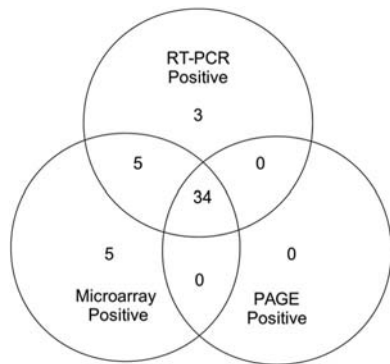
panel of all available G and P genotypes (see Fig. S1 in the supplemental material). The only genotype that the microarray probably would not detect was G22P[35], belonging to a turkey rotavirus strain.

**Sensitivity and specificity of the assay.** To determine the sensitivity limits of the DNA microarray, the virus genetic material was extracted from lysates of HAstV- or HAdV-C-infected cells or from CsCl-purified simian strain RRV particles. In a series of cell lysate dilutions (corresponding from  $10^2$  to  $10^7$  viral particles), the microarray was able to detect as few as  $10^3$  HAdV-C or HAstV virus particles. Similarly, RV-A RNA (corresponding to 10 to  $10^8$  viral particles) was amplified before or after addition of a constant amount of cellular RNA (50 ng). In the absence of cellular RNA, the detection limit for viral RNA was  $10^3$  genome copies; however, when the complexity of the sample was augmented by adding cellular RNA, the detection limit was one logarithm lower, detecting  $10^4$  genome copies.

To evaluate the probe specificity, a rank products algorithm (37) was applied to the results obtained from technical replicates of reference viruses and mock-infected cell controls (MA104 cells, A549 cells, and C6/36 cells). Based on the false-discovery rate (FDR) test included in the software, 16 probes were identified as presenting nonspecific behavior (marked with asterisks in Table S3 in the supplemental material). When analyzed, these nonspecific probes did not show any common feature, although some presented a high GC content (>70%). In the following experiments, the results obtained with these probes were excluded from analysis.

**Analysis of clinical samples.** To further test the capacity of the microarray to detect viruses, 76 samples from children under 5 years of age, collected during the winter season from 2004 to 2005 in Monterrey, Mexico, were analyzed. The collection of samples was originally screened for RV-A by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and stored at  $-70^\circ\text{C}$ . Using the microarray developed in this study, a viral agent was detected in 70 out of 76 (92%) samples tested; a single virus was found in 63 (83%) samples, while two or more viral species were detected in 7 (9%) samples (Fig. 1). Among the viruses detected, the most common was RV-A (44 samples), followed by TTV (12 positives), HEV (7), caliciviruses (6 [5 NV and 1 SV]), HAstV (5), HAdV (4 [3 HAdV-F and 1 HAdV-A]), HPeV (2), and HBoV (1) (Fig. 1). It is important to mention that only 6 (8%) samples remained neg-





**FIG 2** Identification of rotavirus group A. A group of 76 gastroenteritis samples was analyzed by three methods for the presence of rotavirus. These were visualization of rotavirus dsRNA by SDS-PAGE, RT-PCR, and the microarray designed in this work. The circles represent numbers of rotavirus-positive samples identified by one, two, or three of the methods used.

ative after microarray detection and that not all viruses found are known to be pathogenic. As mentioned above, after collection all samples were screened for the presence of RV-A by SDS-PAGE. Additionally, as described below, all samples tested with the microarray were tested for selected viruses, including RV-A, by diagnostic RT-PCR. In 34 samples RV-A was identified by the three methods tested; 5 additional samples were found positive by microarray and RT-PCR tests (Fig. 2). Another 8 were found positive either by microarray ( $n = 5$ ) or by RT-PCR ( $n = 3$ ) (Fig. 2). Notably, the 3 samples that were positive only for RV-A by RT-PCR were mixed-infection samples.

To compare the results of the microarray method with those of a routine diagnostic method for viral gastroenteritis, RT-PCR detection for a panel of 5 viruses (RV-A, HAstV, HAdV, CV [NV and SV], and HEV) was performed in all clinical samples. It is important to point out that the primer sets for HAdV, CV, and HEV are designed to recognize their target at the genus level (5, 6, 41).

The RT-PCR panel detected at least one virus in 59 samples

(78%) (Fig. 1B), a lower detection rate than that with the DNA microarray when analyzing only these 5 viruses ( $n = 65$ , 85%). At the individual virus level, the RT-PCR panel confirmed the microarray results in all HAdV-positive samples (1 HAdV-A and 3 HAdV-F), having a positive predictive value (PPV) of 100%, in all CV (5 NV and 1 SV)-positive samples (PPV, 100%), and in 39 of 44 RV-A-positive samples (PPV, 89%), while PPVs were lower for HAstV, with 3 of 5 positive samples identified by microarray (PPV 60%), and HEV, with 5 of 7 positive samples identified by microarray (PPV 71%) (Fig. 3).

**Detection of viruses in MI.** The RT-PCR screening resulted in the identification of 16 mixed infections (MI), while the microarray identified only 7 MI (Fig. 1). The microarray detected up to 4 different viruses within one sample, with TTV found in all MI samples. The following viral combinations were found by microarray: 3 samples with HEV B/TTV and one sample each with NV/TTV, HEV-B/HAstV/TTV, RV-A/HPeV/TTV, and SV/HEV-B/HPeV/TTV (Fig. 1). Of interest, *Human parechovirus* and *Sapporo virus* were detected only in coinfection. The MI combinations observed in RT-PCR were RV-A/HAdV (8 samples), RV-A/HEV (5), HAstV/HEV (1), RV-A/CV (1), and HAdV/CV/HEV (1) (Fig. 1B). Examining these 16 samples, we observed that RV-A was the only virus identified by microarray in all samples with RV-A/HAdV coinfection ( $n = 8$ ) and in 4 out of 5 RV-A/HEV samples, while HAstV was the only virus identified in samples with HAstV/HEV coinfection (Table 2). In one sample, NV was identified as the sole species by microarray, while RT-PCR results showed CV/HAdV/HEV triple coinfection (Table 2). Thus, in all of these 16 samples, a single virus was identified by the microarray, while at least two viral species were detected by RT-PCR.

One possible explanation for the discrepancies in the identification of mixed infections using microarrays and RT-PCR could be the variability in the relative amount of genetic material from each virus in clinical samples, as it has been observed that individuals infected with some viruses, for example RV-A and NV, can shed large amounts of viral particles in the acute stage of infection (49, 50, 51). To explore this possibility, the amount of viral genetic

RV-A			HAdV			CV			
	PCR+	PCR-		PCR+	PCR-		PCR+	PCR-	
array +	39	5	44	4	0	4	6	0	6
array -	3	29	32	9	63	72	0	70	70
	42	34	76	13	63	76	6	70	76
	Sensitivity 93%			Sensitivity 30%			Sensitivity 100%		
	Specificity 85%			Specificity 100%			Specificity 100%		
	PPV 88.6%			PPV 100%			PPV 100%		
	NPV 90.6%			NPV 87.5%			NPV 100%		
HAstV			HEV						
	PCR+	PCR-		PCR+	PCR-		PCR+	PCR-	
array +	3	2	5	5	2	7			
array -	0	71	71	7	62	69			
	3	73	76	12	64	76			
	Sensitivity 100%			Sensitivity 42%					
	Specificity 97%			Specificity 97%					
	PPV 60%			PPV 71.6%					
	NPV 100%			NPV 89.9%					

**FIG 3** Microarray diagnostic sensitivity and specificity. A panel of 5 virus groups (rotavirus group A [RV-A], human astrovirus [HAstV], human adenovirus [HAdV], calicivirus [CV], and human enterovirus [HEV]) was tested by RT-PCR in all 76 samples. Results were compared to those obtained by microarray analysis. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of the microarray (array), compared to RT-PCR (PCR) for detection of particular pathogens are shown.

**TABLE 2**  $C_T$  values for viral nucleic acid quantification in samples with coinfection

Virus identified by:		$C_T$ value determined by real-time RT-PCR for <sup>a</sup> :				
Diagnostic RT-PCR	Microarray	RV-A	HAdV	HEV	NV <sup>b</sup>	HAsV
RV-A	RV-A	21.9				
HAdV	HAdV		14.7			
HEV	HEV			23.8		
NV	NV				19.6	
HAsV	HAsV					14.8
RV-A/HAdV	RV-A	<b>20.5</b>	37.6			
RV-A/HAdV	RV-A	<b>22.5</b>	28.4			
RV-A/HAdV	RV-A	<b>28.2</b>	41.3			
RV-A/HAdV	RV-A	<b>28.6</b>	44.5			
RV-A/HAdV	RV-A	<b>29.1</b>	43.8			
RV-A/HAdV	RV-A	<b>29.2</b>	43.4			
RV-A/HAdV	RV-A	<b>30.4</b>	30.6			
RV-A/HEV	RV-A	29.2		<b>25.4</b>		
RV-A/HEV	RV-A	29.2		<b>27.3</b>		
RV-A/HEV	RV-A	29.6		<b>28.5</b>		
RV-A/HEV	RV-A	30.8		<b>27.8</b>		
RV-A/HEV	HEV	38.4		<b>28</b>		
RV-A/NV	NV	30.1			<b>23.6</b>	
HAsV/HEV	HAsV			28		<b>23.2</b>
NV/HEV/ HAdV	NV		34.1	28.4	<b>20.7</b>	
NTC <sup>c</sup>		36.4	44.5	33.7	33.7	29.9

<sup>a</sup> RV-A, rotavirus group A; HAdV, human adenovirus; HEV, human enterovirus; NV, Norwalk virus; HAsV, human astrovirus. Single-infection samples were used as positive controls. Lower  $C_T$  values are shown in bold.

<sup>b</sup> NV is detected at the genus level as calicivirus.

<sup>c</sup> NTC, nontemplate control.

material in selected samples with mixed infection was quantified by real-time RT-PCR. The use of equal quantities of starting material allowed us to compare directly the amplification  $C_T$ s of two viruses within a sample. The results showed that the single virus detected by microarray had, in most cases, a lower  $C_T$  value than the second virus detected by quantitative RT-PCR (qRT-PCR), with the only exception being the combination RV-A/HEV, where RV-A was the only virus identified by microarray despite the fact that HEV had lower  $C_T$  values (Table 2). This indicates that MI presenting large differences in the amounts of the genetic material of the viral agents involved are prone to result in single-virus detection by the microarray (generally detecting the one present more abundantly).

Consequently, when comparing the sensitivity and specificity of the microarray with the panel of individual diagnostic RT-PCRs, the most prevalent or most frequently found viruses in single infections, such as RV-A, HAsV, and CV, showed good sensitivity and specificity (from 85 to 100%), while the sensitivity for viruses such as HAdV and HEV was low, ranging from 30 to 42%, clearly being affected by other viruses present in the sample (Fig. 3; Table 2). For example, 4 samples that presented only HAdV were found positive by both microarray and RT-PCR, while in the remaining 9 samples, which presented HAdV coinfection with RV-A (8 samples) and CV (one sample), only the second virus was identified by microarray (Table 2). It should be pointed out that most of these samples contained a low level of

HAdV genetic material, with  $C_T$  values close to the nontemplate control value (44.5) (Table 2).

**Detection of uncommon GI viruses.** Of note, the microarray found 3 viruses that usually are not evaluated in gastroenteritis samples. Two samples presented HPeV, both in coinfection (one with RV-A/TTV and another with SV/HEV B/TTV). An additional sample containing HBoV was identified (RV-A was identified by RT-PCR in this sample), and 12 samples presented TTV, 5 samples as single infection and 7 in coinfection with other viruses. As reference samples for these viruses were not available, confirmation RT-PCR coupled with capillary sequencing was performed, and the viruses detected by the microarray were confirmed in all these samples (results not shown). The fact that single TTV-positive samples were found is not an indicator of causation.

## DISCUSSION

Current routine viral testing is designed to detect only the most prevalent viruses, frequently leaving 30 to 50% of cases without an agent identified (52). In recent years, advances in molecular biology and the implementation of next-generation sequencing has allowed the identification of several new viruses in intestinal samples (53, 54, 55, 56, 57). The roles of most of these viruses (*Aichi virus*, *Anellovirus*, *Human bocavirus*, *Human parechovirus*, *Human picobirnavirus*, and some enteroviruses, among others) in diarrheal disease remains unclear, raising the need to study in detail their epidemiology. In order to gather information on GI virus diversity, proper tools are required for their monitoring. In this work, a comprehensive and sensitive DNA microarray was developed and tested, which allows in principle the parallel detection of more than 100 gastrointestinal tract-associated virus species.

Implementation of a microarray for detection of viruses is not an easy task. Design of probes and experimental conditions are two important parameters to consider. Resequencing microarrays permit identification of mutations but require high numbers of probes for a single agent, increasing the cost (58). Arrays for subtyping use fewer and shorter probes but are often designed for only one viral species (59, 60, 61, 62, 63). Microarrays used for virus discovery have proven to be very useful when usual suspects are discarded or in cases of rare diseases, but identification is not clear and requires complex analysis (34).

Several DNA microarrays have been previously reported for identification of the main known gastrointestinal pathogenic viruses (59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75); however, they were oriented mostly to the identification or subtyping of one viral species, and none had specifically addressed the list of viruses that can be found in stool samples.

The microarray platform described in this work has been validated with 14 reference viral strains, representing 10 different virus species. Importantly, 5 other viral species were identified using the microarray when analyzing clinical samples: HAdV-F, HAdV-A, HPeV, HBoV, and several TTVs. The capacity of the microarray to correctly identify viruses whose probes were not validated in this work with cultured reference strains confirms that the methodology used to design probes is adequate and increases the probability that the remaining probes will be also capable to identify their target viruses, and this is additionally supported by *in silico* detection of a wide variety of RV-A strains using probes obtained from conserved genes; however, testing with other reference strains would be necessary. During the validation experiments, some probes were found to react nonspecifically

with the amplified labeled DNA, regardless of its origin; in other words, they were found to be “sticky,” and they were excluded from further analysis. No common characteristic was found between these probes that could account for their nonspecific binding behavior.

One of the critical parameters in virus detection is the sensitivity of the assay. There are several factors that can affect the sensitivity. In the case of a microarray, sample nucleic acids are generally processed by random-primed amplification prior to hybridization to ensure amplification of a wide variety of viruses. The product of random PCR could be lower than that of specific PCR, decreasing the sensitivity of the assay, as all genetic material is amplified, diluting the positive signal (76). The limit of detection for three viruses with different genome types (dsDNA, dsRNA, and ssRNA+) was established at  $10^3$  virus particles, suggesting that the nature of the genome does not affect the sensitivity of the assay. Moreover, testing the sensitivity of the microarray with purified RV-A RNA, we observed that addition of 50 ng of cellular RNA as a nonspecific diluting RNA decreased the sensitivity of detection 10-fold. To try to solve the sensitivity problem in complex clinical samples, agent-specific primers have been included in previous studies, together with random primers during amplification of the genetic material (14, 15), with the disadvantage of narrowing the scope of targets for the microarray assay.

We subsequently analyzed a group of clinical samples collected from children with diarrhea. Initially, the clinical samples were screened by SDS-PAGE, which led to the identification of 34 RV-A-positive samples, while the microarray presented in this work identified 44, suggesting that the microarray platform has a higher sensitivity than traditional methods. A similar sensitivity was obtained by RT-PCR, as 42 samples were found to be RV-A positive. Even though our results indicate that the limit of detection of purified virus ( $1 \times 10^3$  viral particles) is similar to that reached with PCR assays (8), the microarray had a higher number of positive results when clinical samples were tested, possibly due to the natural genetic variation in primer binding regions of viruses found in sample viruses.

Although multiplexed assays are being developed, their use in routine testing is not generally implemented, and most studies use single-pathogen tests. When RT-PCR screening for the most common viruses is performed, the percentage of clinical samples without a virus identified remains around 30 to 50% (13, 77, 78), while the microarray presented in this study detected a virus in 92% of the samples. This high detection rate could have been influenced by the time of sampling, since winter is a high season for viral gastroenteritis in the region and no preselection for pathogens was performed. An additional advantage of the microarray test compared to a set of different RT-PCR assays is the capacity to identify viruses that are not commonly tested for, such as those previously associated with diarrhea (like HPeV) and those of unclear clinical significance in GI disease (HBoV and TTV). In this work we found a wide range of circulating atypical viruses among children, similarly as observed in other studies (79, 80), and their continuous surveillance should be considered. To our knowledge, this is first report of HPeV, HBoV, and TTV in Mexican children.

As a consequence of the limited number of virus species routinely tested, the prevalence of coinfections is a poorly explored issue. Usually, when a panel of up to 5 viruses is used, coinfection rates of between 4 and 18% are observed, with the most common combination being RV-A/NV (2, 13, 77, 81, 82, 83). More re-

cently, wide-ranging metagenomic studies have shown that mixed infections are more common than previously thought (4, 80), even in healthy individuals (79). The analysis of the small set of clinical samples in this work showed that 30% (23 out of 76) contained more than 1 gastrointestinal virus. The identification of individual viruses in coinfections presented some discrepancies when comparing the results from microarray and RT-PCR tests. Of seven samples with mixed infections identified by the microarray, five were confirmed by RT-PCR, while in 16 mixed infections identified by RT-PCR, a single virus was identified by the microarray, suggesting that the microarray may be less sensitive than RT-PCR for detection of mixed infections. To address this inconsistency, real-time RT-PCR was implemented for the principal combinations of viruses that were missed by the microarray. This platform showed a certain advantage for detection of RV-A over HAdV and HEV, as RV-A was identified even when the HEV genome was present in larger amounts. HEV was identified by the microarray in samples coinfecting with RV-A only when RV-A RNA was present in small amounts, close to negative-control levels (Table 2). Preferential identification of RV-A by the microarray could be due to the large amount of virus particles excreted during the acute phase of infection and to the large number of probes selected (42 oligonucleotides, compared to 5 and 17 probes for HEV A and HEV C, respectively, and 17 probes for HAdV). On the other hand, the two HEV samples positive by microarray that were missed by RT-PCR correspond to mixed infections with HAdV/TTV and SV/HpeV/TTV, respectively. Several attempts to identify HEV in these samples by RT-PCR resulted in negative results, and thus the possibility of a microarray false-positive result cannot be discarded.

The number of virus species identified has increased considerably in the last decade with the application of emerging genomic technologies such as microarrays and unbiased next-generation sequencing in studies of fatal or rare cases of disease in humans and in wild and domestic animals (25, 56, 84, 85, 86). Adequate tools that allow detection of well-known pathogenic viruses while being capable of detecting the new or rare viruses in a single assay will contribute useful epidemiological information about both kinds of viruses. This microarray includes viruses of different host origins in order to extend the range of use to veterinary studies. The oligonucleotide probes selected should allow the identification of target viruses despite the sequence variations that will occur in the future; however, it will be important to update the microarray design on a regular basis to maintain the capacity to broadly detect pathogenic viruses and to include newly found viral species.

Parallel detection of gastroenteric viruses beyond the most common viruses should facilitate a better understanding of virus etiology, as it increases the rate of positive cases, closing the diagnostic gap, and allows inspection for mixed infections where secondary viral agents could represent an important factor. Adding data from case-control studies and inclusion of other host parameters, such as serological data, will help to provide evidence of virus pathogenicity. Furthermore, adequate and comprehensive epidemiological studies in wild and domestic animals should be considered.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The computational analysis was performed using the cluster of the Instituto de Biotecnología, UNAM, with the assistance of M. C. Jerome Ver-

Ieyen. We thank Paul Gaytán Colín, Eugenio López-Bustos, and Santiago Becerra Ramírez from Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, Instituto de Biotecnología, UNAM, for synthesis of the oligonucleotides used in RT-PCR assays.

This work was supported by grant S0008-111593 from CONACYT. Miguel A. Martínez and María de los Dolores Soto-del Río were supported by a scholarship from CONACYT-Mexico.

## REFERENCES

- WHO. 2011. World health statistics 2011. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Simpson VR. 2002. Wild animals as reservoirs of infectious diseases in the UK. *Vet J* 163:128–146. <http://dx.doi.org/10.1053/tvjl.2001.0662>.
- Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 9:247–262. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00560.x>.
- Rovida F, Campanini G, Sarasini A, Adzasehoun KM, Piralla A, Baldanti F. 2013. Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75:110–111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.09.016>.
- Allard A, Albinsson B, Wadell G. 2001. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 39:498–505. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.2.498-505.2001>.
- Farkas T, Zhong WM, Jing Y, Huang PW, Espinosa SM, Martinez N, Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK, Jiang X. 2004. Genetic diversity among sapoviruses. *Arch Virol* 149:1309–1323. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-004-0296-9>.
- Royuela E, Negro A, Sanchez-Fauquier A. 2006. Development of a one step real-time RT-PCR method for sensitive detection of human astrovirus. *J Virol Methods* 133:14–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.10.012>.
- Schwarz BA, Bange R, Vahlenkamp TW, Johne R, Muller H. 2002. Detection and quantitation of group A rotaviruses by competitive and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 105:277–285. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00118-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00118-0).
- Coupland LJ, McElarny I, Meader E, Cowley K, Alcock L, Naunton J, Gray J. 2013. Simultaneous detection of viral and bacterial enteric pathogens using the Seeplex(R) Diarrhea ACE detection system. *Epidemiol Infect* 141:2111–2121. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268812002622>.
- Khamrin P, Okame M, Thongprachum A, Nantachit N, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. 2011. A single-tube multiplex PCR for rapid detection in feces of 10 viruses causing diarrhea. *J Virol Methods* 173:390–393. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.012>.
- Rohayem J, Berger S, Juretzek T, Herchenroder O, Mogel M, Poppe M, Henker J, Rethwilm A. 2004. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect norovirus, astrovirus and adenovirus in clinical stool samples. *J Virol Methods* 118:49–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.01.016>.
- Svraka S, van der Veer B, Duizer E, Dekkers J, Koopmans M, Vennema H. 2009. Novel approach for detection of enteric viruses to enable syndrome surveillance of acute viral gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 47:1674–1679. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00307-09>.
- van Maarseveen NM, Wessels E, de Brouwer CS, Vossen AC, Claas EC. 2010. Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of adenovirus group F, astrovirus, rotavirus group A, norovirus genogroups I and II, and sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays. *J Clin Virol* 49:205–210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2010.07.019>.
- Palacios G, Quan PL, Jabado OJ, Conlan S, Hirschberg DL, Liu Y, Zhai J, Renwick N, Hui J, Hegyi H, Grolla A, Strong JE, Towner JS, Geisbert TW, Jahrling PB, Buchen-Osmond C, Ellerbrok H, Sanchez-Seco MP, Lussier Y, Formenty P, Nichol MS, Feldmann H, Briese T, Lipkin WI. 2007. Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 13:73–81. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1301.060837>.
- Quan PL, Palacios G, Jabado OJ, Conlan S, Hirschberg DL, Pozo F, Jack PJ, Cisterna D, Renwick N, Hui J, Drysdale A, Amos-Ritchie R, Baumeister E, Savy V, Langer KM, Rucht JA, Boyle DB, Garcia-Sastre A, Casas I, Perez-Brena P, Briese T, Lipkin WI. 2007. Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by GreeneChipResp oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol* 45:2359–2364. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00737-07>.
- Sengupta S, Onodera K, Lai A, Melcher U. 2003. Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol* 41:4542–4550. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.10.4542-4550.2003>.
- Xiao-Ping K, Yong-Qiang L, Qing-Ge S, Hong L, Qing-Yu Z, Yin-Hui Y. 2009. Development of a consensus microarray method for identification of some highly pathogenic viruses. *J Med Virol* 81:1945–1950. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21602>.
- Striebel HM, Birch-Hirschfeld E, Egerer R, Foldes-Papp Z, Tilz GP, Stelzner A. 2004. Enhancing sensitivity of human herpes virus diagnosis with DNA microarrays using dendrimers. *Exp Mol Pathol* 77:89–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2004.05.004>.
- Zhaohui S, Wenling Z, Bao Z, Rong S, Wenli M. 2004. Microarrays for the detection of HBV and HDV. *J Biochem Mol Biol* 37:546–551. <http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2004.37.5.546>.
- Boriskin YS, Rice PS, Stabler RA, Hinds J, Al-Ghusein H, Vass K, Butcher PD. 2004. DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous system infection. *J Clin Microbiol* 42:5811–5818. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.12.5811-5818.2004>.
- Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, Avila PC, Boushey HA, Ganem D, DeRisi JL. 2002. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15687–15692. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.242579699>.
- Holtz LR, Finkbeiner SR, Zhao G, Kirkwood CD, Girones R, Pipas JM, Wang D. 2009. Klassevirus 1, a previously undescribed member of the family Picornaviridae, is globally widespread. *Virol J* 6:86. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-6-86>.
- Jones MS, II, Harrach B, Ganac RD, Gozum MM, Dela Cruz WP, Riedel B, Pan C, Delwart EL, Schnurr DP. 2007. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol* 81:5978–5984. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02650-06>.
- Kapoor A, Victoria J, Simmonds P, Wang C, Shafer RW, Nims R, Nielsen O, Delwart E. 2008. A highly divergent picornavirus in a marine mammal. *J Virol* 82:311–320. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01240-07>.
- Li L, Victoria J, Kapoor A, Blinkova O, Wang C, Babrzadeh F, Mason CJ, Pandey P, Triki H, Bahri O, Oderinde BS, Baba MM, Bukbuk DN, Besses JM, Bartkus JM, Delwart EL. 2009. A novel picornavirus associated with gastroenteritis. *J Virol* 83:12002–12006. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01241-09>.
- Rockett RJ, Sloots TP, Bowes S, O'Neill N, Ye S, Robson J, Whitley DM, Lambert SB, Wang D, Nissen MD, Bialasiewicz S. 2013. Detection of novel polyomaviruses, TSPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9 and MWPyV in feces, urine, blood, respiratory swabs and cerebrospinal fluid. *PLoS One* 8:e62764. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0062764>.
- Zarate S, Espinosa R, Romero P, Guerrero CA, Arias CF, Lopez S. 2000. Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology* 278:50–54. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2000.0660>.
- Li W, Godzik A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22:1658–1659. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>.
- Paulin LF, Soto-Del Rio Mde L, Sanchez I, Hernandez J, Gutierrez-Rios RM, Lopez-Martinez I, Wong-Chew RM, Parissi-Crivelli A, Isa P, Lopez S, Arias CF. 2014. PhyloFlu, a DNA microarray for determining the phylogenetic origin of influenza A virus gene segments and the genomic fingerprint of viral strains. *J Clin Microbiol* 52:803–813. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03134-13>.
- He Z, Wu L, Fields MW, Zhou J. 2005. Use of microarrays with different probe sizes for monitoring gene expression. *Appl Environ Microbiol* 71:5154–5162. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.9.5154-5162.2005>.
- Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR, Kobayashi S, Davis C, Dai H, He YD, Stephanian SB, Cavet G, Walker WL, West A, Cofrey E, Shoemaker DD, Stoughton R, Blanchard AP, Friend SH, Linsey PS. 2001. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol* 19:342–347. <http://dx.doi.org/10.1038/86730>.
- Wang HY, Malek RL, Kwitek AE, Greene AS, Luu TV, Behbahani B, Frank B, Quackenbush J, Lee NH. 2003. Assessing unmodified 70-mer oligonucleotide probe performance on glass-slide microarrays. *Genome Biol* 4:R5. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2003-4-1-r5>.
- SantaLucia J, Jr. 1998. A unified view of polymer, dumbbell, and oligo-

- nucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:1460–1465. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.4.1460>.
34. Urisman A, Fischer KF, Chiu CY, Kistler AL, Beck S, Wang D, DeRisi JL. 2005. E-Predict: a computational strategy for species identification based on observed DNA microarray hybridization patterns. *Genome Biol* 6:R78. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2005-6-9-r78>.
  35. Bohlander SK, Espinosa R, III, Le Beau MM, Rowley JD, Diaz MO. 1992. A method for the rapid sequence-independent amplification of microdissected chromosomal material. *Genomics* 13:1322–1324. [http://dx.doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90057-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0888-7543(92)90057-Y).
  36. Chen EC, Miller SA, DeRisi JL, Chiu CY. 27 April 2011. Using a pan-viral microarray assay (Virochip) to screen clinical samples for viral pathogens. *J Vis Exp* <http://dx.doi.org/10.3791/2536>.
  37. Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P. 2004. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett* 573:83–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.055>.
  38. Strimmer K. 2008. fdrtool: a versatile R package for estimating local and tail area-based false discovery rates. *Bioinformatics* 24:1461–1462. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btn209>.
  39. R Core Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
  40. Teo J, Di Pietro P, San Biagio F, Capozzoli M, Deng YM, Barr I, Caldwell N, Ong KL, Sato M, Tan R, Lin R. 2011. VereFlu: an integrated multiplex RT-PCR and microarray assay for rapid detection and identification of human influenza A and B viruses using lab-on-chip technology. *Arch Virol* 156:1371–1378. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-011-0999-7>.
  41. Rotbart HA. 1990. Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. *J Clin Microbiol* 28:438–442.
  42. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12891–12896. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0504666102>.
  43. Nielsen AC, Gyhrs ML, Nielsen LP, Pedersen C, Bottiger B. 2013. Gastroenteritis and the novel picornaviruses aichi virus, cosavirus, saffold virus, and salivirus in young children. *J Clin Virol* 57:239–242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.03.015>.
  44. Greninger AL, Runckel C, Chiu CY, Haggerty T, Parsonnet J, Ganem D, DeRisi JL. 2009. The complete genome of klassevirus—a novel picornavirus in pediatric stool. *Virol J* 6:82. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-6-82>.
  45. Biagini P, Uch R, Belhouchet M, Attoui H, Cantaloube JF, Brisbarre N, de Micco P. 2007. Circular genomes related to anelloviruses identified in human and animal samples by using a combined rolling-circle amplification/sequence-independent single primer amplification approach. *J Gen Virol* 88:2696–2701. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.83071-0>.
  46. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Fukai K, Muramatsu U, Naito Y, Yoshikawa A. 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *J Gen Virol* 83:1291–1297.
  47. Chu DK, Poon LL, Guan Y, Peiris JS. 2008. Novel astroviruses in insectivorous bats. *J Virol* 82:9107–9114. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00857-08>.
  48. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. 2008. Bovine kobuviruses from cattle with diarrhea. *Emerg Infect Dis* 14:985–986. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1406.070784>.
  49. Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, Graham DY. 2008. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis* 14:1553–1557. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1410.080117>.
  50. Lee N, Chan MC, Wong B, Choi KW, Sin W, Lui G, Chan PK, Lai RW, Cockram CS, Sung JJ, Leung WK. 2007. Fecal viral concentration and diarrhea in norovirus gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 13:1399–1401. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1309.061535>.
  51. Ramani S, Sankaran P, Arumugam R, Sarkar R, Banerjee I, Mohanty I, Jana AK, Kuruvilla KA, Kang G. 2010. Comparison of viral load and duration of virus shedding in symptomatic and asymptomatic neonatal rotavirus infections. *J Med Virol* 82:1803–1807. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21872>.
  52. Dennehy PH. 2011. Viral gastroenteritis in children. *Pediatr Infect Dis J* 30:63–64. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e3182059102>.
  53. Breitbart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, Nulton J, Salamon P, Rohwer F. 2003. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J Bacteriol* 185:6220–6223. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.185.20.6220-6223.2003>.
  54. Finkbeiner SR, Allred AF, Tarr PI, Klein EJ, Kirkwood CD, Wang D. 2008. Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery. *PLoS Pathog* 4:e1000011. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000011>.
  55. Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly FE, Heath AC, Rohwer F, Gordon JI. 2010. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 466:334–338. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09199>.
  56. Victoria JG, Kapoor A, Li L, Blinkova O, Slikas B, Wang C, Naeem A, Zaidi S, Delwart E. 2009. Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. *J Virol* 83:4642–4651. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02301-08>.
  57. Zhang T, Breitbart M, Lee WH, Run JQ, Wei CL, Soh SW, Hibberd ML, Liu ET, Rohwer F, Ruan Y. 2006. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol* 4:e3. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0040003>.
  58. Lin B, Blaney KM, Malanoski AP, Ligler AG, Schnur JM, Metzgar D, Russell KL, Stenger DA. 2007. Using a resequencing microarray as a multiple respiratory pathogen detection assay. *J Clin Microbiol* 45:443–452. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01870-06>.
  59. Brinkman NE, Fout GS. 2009. Development and evaluation of a generic tag array to detect and genotype noroviruses in water. *J Virol Methods* 156:8–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.03.010>.
  60. Brown DW, Gunning KB, Henry DM, Awdeh ZL, Brinker JP, Tzipori S, Herrmann JE. 2008. A DNA oligonucleotide microarray for detecting human astrovirus serotypes. *J Virol Methods* 147:86–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.07.028>.
  61. Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, Hoshino Y, Kapikian AZ, Chumakov K. 2002. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol* 40:2398–2407. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.7.2398-2407.2002>.
  62. Lovmar L, Fock C, Espinoza F, Bucardo F, Syvanen AC, Bondeson K. 2003. Microarrays for genotyping human group A rotavirus by multiplex capture and type-specific primer extension. *J Clin Microbiol* 41:5153–5158. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.11.5153-5158.2003>.
  63. Vinje J, Koopmans MP. 2000. Simultaneous detection and genotyping of “Norwalk-like viruses” by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol* 38:2595–2601.
  64. Ayodeji M, Kulka M, Jackson SA, Patel I, Mammel M, Cebula TA, Goswami BB. 2009. A microarray based approach for the identification of common foodborne viruses. *Open Virol J* 3:7–20. <http://dx.doi.org/10.2174/1874357900903010007>.
  65. Chen H, Mammel M, Kulka M, Patel I, Jackson S, Goswami BB. 2011. Detection and identification of common food-borne viruses with a tiling microarray. *Open Virol J* 5:52–59. <http://dx.doi.org/10.2174/1874357901105010052>.
  66. Chen Q, Li J, Deng Z, Xiong W, Wang Q, Hu YQ. 2010. Comprehensive detection and identification of seven animal coronaviruses and human respiratory coronavirus 229E with a microarray hybridization assay. *Intervirology* 53:95–104. <http://dx.doi.org/10.1159/000264199>.
  67. Honma S, Chizhikov V, Santos N, Tatsumi M, Timenetsky Mdo C, Linhares AC, Mascarenhas JD, Ushijima H, Armah GE, Gentsch JR, Hoshino Y. 2007. Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], and P[14]) and VP7 (G1 to G6, G8 to G10, and G12) genes. *J Clin Microbiol* 45:2641–2648. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00736-07>.
  68. Jaaskelainen A, Piiparinen H, Lappalainen M, Koskiniemi M, Vaheri A. 2006. Multiplex-PCR and oligonucleotide microarray for detection of eight different herpesviruses from clinical specimens. *J Clin Virol* 37:83–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2006.05.010>.
  69. Kim JM, Kim SY, Park YB, Kim HJ, Min BS, Cho JC, Yang JM, Cho YH, Ko G. 2012. Simultaneous detection of major enteric viruses using a combimatrix microarray. *J Microbiol* 50:970–977. <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-012-2228-9>.
  70. Belblanc N, Gantelius J, Schwenk JM, Stahl K, Blomberg J, Andersson-Svahn H, Belak S. 2009. Development of a magnetic bead microarray for simultaneous and simple detection of four pestiviruses. *J Virol Methods* 155:1–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.04.010>.
  71. Lin B, Vora GJ, Thach D, Walter E, Metzgar D, Tibbetts C, Stenger DA. 2004. Use of oligonucleotide microarrays for rapid detection and serotyp-

- ing of acute respiratory disease-associated adenoviruses. *J Clin Microbiol* 42:3232–3239. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.7.3232-3239.2004>.
72. Lopez-Campos G, Coiras M, Sanchez-Merino JP, Lopez-Huertas MR, Spiteri I, Martin-Sanchez F, Perez-Brena P. 2007. Oligonucleotide microarray design for detection and serotyping of human respiratory adenoviruses by using a virtual amplicon retrieval software. *J Virol Methods* 145:127–136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.05.018>.
  73. Mattison K, Corneau N, Berg I, Bosch A, Duizer E, Gutierrez-Aguirre I, L'Homme Y, Lucero Y, Luo Z, Martyres A, Myrmet M, O'Ryan M, Pagotto F, Sano D, Svraka S, Urzua U, Bidawid S. 2011. Development and validation of a microarray for the confirmation and typing of norovirus RT-PCR products. *J Virol Methods* 173:233–250. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.011>.
  74. Shih SR, Wang YW, Chen GW, Chang LY, Lin TY, Tseng MC, Chiang C, Tsao KC, Huang CG, Shio MR, Tai JH, Wang SH, Kuo RL, Liu WT. 2003. Serotype-specific detection of enterovirus 71 in clinical specimens by DNA microchip array. *J Virol Methods* 111:55–60. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(03\)00151-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(03)00151-4).
  75. Susi P, Hattara L, Waris M, Luoma-Aho T, Siitari H, Hyypia T, Saviranta P. 2009. Typing of enteroviruses by use of microwell oligonucleotide arrays. *J Clin Microbiol* 47:1863–1870. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02226-08>.
  76. Vora GJ, Meador CE, Stenger DA, Andreadis JD. 2004. Nucleic acid amplification strategies for DNA microarray-based pathogen detection. *Appl Environ Microbiol* 70:3047–3054. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.5.3047-3054.2004>.
  77. Pang XL, Preiksaitis JK, Lee BE. 2014. Enhanced enteric virus detection in sporadic gastroenteritis using a multi-target real-time PCR panel: a one-year study. *J Med Virol* 86:1594–1601. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.23851>.
  78. Simpson R, Aliyu S, Iturriza-Gomara M, Desselberger U, Gray J. 2003. Infantile viral gastroenteritis: on the way to closing the diagnostic gap. *J Med Virol* 70:258–262. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.10386>.
  79. Kapusinszky B, Minor P, Delwart E. 2012. Nearly constant shedding of diverse enteric viruses by two healthy infants. *J Clin Microbiol* 50:3427–3434. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01589-12>.
  80. Mitui MT, Bozdayi G, Ahmed S, Matsumoto T, Nishizono A, Ahmed K. 2014. Detection and molecular characterization of diarrhea causing viruses in single and mixed infections in children: a comparative study between Bangladesh and Turkey. *J Med Virol* 86:1159–1168. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.23744>.
  81. Koh H, Baek SY, Shin JI, Chung KS, Jee YM. 2008. Coinfection of viral agents in Korean children with acute watery diarrhea. *J Korean Med Sci* 23:937–940. <http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2008.23.6.937>.
  82. Roman E, Wilhelmi I, Colomina J, Villar J, Cilleruelo ML, Nebreda V, Del Alamo M, Sanchez-Fauquier A. 2003. Acute viral gastroenteritis: proportion and clinical relevance of multiple infections in Spanish children. *J Med Microbiol* 52:435–440. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.05079-0>.
  83. Tran A, Talmud D, Lejeune B, Jovenin N, Renois F, Payan C, Leveque N, Andreoletti L. 2010. Prevalence of rotavirus, adenovirus, norovirus, and astrovirus infections and coinfections among hospitalized children in northern France. *J Clin Microbiol* 48:1943–1946. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02181-09>.
  84. Belak S, Karlsson OE, Blomstrom AL, Berg M, Granberg F. 2013. New viruses in veterinary medicine, detected by metagenomic approaches. *Vet Microbiol* 165:95–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.022>.
  85. Bodewes R, Kik MJ, Raj VS, Schapendonk CM, Haagmans BL, Smits SL, Osterhaus AD. 2013. Detection of novel divergent arenaviruses in boid snakes with inclusion body disease in The Netherlands. *J Gen Virol* 94:1206–1210. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.051995-0>.
  86. Bodewes R, van de Bildt MW, Schapendonk CM, van Leeuwen M, van Boheemen S, de Jong AA, Osterhaus AD, Smits SL, Kuiken T. 2013. Identification and characterization of a novel adenovirus in the cloacal bursa of gulls. *Virology* 440:84–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.02.011>.

## **Anexo 2. Material suplementario del artículo**

Supplementary Table 1. Primers used in diagnostic and real-time RT-PCR and PCR

Virus species	primer ID	Sequence 5'-3'	Application	Conc.
Human Astrovirus	F-AST	ACRACATGTGCTGCTGTTACT	RT-PCR	10 uM
	R-AST	ACYAGATTCGAGATCCGTGA	RT-PCR	10 uM
	ORF1bG-F	ATGAATTATTTTGATACTGAGGAAGACTTGGAA	qRT-PCR	100 nM
	ORF1bG-R	CTTTCTTGAGAAATAGATACCAAAGTACTTCAG	qRT-PCR	100 nM
Human Adenovirus	hex1deg	GCCSCARTGGKCWACATGCACAT	PCR and qPCR	120 nM
	hex2deg	CAGCACSCCICGRATGTCAAA	PCR	120 nM
	AQ1	GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT	qPCR	120 nM
Calicivirus	p290	GATTACTCCARGTGGGAYTCMAC	PCR	10 uM
	p289	TGACRATKTMATCATMCMCRTA	RT-PCR	10 uM
Norwalk virus	JV12Y	ATACCACTATGATGCAGATTA	qRT-PCR	300 nM
	JV13I	TCATCATCACCATAGAAAGAG	qRT-PCR	300 nM
Human Enterovirus	5'UTR-F	CGGCCCTGAATGCGGCTAA	RT-PCR and qRT-PCR	900 nM
	5'UTR-R	ATTGTCACCATAAGCAGCC	RT-PCR and qRT-PCR	900 nM
Rotavirus A	P1-VP6	AAGTAGCTGGATTTGATTATTC	RT-PCR	10 uM
	P2-VP6	GACTCACAAACTGCAGATTCAA	RT-PCR	10 uM
	F-gene10	TCCTGGAATGGCGTATTTTC	qRT-PCR	100 nM
	R-gene10	GAGCAATCTTCATGGTTGGAA	qRT-PCR	100 nM
Human Parechovirus	parechoF12	CCARAAYTCITGGGGYTC	RT-PCR	400 nM
	parechoR12	AAICCYCTRTCYARRTAWGC	RT-PCR	400 nM
Anellovirus	NG779	ACWKMCGAATGGCTGAGTTT	RT-PCR	200 nM
	NG780	RGTGRCGAATGGYWGAGTTT	RT-PCR	200 nM
	NG781	CCCKWGCCCCGARTTGCCCCT	RT-PCR	200 nM
	NG782	AYCTWGCCCGAATTGCCCT	RT-PCR	200 nM
	NG785	CCCCTTGACTBCGGTGTGTAA	RT-PCR	200 nM
	NG792	TTTATGCGYCYAGACGRAGA	RT-PCR	200 nM
	NG793	TTTAYCMYGCCAGACGGAGA	RT-PCR	200 nM
	NG794	TTTATGCCGCCAGACGRAGG	RT-PCR	200 nM
	NG791	CTCACCTYSGGCWCCCGCCC	RT-PCR	200 nM



Supplementary Table 2. Viral species included in microarray.

Family/Subfamily <sup>a</sup>	Genus	Species	Number of Probes	
Adenoviridae	Atadenovirus	Bovine adenovirus D	8	
		Mastadenovirus	Bovine adenovirus C	6
			Canine adenovirus	13
			Human adenovirus A	18
			Human adenovirus B	10
			Human adenovirus C	13
			Human adenovirus E	7
			Human adenovirus F	17
			Human adenovirus G	16
			Ovine adenovirus A	8
			Porcine adenovirus A	8
			Porcine adenovirus B	8
			Porcine adenovirus C	10
	Herpesviridae/Alphaherpesvirinae	Simplexvirus	Human herpesvirus 1	8
Human herpesvirus 2			7	
Varicellovirus		Human herpesvirus 3	7	
		Phocid herpesvirus 1	12	
Anelloviridae	Alphatorquevirus	Torque teno virus	21	
	Betatorquevirus	Torque teno mini virus	10	
	Deltatorquevirus	Torque teno tupaia virus	12	
	Epsilontorquevirus	Torque teno tamarin virus	6	
	Etatorquevirus	Torque teno felis virus	7	
	Gammatorquevirus	Torque teno midi virus	6	
	Iotatorquevirus	Torque teno sus virus	6	
	Lambdatorquevirus	Torque teno zalophus virus	6	
	Thetatorquevirus	Torque teno canis virus	4	
Zetatorquevirus	Torque teno douroucouli virus	6		
Arenaviridae	Arenavirus	Guanarito virus	5	
		Junin virus	12	
		Lymphocytic choriomeningitis virus	15	
		Machupo virus	17	

Astroviridae	Avastrovirus	Chicken astrovirus	11	
		Duck astrovirus	6	
		Turkey astrovirus	6	
	Mamastrovirus	Bat astrovirus	6	
		Mamastrovirus 1	4	
		Mamastrovirus 2	6	
		Mink astrovirus	6	
		Ovine astrovirus	4	
		Porcine astrovirus	5	
Herpesviridae/Betaherpesvirinae	Cytomegalovirus	Human herpesvirus 5	8	
	Roseolovirus	Human herpesvirus 6	6	
Caliciviridae	Lagovirus	European brown hare syndrome virus	6	
		Rabbit hemorrhagic disease virus	8	
	Norovirus	Bovine enteric calicivirus	10	
		Norwalk virus	12	
		Sapporo virus	14	
	Vesivirus	Feline calicivirus	22	
		Rabbit vesivirus	6	
	Circoviridae	Circovirus	Beak and feather disease virus	5
Canary circovirus			4	
Porcine circovirus 1			5	
Porcine circovirus 2			2	
Gyrovirus			Chicken anemia virus	2
Coronaviridae	Alphacoronavirus	Alphacoronavirus 1	28	
		Porcine epidemic diarrhea virus	8	
	Betacoronavirus	Betacoronavirus 1	10	
		Human coronavirus HKU1	8	
		Murine coronavirus	7	
		SARS coronavirus	8	
	Gammacoronavirus	Avian coronavirus	13	
	Torovirus	Bovine torovirus	6	
		Equine torovirus	6	
		Human torovirus	9	
Porcine torovirus		8		
Flaviviridae	Flavivirus	Dengue virus	9	

		Japanese encephalitis virus	6
		West Nile virus	8
		Yellow fever virus	7
		Zika virus	11
	Hepacivirus	Hepatitis C virus	6
	Pestivirus	Border disease virus	16
		Bovine viral diarrhea virus 1	6
		Bovine viral diarrhea virus 2	18
		Classical swine fever virus	11
Herpesviridae/Gammaparvovirinae	Lymphocryptovirus	Human herpesvirus 4	7
	Rhadinovirus	Human herpesvirus 8	10
Hepeviridae	Hepevirus	Hepatitis E virus	10
Orthomyxoviridae	Influenzavirus A	Influenza A virus	18
	Influenzavirus B	Influenza B virus	22
	Influenzavirus C	Influenza C virus	12
Paramyxoviridae	Avulavirus	Newcastle disease virus	14
	Morbillivirus	Canine distemper virus	8
		Measles virus	12
		Peste-des-petits-ruminants-virus	8
		Phocine distemper virus	12
		Rinderpest virus	12
	Respirovirus	Bovine parainfluenza virus 3	9
Parvoviridae/Parvovirinae	Bocavirus	Bovine parvovirus	8
		Canine minute virus	6
		Human bocavirus	12
	Parvovirus	Canine parvovirus	2
		Feline panleukopenia virus	4
		Chicken parvovirus	4
		Minute virus of mice	4
		Porcine parvovirus	7
Picobirnaviridae	Picobirnavirus	Human picobirnavirus	11
		Rabbit picobirnavirus	6
Picornaviridae	Cardiovirus	Encephalomyocarditis virus	12
		Theilovirus	17
	Cosavirus	Cosavirus A	6

		Cosavirus B	8
		Cosavirus C	2
		Cosavirus D	8
	Enterovirus	Enterovirus A	5
		Enterovirus B	8
		Enterovirus C	17
		Enterovirus D	13
		Enterovirus E	16
		Enterovirus G	17
		Enterovirus H	9
	Hepatovirus	Hepatitis A virus	8
	Kobuvirus	Aichi virus	4
		Bovine kobuvirus	6
	Parechovirus	Human parechovirus	14
		Ljungan virus	13
	Salivirus	Salivirus A	10
	Sapelovirus	Porcine sapelovirus	16
	Teschovirus	Porcine teschovirus	6
Polyomaviridae	Polyomavirus	BK polyomavirus	8
		JC polyomavirus	3
Reoviridae	Orthoreovirus	Avian orthoreovirus	6
		Baboon orthoreovirus	8
		Mammalian orthoreovirus	25
		Nelson bay orthoreovirus	8
		Reptilian orthoreovirus	13
	Rotavirus	Rotavirus A	42
		Rotavirus B	8
		Rotavirus C	10

---

<sup>a</sup> clasification based on ICTV 2009 report

Supplementary Table 3 Probes selected for detection

PROBE_ID	SEQUENCE
BOVINE_ADENOVIRUS_D_PROBE01	AAGTATTGGGAGGAATCTGATACAAATTGTTAACAGCTCCCAAATAGTCTGCAAAATTTTGATCATTAGT
BOVINE_ADENOVIRUS_D_PROBE02	GAGTCAGAGAAGGTGAAGCGCCATTAAGGGATTGAAACAATTCATTATTAAGCTTTTCTCTGTACTT
BOVINE_ADENOVIRUS_D_PROBE03	CTTTAACTCTGTAAAGCTCCAACCTCTAAAAGCGCCCAAGATCTATCCGGAACATTAACAACAACCGT
BOVINE_ADENOVIRUS_D_PROBE04	TCCATCCTAATGGGTCAAATATGTACATTTTATAATATATAGGATCCCAAGCCATCGCAACCCAATGAAC
BOVINE_ADENOVIRUS_D_PROBE05	TAATAGTTTTATCAGGTAGCTGTTGGGTACATGAGGCATAAAATGGAGAATCCATCACAATATAGATTC
BOVINE_ADENOVIRUS_D_PROBE06	TGAAACAAAGCACTGGTGGGAGCAGATAAAGTTCAACCCAGTAGGTGCACTGGAATCCACAAAAAGGCTT
BOVINE_ADENOVIRUS_D_PROBE07	TTGTGATTGGATCAGTAAATTTAAGCGATAAAATCAAACCTTCACTTTCTAACCCATTTTCTGCTTGAAT
BOVINE_ADENOVIRUS_D_PROBE08	TCCTAGAATTAAGCTATGATAGTTGTGGCTGACTGTGAGCCTCCACATTAGAATACTTAGATGTGTTG
BOVINE_ADENOVIRUS_C_PROBE01	AAAAACCAGGAAAATGCTTGTCAATTTATGCCAAGAAAAACGGCCACAACCTAGATCAATAACAATGTG
BOVINE_ADENOVIRUS_C_PROBE02	AAGCGTGAAGAACATACAACAATATAAACACATGCTGCACTGTGGGGACTTTGCACACTCGTTATT
BOVINE_ADENOVIRUS_C_PROBE03	CGGAATTTAAAAATAAAGGGGCTTACCATAGTAATAATATTTGATTGTGTTTCTAACACTCCTTGTGT
BOVINE_ADENOVIRUS_C_PROBE04	TGTAGAGGAAGTTGATTGGCAAAAAGCCATGGATTTAGCGGTACAAAATTTTGCAACCTTTAAAGGTTGAT
BOVINE_ADENOVIRUS_C_PROBE05	CGCTTCTAGTGTTCACCCGTGACACGTAATGTCTCCGGTGTGAGAGTTAAGGAACCGGTTTCATA
BOVINE_ADENOVIRUS_C_PROBE06	TTCCATGTCGGGCGGCCGCTAATTGTTGAAAAACATTTGATTGACCGGATCCCTAAGCTTTTGGCCCTAC
CANINE_ADENOVIRUS_PROBE01	AGCGCAACAGCCAAAAATAGGACCCACATGGGGGTCAAAGTGTTTTCCACCGCTCAAAGGTGGTCCG
CANINE_ADENOVIRUS_PROBE02	TTTCTCTAAGCACAGCAACATGTCGTCAGAAATGCTAGCAGGAGAGGTGGGATGCGGTGGAATAGGTGA
CANINE_ADENOVIRUS_PROBE03	ATCCCGCCAGTTTCTGGCGGGAATGGAGATTGGCAGGTTAGTAGTGTGGCAGGGATGGGATAAAGCAT
CANINE_ADENOVIRUS_PROBE04	CATCAAAAAGATCGTAGGCGGCGAGGGGCTGCCATGAGAATACTACAGTCAAGGCAGTCCGG
CANINE_ADENOVIRUS_PROBE05	GCCACTCTCCAGTAGCTCTAAAACATAATCATGGAGATTGCGCGGCGCCGGCACAATAGTATATTTTAT
CANINE_ADENOVIRUS_PROBE06	TGCCCCAGGGCTTTTCTCCCCAAGTAGTGGTGGAGTTAATGTTTCTGTGGACATAAGCTGTCCAACTG
CANINE_ADENOVIRUS_PROBE07	AGTTGACAAAGGCATGCAAAAACATAACAACAAACAGTCCACAGGCGGCGCTATTGGGACCTGAATGGT
CANINE_ADENOVIRUS_PROBE08	GTGAAACCGGCGGAGTGGATAAAGGACTAAACCCAGAATCAGCCTCAGTGTCTGCACTCGAATCAGTGT
CANINE_ADENOVIRUS_PROBE09	GAGGGGTTGCCACCAAAGCTCCGCTCTGCACGGCAAGGCCGGCACCTACTTGCAGAGAAACAGAATTGTC
CANINE_ADENOVIRUS_PROBE10	TAAAAGCAGTCTGGCTTTAATTGCAGCGGCGTGGGCGGAAAGTAAGCAGAGTGTTTTTCCAAAACCTT
CANINE_ADENOVIRUS_PROBE11	CTTCATCATCTTCCCTCAGCTCCAGCCGAAGCGGGTTCTGAACGTACAGGCATAGCAAAAAGGCATTC
CANINE_ADENOVIRUS_PROBE12	GTGGCTTCAAAGCAAATCCAAAGGTTCTGTTTGTCTAGGCTCTGGCACGCAAGGGCGTTTGTGACCCC
CANINE_ADENOVIRUS_PROBE13	AGCTATCTACAGCCTGGTTCCACATGAAAAAGTAGCGGGACCTGTCTGTGAGGGCATCCAGCAGCAGCTG
HUMAN_ADENOVIRUS_A_PROBE01	AGCGGTAGCTTGGGGCTGCTGGCGAAAAGCATCAGGACTGCGCGCCGTTAAAGCCATAATACGATCCAT
HUMAN_ADENOVIRUS_A_PROBE02	CGTCCTCTGCCTGACTCTCCCAAGATTCTTCTCCAGATTTCTGCGGTTGCTGCTGTTTCTTTGAGCG
HUMAN_ADENOVIRUS_A_PROBE03	TTGGGAAAAAGGCATGGAAGCCATGGCTATGCTAATGGAAAAGTACCATGTGGATCACGACGAGCGCGCC
HUMAN_ADENOVIRUS_A_PROBE04	CGCAACTAGGCCCTTCGCCAGAGTCAAGTACATGGCCTTCTTGACCTGTTGTTCCATGTTTACTTCTCC
HUMAN_ADENOVIRUS_A_PROBE05	GGGTAACGCATCGGTCTTAGTGGCCGCTAGCGCACTACGGCGCAACAGACTTTCGTACTCAAAGTATA
HUMAN_ADENOVIRUS_A_PROBE06	AGGTAACAAAACGTCGCATAGTTTGATCAGACACCCCAACCAATATTATGCTTTAAAATAGCCATTCC
HUMAN_ADENOVIRUS_A_PROBE07	GACCGGCAGTGTTAACAATAGCACATGATAAGCGGTGCGGAGACACAAAACCCGAAAACGTTTGTCAA
HUMAN_ADENOVIRUS_A_PROBE08	GGCTTTGCATGGCCGCCAAAACCGCGGGATCCAGGTTAGGAGCCCTCTCCGCGATGATCGCCGGTCTGCTG
HUMAN_ADENOVIRUS_A_PROBE09	GAGCCCGCATGAGCAGTAGCCCCGACGCGCTGCTTGGATTCTTACCCAAGTTTGCGGCGCTGGTTTC
HUMAN_ADENOVIRUS_A_PROBE10	GCACTCACAGAGGGAGCGCACCCAGACCCGACGCGCTCAGCCGCGCCGCCAAAATGGGCAGATACTTT
HUMAN_ADENOVIRUS_A_PROBE11	AAACTAGGGGCTGGCTTGGCCGATTGCGAACAACAACAACATTCTTTTCAATTTTCTGCTGCTGTTTTGAGC
HUMAN_ADENOVIRUS_A_PROBE12	ACTTTCCGGAGAAAGAATTTATCCCGACGCCAATCATGAAAACAGCAGCGGGCATCGTCTTTTTAAT
HUMAN_ADENOVIRUS_A_PROBE13	TACTCAAATGTGGCTTATACCTACCAGACCACTAAAATACACTCCAGGAAACATAAAAACCTGATA
HUMAN_ADENOVIRUS_A_PROBE14	ACCACCGAAAACGAGGGTTGCGCTACAGATCCATGTTGCTAGGCAATGGGAGATTTGTTCTTTTACAT

HUMAN\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE15  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE16  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE17  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE18  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE01  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE02  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE03  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE04  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE05  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE06  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE07  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE08  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE09  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE10  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE01  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE02  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE03  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE04  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE05  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE06  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE07  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE08  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE09  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE10  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE11  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE12  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE13  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_E\_PROBE01  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_E\_PROBE02  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_E\_PROBE03  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_E\_PROBE04  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_E\_PROBE05  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_E\_PROBE06  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_E\_PROBE07  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE01  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE02  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE03  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE04  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE05  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE06  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE07  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE08  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE09  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE10

TGGGAAATGATCTTCGGGTGGACGGAGCCAGCGTTCGCTTTGACAACATTGCCCTGTATGCTAACTTTTT  
ACAGCTGTGGAAAGCATCACACAGAAAAAGTTTTCTATGCGATCGTGTTATGTGGCGCATCCCATTITCTA  
GGACCGCGGAATACCCTGAAGGATAGACCCCTTAAATCTGTATACGGAGACACTGACAGTCTTTTTGTG  
GGTCAGTTGAATGTGAAACTGTTTGTAGTTATTGTGGCGCAGATGCTTATTCTCCAGAATCTGTTTTTT  
GGTAATATTCGGCCCTCTTGGATGTAGATGCCTATGAGAACAGTAAGAAAGAACAAAAAGCCAAAATAG  
ATGCTGGTCATGAAACTCTCAGGAGAAGAGCGTCTCGTCAACATGGCCACGATCTAGCCATTAACCTCA  
CTCTCAGGAGAAGAGCGTCTCGTCAACATGGCCACGATCTAGCCATTAACCTCAAGTGGGATCGATGGC  
TAAGCTACCTCACGTGAGAGCCAGCCGCTTTCATAGAATTATACATCGTAGGACACAACATCAACGGT  
CCTCGGTAACGACCTGCGGGTAGATGGCGCCAGCATCAGTTTCACGAGCATCAACCTCTATGCTACTTTT  
GACCTGCGGGTAGATGGCGCCAGCATCAGTTTCACGAGCATCAACCTCTATGCTACTTTTTCCCATGG  
ATAGAAGCTATAATGTGTTGGAAGACAAAATCAACACAGCCTATCGCAGTTGGTATCTTTCTGACAATTA  
CTCCACTAGACAAGTCAGTAACTACCCTGTGGTGGGTGCAGAGCTTATGCCCGTCTTCTCAAAGAGCTTC  
TATGCCGCTCTCTCAAAGAGCTTCTACAACGAACAAGCTGTGTACTCCAGCAGCTCCGCCAGTCCACC  
AATGCCATCATAGATAATTACTTGAAGTGGGTAGACAGAATGGAGTGCCTTGAAGTGACATTTGGTGTGA  
GATGCATGGCCAGAAAATCCAGCAGGTACCCCCGCTCAGATGGGTTTTCTCGCTCCATTTATCCTTTAT  
CCGCTCCTCGTTGGGATCTTCGGGGGCCGTCACGTCTAAATCATAACAGTTCGTGAAGGGTAGGTGGTTC  
GTGCAGTAGGGGCGGCCCTGGTTCCAGTGGTGTCCCATCTACGGTTGGGTGCGGCAACAGGAGTGC  
GCGCCGGCGAAAAGTGAATAAGTCAATCCCTTCTGCACCGCAACATTACAGACTCGGGAAAAATCTG  
CCCGCCGCTGGGCGCGGTTGCGTGCAGCAGTTCACCTCGTTCGTCAGTTCATCATCATCATCTTT  
ACCTCCAAAACCAAGAGTACTGTTAGAGTCTGTTCAGCAAGTTACGCACAGCAGAAAAATCTTCCAA  
TAGCTCCCAAGGGCGCTCCTAACTGTTGAGTGGGAAACAAACCGAAGATAGCGGCCGGCGGCGCGGA  
GAAACCCAGACACACATCTGTCTTACAAACCTGAAAAGGTGATGAAAATTCTAAAGCTATGTTGGGTC  
TAACTCCCCTCGAGCAGCCAGACGGTCAAGGACAAGCAGCCGAAGTAGAAGACCACCAGCCAAACCCGCC  
CAGTTTAGGACCTTTCGCGACCACCTGCAAATGCTAATGGCCGTCGACCTGTGGAGCTCATTCGTCGCTT  
ACTTTTCAACGATGTCACCTTCGCCCTGCCAAACCCGCTTCCAAAAGCGCACGGACTTTTTGCTCTGG  
CCTTTCTCGAGAGTTTTCCGATCCGGTTCGATGCGGACTCGCTCAGGTCCCTCGGTGGCGGAGTACCTAC  
CCGCCAACCCATAACCGGGACATGACGGGCGGGCTTCCAACTGCGCCCCGCGAGAACGCGCCGCGCCG  
TGAAATCAACATCCAAGCCAACCTGTGGAGGAACCTCCTCTATGCCAATGTTGCCCTTATTTGCCCTGA  
CTATGCCAATGTTGCCCTCTATTTGCCTGATAAATACAAATACACACCGGCCAACATCACCTGCCACC  
GGAGAAGTCGGCTGGCTTATGGGGTCTTGAAACGACGGGCGAGCCACGCCCTCGTTAGCCGCGGAATTC  
GTCAGCAGTTCGCCAGTACCGGGATCGTCTGCAAACCGCCCTGGCCGTGGATCTCTGGACTTCCTTCT  
TGGCCGTGCGCGAATGGCAAGCTTCTCTGGACGATCTGGGCACCTGCATAAGCTACTTCGACCCCGACCT  
TCGTGCTGACCTGGCGCTCGTCCAGCCGCGAGCGCGGGTTTTGGGCTCACGCGTATGCACGGCCGCGCGG  
GCCGGCGACGCAGGCCCCCTCCCCGCCACCACCGCTGAGGAGGAAGTAGAAGAGATGTTAGTGGATGA  
AACACAAAGCACACATAGCTTTCAGGATTGCCACTAGTCCCGATGGAAATCACAAGCCCGACAACCTCG  
ATTCCACCCCACTACAGGGTAGTTGCTGACTTTCGTTGGACGGTTCGAAACGTTACTGGATCTTGATCAT  
CGTGCAGGTCTTCAAAGGCCAGTGGCAAGCGATATGTAAGACGCTTGGAGCCAAAGGTGTGCCTCCC  
GAGGAGAAACAGTGGGAACGGTGGCCGAAAGTAACCCATTTTGTAAGTTATGTTGCTGCCAAGTTTTAA  
GGCGCTCGTCCGAAAAGCCAAATGGGTGCAAGAGGTAGCAGGTACGTTCTTTGGGTTCAGGCCAGGGC  
TGGATGATTCAAAGGCACAGTTGAGTAAATTTCCCTGATTGTCAAAGGGAAGTTTTACAGATAAAGCGTT  
TGTGACGCAGGGTGGGTACAACCTGGGGCTTTGAAGCATGCTGTTTGGAACGCCGGTAAGAGGTCCAT  
CAGAAGTTTCAGGGAATCAAACACATATTCAGTCTCCAGCAACCCCTGGAACATGTCAACAGTTCCTCC  
AAACCCGGTGGTTCGTATAGAGCCAGCTCCAGTAACGTATGCTGTTCCGCCCTCCGATAGGCC  
GGAGTCGTACGCGGGGTAAAAACAATGAATGGGAGCCCACTGTTGCGCGATTTGGCTTCACGGCTGC

HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE11  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE12  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE13  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE14  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE15  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE16  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_F\_PROBE17  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE01  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE02  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE03  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE04  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE05  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE06  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE07\*  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE08  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE09  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE10  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE11  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE12  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE13  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE14  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE15  
HUMAN\_ADENOVIRUS\_G\_PROBE16  
OVINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE01  
OVINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE02  
OVINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE03  
OVINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE04  
OVINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE05  
OVINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE06  
OVINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE07  
OVINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE08  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE01  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE02  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE03  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE04  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE05  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE06  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE07  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_A\_PROBE08  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE01  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE02  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE03  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE04  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE05

ACATGAACGGTCGGGTTGCCGTCCCAGCGCCCTGGATACATACGTGAACATTGGGGCGCGGTGGTCTCC  
TCCAAAGCAGTCTCGGTAACGACCTCAGGGTCGATGGAGCCAGCGTCAGGTTTGACAGCATTAACTGTA  
AGAAACCCCTCTTTGGGGTCCGGGTTTGATCCATATTTACCTACTCTGGCTCCGTCACATACTGGAT  
CAACAAAAAGACTCCCCTCGTATCTGGAGATCCAGGGACCGCGGCTAGGTCTCGGCGGGGTTCCGTCG  
GGCGGTCTGTCTCCAGGCTACGGAGGAAAGTCCGTGACCGCTCTCTGTTTTTTCATCTAGAGCGTACAA  
ACTCCCCTCCGTATCTGGAGATCCAGGGACCGCGGCTAGGTCTCGGCGGGGTTCCGTCGTGGACGCACG  
GGCGGTCTGTCTCCAGGCTACGGAGGAAAGTCCGTGACCGCTCTCTGTTTTTTCATCTAGAGCGTACAA  
TTAGCCCTCTTCCAAGTGAAGGGCTAGTTTTCTCTCCATGTCAAATACAGGGGTTAGCTATTTCGACG  
CGAAGCGAGCCAGTGGACCCCCCGGTTTCCCGTCCGGCCGTGTTAACGATGGCACAGGCCGGCTTGTG  
GGCGTTTCATGGATAGGTCCAAAGGTTCCGTCTGTTCTTCTGTAGCAAGTCTTCCAATTTTTCAACTGC  
TCCTCCACATCACCCGGTACAGAGGAACTTTTCTGCGTCAAGGCTGGGTACGGCGGTGGCCCCAATCAG  
CGTCTCGTTGGGATCTTGGCGGTGGATCCACTCCACATCGAAAAGATCATGAAGCGACGGAGGGCGAAGT  
CTTTGTAATTCGCGGCAGGTAGAAACCTGGTAGCCGATGTTGTAATGGCTGAGCATGAATTAGGAA  
TGAAAGGAACGGCTGGAGTGTTGGTGTATAAGGGTAGACGGGGTTGAAGTCTTCATCAACTCGGGT  
GCTGCCGGTGGCGGCGAAAATAGGCAGAGTGTTCGCCAGAAAAGCGATACAGGTGTTCTGTTACGGCG  
TGCTCGCGCTCGGGGCTCATCTCCCAGAGTAGGGGTAATGGAGCTGCCTGCTTGGTTCTGACGGTTGG  
ACCGCAGTTGACGTCTCCGCGCAGCAGCGGGCGTCTTCTGTTCTTACAGTGAACCACGTTGCGGCCCAA  
CGTTGTCTACGTGGAATTTCTCCATTAACATCATCATGTTTCCATACCCCTTCTCCCACGCTGTACCAG  
TCCTGACAACATCACACTCCCAGAGAACAAAAACACCTATCAGTATATGAACGGTCCGCTGACGCCACCC  
GGCCAACTATCCCCTGATTGGGGCCACCGCCGTCCCAGCCTCACGCAGAAAAAGTTCTCTGC  
ACTTCATCCCCCGCGCGGAAAATCCTTTAAACGACGTACATTGCGCCCTCCCAATCCAGGCAGAA  
CTTGCTAGATCCCCTGCCTCCGTTCTGCTCCAGAAAAGGGGGCGATTGTGTTGGACCAACGAGCCCTC  
AGCTACGACCTCATGCTTCTGTTGCTATCTGGCCGACTCACAGGGAGACGACGCCCGCTTACGACCAGCA  
GAAGCTTCTGCAGGGACAGCAGCATCTTGGCTTGTAGCATACTGGTCCACACACAGCGTCTAAAATAAA  
GAATAATTTTATTAGCTGGCCCGTACGCTACTTTCTTGGCGGGGGTAGAGCTGATATCCATCTGCTCAGT  
ACGCGTTTTGTCTCATATAACACAGAGAACACAAAGTGTCTTCAATTTTTCGTAGCTCTCCGATGATAATC  
TGTCAAAAGTTCTAAAAGTAAGGACTTATGCCAAGTCCGGAACAATAGCTCGCAACTCTTCTCCCT  
ATTGATTTTTTGAACACTCAGGTCCAAAGGTGCATCAAGGCGTTGTTTTTAAACAAGGGCAAAGTCTC  
TTTTAGCGTTTGGAAACCAAGCTAGGGCAAGCCAGTGTGCCCCACCGGTCTCGCGGGCCGCTGATTGAC  
ACTGTTTATCTAAACAGTCTACAATGTAAGCAAGCAATGATAAACTAGCAGTGCCTCTCCCTGGAGTTGA  
TGCGCTTGGCTGGCGCTGCGACAAACCGCCAGTGTCTTGTCTGCGTCCGAGCCACGCGCCTTCTCGTTT  
ATGTCTGATTAATGTATACAAATGATGTTAGGGAAGAACCGGAGGTGTTGCGTGGATAAATAAAGGTGCT  
AGCCCCGGAAGGACTTGTCAAAGGTGCCAGGAAGCGGGCAGCTGGAGGTCCGCGCCATGGCTCGGAG  
TATCCTCTCATTACTGTCCCCCTCTTCTGGGGGTCCATCTCAAAGACCCCTGAGAGCCACCTGAGTC  
TGACGTCTTGGGAAGGACCACTCGTAGGTGATGTCGCCCCCGCAGGAGCAGCAGGCTTTGAGGGC  
AGCGATGGTAATCACAAAGAGCGGAGTTCACACCAGGTACCTCGGGCAGTCCAAACACAAACGGAGAGGG  
TGGGAAAGAAGCTGGCGTAGAGGTTGACGCTCTCGATGTTGATTTTGGCCCCGTCCGCGCGGAGGTGCTT  
TCCACAGCGTGTAGGGTTTGAAGTTGGAGCCAAGGTGAGGGCGCCATTGTCCACAGAAAAGTCGTTAGA  
AGAGCCGCTCGTTGTCCACGCCCTCCACCAGGTCCATGACGGGATTGTAGGCCATGGGGCTGTCCGGGTA  
AGCACAGATGCTGTTGATAGCATTGCTGAGACACTCAGGACGCGAGCAATTACACGTGACACTGCCAGG  
TGTTCCAGGTGGGTTTGCAACAATGGCCAAACATGTGTACATATTTGATTTGGTCCAGTTCCTTCAGCC  
GGGTAAAAGTCGGACGGGACGGACCCCTCATCTTTTTGGGTAGAATGAAGCTTCGCTACGGTGGGAAT  
AAATCCACCAGAGGCTTCCCCTACAGTGTATGTTGTCACATTTGGATGACAATGACCAGGACGA  
TAGGCGTTTCAGGAAACTGGCATACTCCATAATCTGACCTACACCAGTTTGGACAACGGGGACTGGGTG

PORCINE\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE06  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE07  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_B\_PROBE08  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE01  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE02  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE03  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE04  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE05  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE06  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE07  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE08  
PORCINE\_ADENOVIRUS\_C\_PROBE09  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE01  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE02  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE03  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE04  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE05  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE06  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE07  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE08  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_2\_PROBE01  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_2\_PROBE02  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_2\_PROBE03  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_2\_PROBE04  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_2\_PROBE05  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_2\_PROBE06  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_2\_PROBE07  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_3\_PROBE01  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_3\_PROBE02  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_3\_PROBE03  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_3\_PROBE04  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_3\_PROBE05  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_3\_PROBE06  
HUMAN\_HERPEVIRUS\_3\_PROBE07  
PHOCID\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE01  
PHOCID\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE02  
PHOCID\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE03  
PHOCID\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE04  
PHOCID\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE05  
PHOCID\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE06  
PHOCID\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE07  
PHOCID\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE08  
PHOCID\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE09

GGGACCCCTGGACACAGAAGAATTTGCAGACTTTTCAGGTAAGGTGATGTTTTATTGAGTTTGACCT  
AGAGGGTTTGCAATGTTCAAGCTTAGAACACCGCTGGGACCCTCGTGAAGCCATAGTTGTCATAGAAA  
TGATAGTCATAGGGGTACACCGGGTTAAAGTCGGACGGGACGGACCGCTTCATCTTTTTGGGTAGAATG  
CTAGTTCTCCGTTTTGGTTGATGCTAACACCACCACCAATTTTCAGTGTGATGCCCCAGTGTGGAAAA  
ATTTCTGAGGAACCTGGATGTGAACTGGCAGTATCTGCCGTTCCCCAGAAGCTGGGACCTGTAGCGCAG  
CTGGGAACCTTTGAAAACCATCTGACTGTAAAATGGAGGAATTATGTTAAGTGGTGGGTTCCCGTATGG  
CCGCCCCACACGTGACATCCGTGCTCACGAGGAGCGTGGTGTACGTATACCCGTGTCCGCCCGTAGTT  
TGTTACAGTAGAACAGAAAATTTGATGCGCAACGGTGTGCATCGTGTATGATAGTCAAAGAACTTAT  
AATTCTCCACATCTAACAGGGCCGGGATGTTGCCCCACGAGATCCTCGTAGGTGATGATGAAGCCTTC  
CCACCAAGGTGTCATTGTTAGGTTTTAAACCACCGTGGAGGAGAAGATAATCCTCAGTTGGTTGCTAGA  
GCTGGTGTACACGCACAAGATCAAACACTTCAAACAGAATGTAGAGCAGAGTAGGCTCCTCCATCGCATC  
GCATCCACAGGTGACATGGTTGGTAGAGTGCAGAACTCGATGCGACAAGTGCGGGGAGGAGCTTACAGC  
TGATGAACGCACTACATTTTCCCGAATGGAATGCTTGGCCAAAGAGTACGTGCAGCTGAACATCGCA  
GCGTTGCCGTATTTTTGCCAAAATCGCCCCGACGGGCTGCGTGCAGGAGGCTGCTGCCAGTGTGTTG  
CCTACAGCTAGTCCCGTTCGCGGTACCCTGCAGCAAAGCCTGCTGTCTGCGCTTAAAGCACGGCCGG  
TGGATGAAAATGAACCAGACCCTATTGTTTCTGGGGCCCCGACGACCCCCCAACGGGGGCTGGCGCA  
GGCCCCAAGAACGCAGACAAGGCCGCCGCCCGGGCGATCAAGGGGCTGTCCGGGCTGTCCGGGCGC  
ACCGCGATGTTTTCCGGTGGCGGGCGGCCCGCTGTCCCCGGAGGAAAGTCGGCGGCCAGGGCGGCGTCCG  
CCCAGTCGGGACGCAACAGAAGCCGACCGGGCCAAACCAGCGCCATACGTACTATAGCGAATGCGATGAA  
CTACGAGACGCGCCCCGCTGTTTTACCAGCTCTACGTCGGAAGCGGGCGTGTGCTGCTGCTACCTGTG  
TATTCCGTCATAGCGCGGTTCCCTCCGGTATTGCTCCTCCGTGTTTTAGTTAGCCTCCCCCATCTC  
GTCGTCCAGGGTGGGGCTGATCTGAATTTCCCGCAGAACCTCGACCAGTAGGTCTGTTGTGTTTGTGGG  
ACACGTGCACCACCTGTGCCGCTCCGGCAGCGCGCTCGTTAGCGACGCCCTGGGGTGTGATGAGGCTGTA  
ACCTCCCCGAGTCCCACCTCAGCGATCTCGCTCCAGGGGCTGCCGGCCCCGCTGCTCCTGGAGTTTGA  
ACGGGGACGAGGACGGGGACGAGCGCAGGAGGTGCGCGCGAGACCGGGGGCCGGCACGTTGGGTACCA  
CCGCTCCTCTGCGAGCTATCCGTTCAACGCCAGACCCTGGTGCAGCTGTTGAGGGCGGATCCGGTCAAC  
CTGATTTTCATCCTGCGGCGGGGCTCGGCCCAAAAACGCGGAACCAGCGGCCCCAGGGGGCGCTCCA  
ACGTGCGATGCAAATTAATAATCGTGCACAGAGCCGATCCGGCCTCGGGTCTGCTTGCCTCCCCGGCC  
CCACAATCCAATCCGATTCAACGACAGCTGGGCTTCCGGTTAACGCCGTGTTCTGCGGATTTAGTG  
TTACAATACAAGGAGAGGGCCATAACGGCGAGACCTCGGAAGCGCTAAATAACATCCTTACGGATGACAC  
GAGCGTGTCTGAATCGTACTTTGTCGGACAAATCAAAGTACACCATCATGATGCTATTGGGGGGTAA  
GGATTTAGTTGGCGTGCATGCGGAAGTCAGGCGGCGGAGATTTAAAGGAGCGTCTTTCAGGACTCCTA  
CCGGGGTGTCCGTCCAATCTTTCGCTATTTAGGCCCGGAACTCAATCCGAAGGGTGAAGACAGAGACTA  
ATCGGATAAACACAGAATCCGATCTCCATATATAACCTTTACCTCGTACGCTTTTTGGGAGAGAACGCT  
CCGTACGTATAAACATGGCAGAAATCCCTGCGCAACTCCAGTAAAACCGTACACGGAATTACAACTAC  
AGTTTCTGGAACCTGGTCCCCAACCTGTAGTCTGGTATCCAAATCAATAGGATAATAACCCTCAATTTG  
GACATAAAAACAGCGGCTGCGTGATTAATAGGATCCACATATGCGGTTTGGGACAATCCACATCCACTGC  
TTTAGACATTCTACCATCCCTATAATCCAAACCTCGCGTAACCAACGGTCTGTCTAAAATTAACCTATCT  
TCCCAATTTTTGTATACGTATCATTGTCGTATGCCATCCACGAGAACCAGGGTGTATTAATTTTGGAGG  
CATTGTACAGTTCCAAGACTACCCGGAATGGCCGGGAGTACTTTTAATTTGAGTAGTAATTTTAAAT  
TTGATATAGTTTCCCAAGAGCTTGAGATATTGCATCCAAATATAATGGTAACTGTTGTATCAAGTCTAT  
GTTCTGTATGAGTCCATCACGTAAACCAAAAAATGGAGACATATGAATTATATCTCCAGTTGAAATGCC  
AGGAATCATATGGATATACAGATCTGGCATCAACTTCTGACAATACAATTTACAGATGTTCCCGTACG  
GTAAACACAGGACAGCACATTCGAACGCTGAGTAAGGCCATTACCAATATAAAGGCGGCTGCATGACTG



PHOCID\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE10  
PHOCID\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE11  
PHOCID\_HERPEVIRUS\_1\_PROBE12  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE01  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE02  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE03  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE04  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE05  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE06  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE07  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE08  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE09  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE10  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE11  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE12  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE13  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE14  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE15  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE16  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE17  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE18  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE19\*  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE20\*  
ALPHATORQUEVIRUS\_PROBE21  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE01  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE02  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE03  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE04  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE05  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE06  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE07  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE08  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE09  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE10  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE11  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE12  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE13  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE14  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE15  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE16\*  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE17  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE18  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE19  
BETATORQUEVIRUS\_PROBE20

CTTCATCTTTATCAAATGCAGTAAACTCGTAATTATTGCGAATATAATCAGCCTTTGAGAGGCACATACC  
CTGTAATTTCTTGAACCTTTATAGGTA CTCTATCAGTATGCATGTTAGTACTACGGCATACGAGCTTCC  
TACGTTTCGTAGCGTCCGCCGGAAGGTGCATGAAATTGATTTTTGGGTAACCTGTCAATATTATATAAATA  
GTTGTTGGAACACAGCATGGGCCTCCATCGGCATTGCCAGTATACTGGGACTTGGCCACTTCTCTGAGGG  
CCCGTCTGTAGGTACGTCTGCGAGTTCTGCGGCGCTCCTTACCCTTGGTTTGCCTTCTTCCAAGGCC  
GCCATGCTAGTTCTCTAGAAGGGTTCGCGGGGGCTGAAGGGAGTGCCGGGAGGCGCGGAGCCGGCGGCG  
AGCCTGCTGTTTCATGGTCCACATTGGGTCCTAGTTGAGTCTCTACATAGTCAGTGTATCCAAAGCATAT  
CGCCACCTTCTCCACCGGCGCCTCGGCCTCCAGCCCCACCTTCTGAACCAGTAGGCCATGCTAGTTCTCT  
CCTGGATGTTTCGCTGGAGCTGGAGCTGTACTGTGCGCGTTTGGAGGACTTCGACTTCTTTCTCTTCTG  
GGATCCCGCATTAAATAGTAGGTGTGGTGAAGCTCATGGCAGGTGCCCTTCGGTGGAGCTCGCACAGCTTG  
ACTGTCTTCTTTCTAAAATGTAGTCTTTTTGGGCTCTGTATGTGGGAAAGCCGAAGTTACTGTATATGG  
TGGGTGTTGTTGACTAGGTTGTGGCCATACTTTTTGCTAACTGGATTATAACTTCATAGTTAAAGTT  
TAATGCTACCACTCCAGAATATGAATACCACACAGGCTGGTTTTCCACAGTATTATAGGCCCAAACAGA  
ACCCGTCGAGCTCCAAGACCAAAGAGAACAAGCAGAAGAAGACTCGCGTTCCGAGGCGCTCTCCGTCACC  
GCGCGTGTGAGAGGCTGCCAGCCCTCCCGCTCCTGAGAACCACCGGCGCCATGGCCTGGCGCTGGTG  
GAAAGTAGTACTGACTCAATGGAACCCAGCACTGTCAGACGCTGCAATATCAGGGGCATAATACCCCT  
GGAAAGTGCCACTGCAAGCTCTGCCAGTACCACCGCTAAACGGACTAGCATGAGCTGGGTACAACCGGT  
AGCTGGCTCACCTTTCTAAAGGCAGAAAATATGTAAGGTTAAAATACCTCCACCTAAGTTATTTGAAG  
AGTTTATACTGTCCGGCCGAGGTGCGTGGAGGAGCGACAGTAACGACCCAGACCAGCCCTGGGCGGGT  
GTCCGCGCCGAGGTGCGTGGAGGAGCGACAGTAACGACCCAGACCAGCCCTGGGCGGGTCCCGGAGGTG  
GCCGACGGTCCGTTGAGGAGCGACAGTAACGACCCAGACCAGCCCTGGGCGGGTCCCGGAGGTGATTT  
CCGCAGTCAAGGGGCAATTCGGGCAGGGCTGGCCGGGCATCTGGGCAAGTGTCTGAAAGCGTGCCTGTG  
GTCAAGGGGCAATTCGGGCAGGGCTGGCCGGGCATCTGGGCAAGTGTCTGAAAGCGTGCCTGTGCCCCA  
GCTTCGCTCGCCTCCGCTCCCTCGGATCCGGTAGTCTGCTGAACTTTATTAACAAACTCCGAGTCGCC  
CCCCGACGGCTTTGGAGAAGGAGATTTAGACGCCCTCTTTACAGAAGATTTGGAGAAGAAAATACAGGG  
ATATTCCATCAAAATCAACACTTAGACAAAAAAACTACAATGGATGAATTTAATTGTTACGGCCACGA  
CTACAATGGATGAATTTAATTGTTACGGCCACGACATCTTTGTGACTGCTGCAAACCACTTGAATGCA  
TTAACCAAGAACCAGACCTAAAATTCAACACAGAAGAAAAAAATCTACTTAAAAAATGCCTTTCTACAAA  
CCCACAAGTTATGCTTATGAACAATAGAACAAGAATAATGCCTTGTAAGATATAATAGAAAACAAAAA  
TTCAAAAGGAAGTATCTAACGTTCCACTTATGCAAGTAATGGCTACAACCTGCTCGTTAGACCGCATGTA  
CTAACGGTTTTATGGAAAGATATATGAAAGACAATGGAACATCACCATACTCCCATTAACAGGACAAAT  
GACAATGCATATTATTAGGAACAGTAACAGACTATAACAACAGGAACCCAACCTTCATCCATAAACTTACA  
TTGGAGAAGAAAATACAGGGTAAGAAAAAGAAAACCTTAAATACTTACCCTTAAGACAATGGCAACCTCAT  
TTATAATGCATACTATCAACACAAATATTGGGGAATCCCTTTTTTACAAATTGGTCCATGGTGACCAA  
TTCCCCAAAATTGTTGGTAATTTCAAAGTATTGTTGCCAATTTTGTGTTGATGTTGTTGTTGGTGCATG  
GTTGTGATGCTCCATGTCTGAAGTCAAATGAGTATAGGATGCTTTTCGGGGCTGTCCCTGGACTCTGTA  
TAGTTATGTCTTCTGGTAAGCATGTTTGTGATGGACTAAATCCTTGTGTTAAATGATTCATCTATAAT  
TTTTCTTTTTCTCCTGCGTTTCTCTGATGTTTGGAGAACTGGAACATTTGTTGGAGTAGTTTTGCTG  
TTAAACAAGTTTGTCTTTTATGTAGCAAGTCTTTTTATATGGCGTTGCCATTGTTTTAAAGTTATTTT  
CTGCTACTTTAATTTGACTTGTGTCTGATGGTGGGTTTGTGCCAGTGTAGTAGTAAAAGTAAAAGGATTG  
AGTTTTGCTGACTCTGGTCTGTAATTTGAGAAACAGTTTCTTAAATGGCCAGTCTTTGTAATTTCTG  
TTGTTTTCTGCTCATTACGGGGTATAGGAAAGATATTCTGGTGGGAAGGATTTTCAACATTTACTGTTTT  
ATATAATTTCTGCAACCCGGGTGGGTGCCACTCCGTTGCCCTTCTCTGTTACTTAAAAAGTAGCATTTGT  
TCTGATGTTTGGAGAACTGGAACATTTGTTGGAGTAGTTTTGCTGACTCTGTTCTGTAATTTGAGAAA

DELTATORQUEVIRUS\_PROBE01  
DELTATORQUEVIRUS\_PROBE02  
DELTATORQUEVIRUS\_PROBE03  
DELTATORQUEVIRUS\_PROBE04\*  
DELTATORQUEVIRUS\_PROBE05  
DELTATORQUEVIRUS\_PROBE06  
DELTATORQUEVIRUS\_PROBE07  
DELTATORQUEVIRUS\_PROBE08  
DELTATORQUEVIRUS\_PROBE09  
DELTATORQUEVIRUS\_PROBE10  
DELTATORQUEVIRUS\_PROBE11  
DELTATORQUEVIRUS\_PROBE12  
EPSILONTORQUEVIRUS\_PROBE01  
EPSILONTORQUEVIRUS\_PROBE02\*  
EPSILONTORQUEVIRUS\_PROBE03  
EPSILONTORQUEVIRUS\_PROBE04  
EPSILONTORQUEVIRUS\_PROBE05  
EPSILONTORQUEVIRUS\_PROBE06  
ETATORQUEVIRUS\_PROBE01  
ETATORQUEVIRUS\_PROBE02  
ETATORQUEVIRUS\_PROBE03  
ETATORQUEVIRUS\_PROBE04  
ETATORQUEVIRUS\_PROBE05  
ETATORQUEVIRUS\_PROBE06  
ETATORQUEVIRUS\_PROBE07  
GAMMATORQUEVIRUS\_PROBE01  
GAMMATORQUEVIRUS\_PROBE02  
GAMMATORQUEVIRUS\_PROBE03  
GAMMATORQUEVIRUS\_PROBE04  
GAMMATORQUEVIRUS\_PROBE05  
GAMMATORQUEVIRUS\_PROBE06  
IOTATORQUEVIRUS\_PROBE01  
IOTATORQUEVIRUS\_PROBE02  
IOTATORQUEVIRUS\_PROBE03  
IOTATORQUEVIRUS\_PROBE04  
IOTATORQUEVIRUS\_PROBE05  
IOTATORQUEVIRUS\_PROBE06  
LAMBATORQUEVIRUS\_PROBE01  
LAMBATORQUEVIRUS\_PROBE02  
LAMBATORQUEVIRUS\_PROBE03  
LAMBATORQUEVIRUS\_PROBE04  
LAMBATORQUEVIRUS\_PROBE05  
LAMBATORQUEVIRUS\_PROBE06  
THETATORQUEVIRUS\_PROBE01

CGGCGTCTGCTGGGTTCTCTAGTTGTTTTGCGGCCAGCGGCCGCGCATACTGCTGGTACCCTCGAGCG  
CTTCTGTATCTTCGGCGAGTGTAAAGCATTTCTGCGTCGGTAATAATGTCGCCGTCCTCCGTAGAAAGTTCC  
AATGTTCTTTGTACATTGCTTCCAAAGTAAATACTCCGTATCCATATCCTCCGGATACACGTGAAATGG  
TCTGTGAGGATCCGTCCTTGTACATAGTCGCTGGGTCGCACGGTGTACTTATGAGGGTTTTGTGGTGGTG  
GCCATAGGTAGTTCTGAAATGCTGTACATGAAGTCCGCTTAAAGTGGTTATAGGGAGAGCCGTAGAGGT  
TTTTGTAGTTTTAGTACAAAATGGGCCAGCCATAGCAAGTTGGTAAATTTGTTGAGTGACTCCGCTACC  
AGGAGCTGCTTTCTAGTGGCTCTCCAGGTCGGATATGGAGGGCTCCGAGTTACTCTTTGGCGGTATCG  
TATCATTCTTTTTATCATAAGTGAAGGATCAATAGTTTGTGCAGGTTTACTTATGTCAGCCATCCAAGG  
GAATTTTTGTAGGATCAGCAAGTACTTTGTCTTGTAGAAATTCTCCTCCCATTGAAAGTGTGATTTGTA  
TGGGTTCTGTGCAGTTGCACCAGCTCTTGTGGCTTAGTAAACAGCTGTGCCACCAGATCTTAGCAGGATC  
TGCGGCCAGCGGCCGCGCATACTGCTGGTACCCTCGAGCGGGTCTGATGCTGTGGAGAAGGAGGAGAA  
TGTGGCGTCTCCTTACCCTTCTGTATCTTCGGCGAGTGAAGCATTCTGCGTCGGTAATAATGTCGGC  
ATTTTAGGCTGAAGGGACTGGCTATGTACAGTCTTGTGTGCTGGTAGGGAGTCGTATACGTCGCGGGC  
AGTTTGGTGTGGTTGTCGTAGGTTCCGCAAAGCTGGACTTGGCGTCTTTCCAGCTTTCGGGGCGCTCT  
CTTTCCGGGGCGTCTCTGGGGTCGGCGACATCCAGCAGTAGACGCTTTCGGGCCGTAGTAGGTCGGCGGT  
AGTAGGTCGGCGGTAGTTCTGACCTCCTTGTCTTCTTCTTTTTTTGTGGGCTGCCCTCCTCTGTGG  
CTTCGCCACCAGCGGCCGCCCTCTCCTCCAGCGCTCCTTCTCCAATACCTCCGGCGTACGCCATGG  
TGGCGTCTTCAAAGCGGCGAGCGCGGGCCATAGCGGCGTCCGGCGCCATCTTCTCCGCTTCTGCGCC  
ACAGTTCGAGGTCGTCTCCATCGTCTCCAACGGCGATAGATGCCATGACCTCTTCGGGATCTTCGTC  
GTTTCGAGGTCGTCTCCATCGTCTCCAACGGCGATAGATGCCATGACCTCTTCGGGATCTTCGTC  
CGGGGTTTGGTCTGAGTACAGCAGCCTGTGTTGCTCTTGGAGGGTTCTCCTGGGGTCCATCCACC  
GTCGTCTGAGGAGCTGTCTTCGGGGTTGGGTCTGAGTACAGCAGCCTGCTGTTGCTCTTGGAGGGTCT  
GTTTCGAGGTCGTCTCCATCGTCTCCAACGGCGATAGATGCCATGACCTCTTCGGGATCTTCGTC  
GCCTGTGCATGAGATATCCTGGGGTATCCAGGTCCTTCTGCTCTGTTTTTTGCGAGGCTGTTTTGTC  
CTTCGGGATCTTCGTCCTTCTTTTGTAACTGATAGGATACGGCGACCCATCTCCGCCTTCTTC  
GGATGAGCTTGAGGATGTTTTCTCCGTTTCTGCTCCTGGCATGTACTTTCTTCGAGAGAGAGAGGAG  
TTTCTTGGGTGCTGGTTCTTCTGCGTCTGCGACGGCGCGAGCAGGCTTCTATATTTTGTCTTC  
TGCTGGATGAGCTTGAGGATGTTTTCTCCGTTTCTGCTCCTGGCATGTACTTTCTTCGAGAGAGAGA  
AGACATTGGTTGATCTTTCCGTTTTCTTTGTGGGTCGTGGAGGACTGGTAGTAGTCTTTTTTTCTTGG  
TAAATGCTTGTCTAACTCTTTTTCAGTTTCTTGTCAAATCCTGGTTAAATCTGGTAAGGGTATTCT  
TATCTGTTCTATCCATTGGCCTATGTTATATTCTGTTTTTTACCTCCATAGTTAGAGACAAATATCAT  
TCCACAGGTGGTCTCTCCAGCTACCGCAGTCGCAGTGGTGGTCTGATGGATGTACAGCTGGTCAGCCA  
CGTCAAATCTGTGTCATACCAAGAACAAGTAGCCCTGATTCTCTGTTGGATATAGTCTAATTCTGCACCC  
CTCTCTCTTCTCTTCTTCTCGGTTTCCGGGGCTTTGAGGAACGCCGACTGCGTGTAGGTATTTGGTG  
GTGGCGGTATGAAAATGCTCTTTACTCTCCGCTAATTGGCATCTTTTGTTTACATACTATTAACGGGA  
GCAGCGGTGATACCTTGTCTCCAATTTGGGTCGCGATTCCGCCCTTCCCGCGCTATTTGGGGTGTGTA  
CTTCTCCTCCATCCGCTCTTCTTCTATAATATCTGCGGCGGGCCAAATCTGCGTCTGCTAAAGC  
CCGATAGTGGTACCTCCTGAAGGGTCTCCTCCATCTCCGGCGCTGAACCTCCTCCGAAATGGCATT  
ATTACAGTCTCCAGAGACCTTAAAGACATAACGGTATTTGAACCAGAGTGAACAATTGCTCCATTATA  
CATCTGGATAACTGATCAATGAGATTGAGGATTCGGTGTCTTGTGCTTTCGTAGGACATCTGACTGTCCGA  
GATGAAGCATTTTATCAGTTACTTTTTGTCCAATTTAATCATATATTCTGTCTATTAACCCAGGCATT  
GGACTAGTCCACTAATCTCTCAAGGCCTGTCTCCGTGAGGATCCCGTCATCTGTGTCTCCGAGGAGGA  
ACTGTATGGTCAAAGATCAGGAGATTGAGATCCAATGCAAGCAATGTCATGCGAGACAAAGCATAT  
GCCTTCGGTATCTCCTTACCCTCCGCGGCCAGGCTCGGCGTCTCCAGCGCGGGCGAGCATAGCC

THETATORQUEVIRUS\_PROBE02  
THETATORQUEVIRUS\_PROBE03  
THETATORQUEVIRUS\_PROBE04  
ZETATORQUEVIRUS\_PROBE01  
ZETATORQUEVIRUS\_PROBE02  
ZETATORQUEVIRUS\_PROBE03  
ZETATORQUEVIRUS\_PROBE04  
ZETATORQUEVIRUS\_PROBE05  
ZETATORQUEVIRUS\_PROBE06  
GUANARITO\_VIRUS\_PROBE01  
GUANARITO\_VIRUS\_PROBE02  
GUANARITO\_VIRUS\_PROBE03  
GUANARITO\_VIRUS\_PROBE04  
GUANARITO\_VIRUS\_PROBE05  
JUNIN\_VIRUS\_PROBE01  
JUNIN\_VIRUS\_PROBE02  
JUNIN\_VIRUS\_PROBE03  
JUNIN\_VIRUS\_PROBE04  
JUNIN\_VIRUS\_PROBE05  
JUNIN\_VIRUS\_PROBE06  
JUNIN\_VIRUS\_PROBE07  
JUNIN\_VIRUS\_PROBE08  
JUNIN\_VIRUS\_PROBE09  
JUNIN\_VIRUS\_PROBE10  
JUNIN\_VIRUS\_PROBE11  
JUNIN\_VIRUS\_PROBE12  
LYMPHOCYTIC\_CHORIOMENINGITIS\_VIRUS\_PROBE01  
LYMPHOCYTIC\_CHORIOMENINGITIS\_VIRUS\_PROBE02  
LYMPHOCYTIC\_CHORIOMENINGITIS\_VIRUS\_PROBE03  
LYMPHOCYTIC\_CHORIOMENINGITIS\_VIRUS\_PROBE04  
LYMPHOCYTIC\_CHORIOMENINGITIS\_VIRUS\_PROBE05  
LYMPHOCYTIC\_CHORIOMENINGITIS\_VIRUS\_PROBE06  
LYMPHOCYTIC\_CHORIOMENINGITIS\_VIRUS\_PROBE07  
LYMPHOCYTIC\_CHORIOMENINGITIS\_VIRUS\_PROBE08  
LYMPHOCYTIC\_CHORIOMENINGITIS\_VIRUS\_PROBE09  
LYMPHOCYTIC\_CHORIOMENINGITIS\_VIRUS\_PROBE10  
LYMPHOCYTIC\_CHORIOMENINGITIS\_VIRUS\_PROBE11  
LYMPHOCYTIC\_CHORIOMENINGITIS\_VIRUS\_PROBE12  
LYMPHOCYTIC\_CHORIOMENINGITIS\_VIRUS\_PROBE13  
LYMPHOCYTIC\_CHORIOMENINGITIS\_VIRUS\_PROBE14  
LYMPHOCYTIC\_CHORIOMENINGITIS\_VIRUS\_PROBE15  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE01  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE02  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE03

CAGCGGCGGCGAGCATAGCCGCGTCTACGAGATCGAAAGAGACGGCGGGGTCTTCTCCACTTTCGGT  
GCTGCTTCCACGCTGCCTCGTGACGCTTCCATCTCTCCCTGTCCGGGCTCCAGGGTCCCGGGGTCGTGGG  
TGAGAAATATTTTTTGCCTTTGCCATTCCATTTCCGGGGTTTTATGACCTTGTGTTTTTGGTCATGAG  
TGGAACCTCTGGACCTGGGGCGGCAACGCTAGCCCAGGCGTTCATGGCCTGTAGGACCGCTTTGTAACC  
TCGGAGCTGCTGGTGTCCGCCTCCGCCTCGAGGTATCGCTCGTCTCGTCCGTGGGGTCTCCGTCGGGA  
GTCCCTGGGGCCAGTATCCGCGGGTCTGCAGGATGTTCTCAGGTGGTCCCAGGCGCTGGAGCAGCTGCA  
GGTCGTCTTCTTACGGGGCCGACGGCGCCATCGCCTCCGGCGCCTCCAGCGGCGGTACCGGCGACGCC  
ACGGATTATCGATGCGAGCTCGGCCATCGAACGGAGGGAAGTTAGGTCCCTCCACCTTGGTTGCTGGCA  
TCCCGAGCCGGGTTTCTGAGGGCTCTGTAACAGCATCAAGAGATCGCTTAACCCGGTGCACAGCGGAGG  
AAACACCTCAAGCAGAGGTAATGATCAGAGCATTTAATCAGATTCTTGTGAGCAAACCAGCAACACTTGC  
TTGTCAGCAAACCAGCAACACTTGCAGTTGTACCTCCCATAGAGACTGTGAATGGCAGTCTCTAAATT  
TACAGGAAAGGCCTTGGGAATTTTGTTCAGACAGATAGAAAGTCCCTACTACAGACTTTGGTGTTCGA  
ACCGAAATTGAGTAGCCACAGAGGACCAGCAACACCCCGGGCATCCCGGTGGGGGCCACTGGGGC  
TCCGGAATGTGATGCATGTGGCAGCTGCTCCCAACAAATGTTGCAAAGATCAGAGTTTTTACGATGA  
CCTCTTGTCTTGAAGAGGGTATCTTTTACAGAGGTAATGAAAGTTGTCAACATATAGAGTTGAGTTGT  
TGATCTGACAAGGAAACCAGTTGCTGGTCTAGACAGCCGGAAAAAACGGTCAGAATTTGAGATTGGCT  
GCTTCTTGTGACAGGATCTTCTGCAAGCGCTAGGAATACAAAGAATTGGAATAAACACTTTTGTACA  
TTATGTTTCTATTACAGACGACTCTCTACAGAGTTCACAAGCATCAGCTCAAATACAGGGAACCTGAAAT  
CAGACACTCTCACGGCATCTTAATGAAGGACATAGAAGATGCAATGCCAGGAGTTCTTAGTTACGTGATC  
AAGAGATCTTAACTGGTTGATGTTAAGTACATCTGAACAAGCCAGGCAGTTGATCAACAGGTCTGG  
TTTTGTCTGCTGCTACACAATGTTAAGTGTAAACTCCAACACAAGTGCAGAGACTTTATGACATGA  
CAACACCTTTGGCTCGACATTGAAGGACCAGCCACTGACCCTGTTGAGATGGCATTATTTCAACCTGCA  
TTAATGATGGCAATGAGACTGACTGCAACAAGAGCAATGTTGAGAGCCTCCTGCAAAAAGGTTGGTATTT  
ACTAAGCTGATGACCAGGTTAGTTGAAGACTTCTCAGAAGCTGTGGGTAGTTCAATGAGATACATGCT  
GATAAATTTGGTACTGGTTGGAATTTCTCAAATTTCAAGGTGGCATTGAGCAGATCTTAAATGACCTGC  
GGATTGTTGAAAAGAGACCCACCATTGAGAAGGACACAGTCTGGAACCTCAGTGTGCAGTCCGATTTGA  
GCTAGGACCCAAACACCCAACTCAAAGAGTTGCTCAATGAAATACAAATGATGTCCTCAAAGAAGAGGCC  
TCCATACCGGAGCGCTTGTGATAGTAGTCTTCAGGGACTCACAGAGTCTAAAATATTACAGACTTTCAA  
ACTCCTCATAGGGAGGTAGGGAGCTTGGGACTGTTGACACCTCAGTTTGGTTGGCAGTGATACTTACA  
CCCCATTTGCTGTGATCCATACTATAGTTAAGAACCCTTCCCGCACATTGATAGTCATTGACAAGATTG  
TCAGGGTTTACTTTCTGAAAGTTTCTCTTAATTTCCCACTTTCTAAATCTCTTCAAACCTGCTGAAAA  
GGACAGGATTCGACTGCCTCCCTGCTTAATGTTAAGATATCATCACTATCAGCAAGGTTTTCATAGAGCT  
GCAGTGGATACTTACAGAGAGGACATCTGTGCGAAACTGACAGCAGGAGATTGAGACAGTGTCTGCAAA  
CGGTAAGAGAACCACCCAAACCAAACTGCAAAATCATTCTAAACATAGGCCTCTCCACATTTTTGTTCA  
CTATCCTGTTCTATATAGTTTAAACATAACTCTCAATTCTGAGATGATTTTCACTCCATTGCGCATCAA  
TTAGTCTAGCAACTGAGCTAGTTTTCTACTGTTTGTAAAGCCAGACAAACAGATGATAATCTTCTCA  
GATAGTGGTCATGGCATCTAACCAAGCTGTCAAATTTCTGCCAACATGATTTACAATTTAGAGGACCAAG  
AACTTGAGTCCCTCAATCAGAACCATTCTGGGTTCCCTTTGTCCCAGAAAGTTGAGTTTCTGCCTTGACA  
GAGAACCACCCAAACCAAACTGCAAAATCATTCTAAACATAGGCCTCTCCACATTTTTGTTACCACCT  
ACAACTTTGTGAGAAGAGGGACTTCTCCCCCATACATAGAATCTAGATTTAAATTCTGCAGCGAACC  
AGGTGGTGTCTGGCAAAAGCTCTGCTCTGCCTGTATTGCTGGTGTCCCTTTCTTCTTTGGACTTGCCTTG  
TGCTCACAGAAGGCTTCAAGTTGCTCTGATGCTTGTGAACTTGAGTCTGTGAAGCACAGCCTGCCA  
GCACAGTGGATCCTAGGCGACACTTGCCATGTAATGTAATGTTGCAAGGTTGAAAGGCTTATTAGAAA  
GGTCAGAATCTAAGACTAGCAAACCTGACTGAAATGCAAGAAGCAGTGATTAAGAGGCTGTAAAGAAGT

MACHUPO\_VIRUS\_PROBE04  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE05  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE06  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE07  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE08  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE09\*  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE10  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE11  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE12  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE13  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE14  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE15  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE16  
MACHUPO\_VIRUS\_PROBE17  
CHICKEN\_ASTROVIRUS\_PROBE01  
CHICKEN\_ASTROVIRUS\_PROBE02  
CHICKEN\_ASTROVIRUS\_PROBE03  
CHICKEN\_ASTROVIRUS\_PROBE04  
CHICKEN\_ASTROVIRUS\_PROBE05  
CHICKEN\_ASTROVIRUS\_PROBE06  
CHICKEN\_ASTROVIRUS\_PROBE07  
CHICKEN\_ASTROVIRUS\_PROBE08  
CHICKEN\_ASTROVIRUS\_PROBE09  
CHICKEN\_ASTROVIRUS\_PROBE10  
CHICKEN\_ASTROVIRUS\_PROBE11  
DUCK\_ASTROVIRUS\_PROBE01  
DUCK\_ASTROVIRUS\_PROBE02  
DUCK\_ASTROVIRUS\_PROBE03  
DUCK\_ASTROVIRUS\_PROBE04  
DUCK\_ASTROVIRUS\_PROBE05  
DUCK\_ASTROVIRUS\_PROBE06  
TURKEY\_ASTROVIRUS\_PROBE01  
TURKEY\_ASTROVIRUS\_PROBE02  
TURKEY\_ASTROVIRUS\_PROBE03  
TURKEY\_ASTROVIRUS\_PROBE04\*  
TURKEY\_ASTROVIRUS\_PROBE05  
TURKEY\_ASTROVIRUS\_PROBE06  
BAT\_ASTROVIRUS\_PROBE01  
BAT\_ASTROVIRUS\_PROBE02  
BAT\_ASTROVIRUS\_PROBE03  
BAT\_ASTROVIRUS\_PROBE04  
BAT\_ASTROVIRUS\_PROBE05  
BAT\_ASTROVIRUS\_PROBE06  
HUMAN\_ASTROVIRUS\_PROBE01

AGCGATGTTCCAGAGCTTCTGTAGAAAAACAGGAATCTCCTGAAAGAAGCTGATAAGCTGCCCCATGTGT  
GCGCTTGGCTCCACGGGAACCGTGATGGAAGTTGGCAGTGGTTCCAGCATATGTGACAAAGTTCAGAAT  
TTCTGCTGGAGACCTTTGTAAGAGTAAACCCAGATGAGTTTCGAGAAGAAATGAAAAGCTGACATGTCAA  
CCACAAGATATGGTGATTACAACCTCAAGGTTCTGACGACATAAGGAACTTTTAGACATTATGGACGGA  
CAGCAAATTTGGGAGAAGTTTGGACATCTTTCGAAACATCATAATGGAGTTGTTGTAACAAGAAAAAGA  
GGTGTGTTGTGTTGGGGGCCCTTCTGAGGGGCTTGTTCAGTTGCCATTATGGGGGACTCTGTGCTGT  
GTTCCAGAAGTGGTGGTTCAAAGGCTTGCAGTGGGACTCTTCATTAGACTACTTAGTGGTGAGTCAGATGC  
GGGAGATCTTGGGACAACACAAGTGTGATCTAACAAAGAAACCTCAAGTTGGACCGAGACAACCCGAGA  
AAGGGTGACTGACTGGAACCTCAGTGTGTAGGCCTATTTTGAATGTGCCATCCGAGCAGGACCTCCCTGCT  
AGTGGTTCCAGCATATGTGACAAAGTTCAGAATTCCTGAGCATTGTTTATGACATCTTAGGCACAAAT  
GTGATCCAAAGAGATTTCTTCTGCCTGTTTTTCTGATGAAGTTTTGGCTGGAATGTGTGAGGAAATGAC  
TTAAATTGGTTC AAGGATGAGGTCTCCAGCAAAGGCTGGGCAAATTC AATTGACTGACAGAAGGGA  
TGGAGGATCCATAAGCCAGTCATGTCCCAAAGCATTGAGAACCAATGAATAGCCCAGCTGTAGTCAGAC  
GTGTCCGCAAACCAACAACATTTGCAATTGTAGCGGCCATAGAGGCTGGGTGGGGCTGTTCTCTGAAC  
TCGCTTTGGTCTTATGTTTCTGCCACGAACGGTCTCTTAGTCTTACCTTTCTTCTCTCGAGGGCAAC  
GTGAAGCAAAGGAAATCCTAATACCGCCCATGACCTTACGAACAATCTCATCAGCGAGGTCTTCATCAGA  
TTGAACGCCTAGTGAGAAAGAATTTACGCAGCTCACGCATTCTTTGGAAGAGCTGAACCGGAATGGTGCC  
CCTTGGCTTGAGATGTTAAGCCTTTCCAGGTGATTTAGCTATTTTTGCTTCTCCAACAACATGGCCTGC  
CTCCAAATTTTGCAGATTTCCAGTAACCTCGCTTGTGAGCTGGTATTCTGTGAGAAGAATTGTTGAACC  
CAAGAAGGGGGTCCAGCCCACCTGAGCATGATCGTTTTCTGTTCTCTCCATGCGCTCATTGTTGTT  
TTAGATAACGGAAGCCGAACCCAGCCGTTACAACAACCCAGGTAGTACTATTTGGAGTCAAGAGGAA  
CGCCAATAACCGACCCCGGAGTGAGATGTCATCGTCCGAGTCCGGATCAGATTTTGCATCCACCCCAAT  
GCGTCCAATCAAGTTCTAGGACTTGGGTCTGCCACAGGACGTAATTCTCCTGACACGCTTATCCAGTCC  
TAGGTGAACCCGATGTACCTGCATAGGTTTCAAGGGAGCATTAGGTAATCGCCGTC AATATTAGCCCA  
ACATCCCAAAGATATTTTATACATATCAATGGTCACTGAGGGTCTAGTTGACAAAGGATGGATTGAA  
CCTGCCCATTTTCTGGCTCTTCATCATGAGTGGATTGAGGAAGTACTTGTGTTTTCTTCCAGAACATT  
AGAAAAACCTCATCTGTCTTATGCGGTAGAAAAGCGCTTTTGGGATTGTACCGTCAAAGCGGTCCAGTC  
TAATTTTCACTGCAGACCAGCCTTATCAAGCATTCTCTGGTATTCTCCTCTGCCAAGACTTTTCATTT  
ACAACCTACCATAAACATCAGCATAAATCACGTTGTACTCAGTTTTATTCAACTCAACTGCCTGTGTTGT  
CATTCTCATCAGCATTGCAAATTTGACTGTTCTTATATTGTTTTGGAAGGATGTTTGATTATCTGACAG  
CAAAATTTATTGGATCTCTATAGTAAATTTTTCAAACATTTTGGTATATGCTTCCACAGTCCAAGTAGT  
TAGAAAATTGTCCAGATGGATTGCCACCATAGATCTTACAAACCTCACCTGTAGGGAGAAGGACAACCTT  
TCTGCATCTGCAAAAAGTGGTCACCAGCACACAGGCACGGGAAATCCAACCAACTTGGCATAGCCCAGTT  
AAAATTTACGGAAGATGCCTACAGATGTGTCTTACCCCAATAGCAGTTGTGATATCTTAAGATACAC  
TTGTCAATACCAACGAGCCATCTGACAGGTTTGCAGCGTAACCTGGCTGTGTGGTGGTGATTTTCTCATT  
TAGCATCAACTTTTCTTTCGTCCTGGCGCGCTTGTAGTTAGATTCCGCTCGCATCGCCCTTGCAT  
TGGCCCTTCTATGTATACCTCCAAAAAAGGGGGACCACCAACCTGGGCATGATGATTTTCAAGTTTCCAA  
CTGGATGAAGGAAGAAATTAAGCTCCAACCTCGGCATTGTGAGTTGATTGGGCCAATCATACAAAAGT  
AAAGGGCGACCATCCACATTGGGCTTGCTTCCATTTAGTCATATTTTTCATGCGGTTATTTGATCCTGT  
AGTCCAATCGAECTAATGTACTTATTCCAGGAATATCAAGCCTTGATATTAATTCGTGGAATCCGCC  
AAGAGAGGCATGCGCCTCCTCAAACCAGGTCTTAACCGGATCGTCATCCGGAAGATTATGTGTTAAAATC  
TAAGATAACGGCTTTTCCAGAACGGGAAACCCGGAACCTTCTTACAAACCACCAACCACCTTAAT  
ATTAACAGGCTCTGCATAAAAAGAATTTTTCAAACCTTTAGCATAAAGCACTATAACCCCAAGTGGT  
TATCCATTGTTGTTGAAAACCTGACCAGATGGATTACCTCGCGCTGCAAGGTGACTTACCAGATGGTAG

HUMAN\_ASTROVIRUS\_PROBE02 GATAAGTTGCCCAATCAGCGAAAGCACACAACCTGTGGATATTCTGAGAAAAAGTCAATTGGTTCTGCATA  
HUMAN\_ASTROVIRUS\_PROBE03 TCACTCTCTCCTCATAATCATCGGGCACC GAAGGTGTTGTAGAAAGCCTGTCATCTCCATAAACTACAGT  
HUMAN\_ASTROVIRUS\_PROBE04 CCTTAAAGGGGTGGTCCTCTGCCATGAACGCAGCAAGCAACTGATAGCATAGGAGTTTCCCATGGAGTGA  
FELINE\_ASTROVIRUS\_PROBE\_01 CGGACCAGCTTGTGAAGAGGGTGTGACGTGGGGTTCAGGGACACCCTCACAACAGTACCATTAACGGC  
FELINE\_ASTROVIRUS\_PROBE\_02 CCACTTCATCGTCTTCGTCCTCGTTACTCTCGGTTTCAGTGTCTGTCTCTTCATCGCTTACGCTCCCTCCC  
FELINE\_ASTROVIRUS\_PROBE\_03 CGGAAGCTCGGTAAAAATACCTACCCTGGGCAGTCCAAGTATAGTTAGGTGTGTCGCCCTTAGTCCGAAC  
FELINE\_ASTROVIRUS\_PROBE\_04 TAGGGGTAAACCCCGTAGTGAGCAGGTCCATGTACACACCACGCCTAACCTTCTCGGCTAGGGTGGGGTA  
FELINE\_ASTROVIRUS\_PROBE\_05 CGCCAGCTGGGATGCCACCTGTACAGATAGCAGGTTTGTGTTGACAGGGCATCCTGATAGCTGGGATAGAC  
FELINE\_ASTROVIRUS\_PROBE\_06 CACCTATAACATTGAGCACATCACCAGGCTCCGGGGTGGATATGCCGAAAGTGACGGGCGTCTCTCCATG  
MINK\_ASTROVIRUS\_PROBE01 TGGTTGTTGAAATTTGACCTGATGGGTTGCCCTTGGTCTGACGGGTGACCTACCACTGGGCATTAAGAC  
MINK\_ASTROVIRUS\_PROBE02 CGAAGGATGTGACATCAGCCCAGCGGACACGGACAGTAGTGTCCGCGCCAACAACGTGGCCAGCAGTGAC  
MINK\_ASTROVIRUS\_PROBE03 AATTCATGACATCCTGTAGATGGAACCAAGTACAGCATCGACCCAACCTAAGGGAGTGCATTTGACCTC  
MINK\_ASTROVIRUS\_PROBE04 GGTGGTGGCCCTTCTTAGTGTGGTCAAAGCGATTGGCCATGACCGGTTTGTGTTCTGCGCATCGCCAG  
MINK\_ASTROVIRUS\_PROBE05 CCGGTAGCTCTTCAATGCTCTTCTCTGGATGGATATAGGCATACTCAAATGCCCTGGAAGAACACGTTGCA  
MINK\_ASTROVIRUS\_PROBE06 TCATGTTCCAGAAGTCTGCAAGGGCAACCTGGAGGCTAAAAGATTTAACCTCTTCCAATGCAAAACACAC  
OVINE\_ASTROVIRUS\_PROBE01 CATACTCATGTCTGATGATTTTCATGTTCCATTCTAAGCTGACTTAATTGACTCTTCAGGTCCTCAACCTC  
OVINE\_ASTROVIRUS\_PROBE02 GCTTACGCGCGCCGAGACCACCCACGAGGTGGCCCGAGGGGACTGGGTGAGATTGAGGGAGGCTCTTGT  
OVINE\_ASTROVIRUS\_PROBE03 CCTCTGGGATGTCTGCACCATAAGCCACTGGCTCAGTTAACTTAAATAAGTCTGGGCCTGGTATGTGGT  
OVINE\_ASTROVIRUS\_PROBE04 AAAAAAGATTTGCCTCATCAAAAGCGGTCACTAATGAGCCTTAGCAAACCTTATA  
PORCINE\_ASTROVIRUS\_PROBE01 ATTAAAAAGTGGCTGCTTTACCCACAACCTATATCTATGTGGCGTCCGCGCCAAGACCAGACCACCCAGT  
PORCINE\_ASTROVIRUS\_PROBE02\* TGCCCTCGAGTTCTTCCCGCTGGAGTTGGTTCCAATGTTGCCAAGGGTTGCTGTTGCCCGTTGACGG  
PORCINE\_ASTROVIRUS\_PROBE03 GAAGCGTATTCGCCACAGTGAATACTGTGCCCTAAAGCAACGATCGGACCAAACGTGTTATTCCTGTA  
PORCINE\_ASTROVIRUS\_PROBE04 TTGAAAGCTGTACCCTCGTTCTACTCGGCGTGGCCTCGGCTTTCAGAAATGGGTTCTTAAAGGAAACC  
PORCINE\_ASTROVIRUS\_PROBE05 TTTGACGCTTCGGACCAAGCACTGCTGGGGCCGAACCCGCAATCAGGCTGTCCATAAAGACACTCCTC  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_5\_PROBE01 CGGTTCCGACGCGGTTTACGTAGGCTACGCAGGTATTTGACGTGTAACCCAGACCCATGTCTACGGTGTT  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_5\_PROBE02 CACCATGACGACTCGGACGCCATCACGGACGCCGAACCTCATGGATCACACCAGTCTGTACGCGGATCCCT  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_5\_PROBE03 CTCCGCGCGGCCGAGCCGCGCCTGCGAGGACCTCTCGGAGCTGTGCGAGAGCAATATCATCGTCATC  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_5\_PROBE04 TAAAAAATTGTGCAAAAAACACGGCTCTGAAAAGTTGCTTTGATGAACCGCGCCGTGCGCTTAGCAT  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_5\_PROBE05 GTGACACAGCAACGCTATTCTGTTTGGGACCGTCTGACCTTTGCTGTAGTGGTGGGCAGGATAAAATC  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_5\_PROBE06 CATAAGGGTACATGTGATAACCACCGAACCCGCAATATACACCTTGGTGGCGGCCGTGCTGGCCGGAT  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_5\_PROBE07 TTGGCCGGTTCAACGGTTGCCGGTCCGACTACCTGTACGCTTCCATGTTACGCGGCAGGTGCGTAA  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_5\_PROBE08 CGTCTACGCGGTAAAAATGCGGTATGCGGCGCGCCGACCGCCATGGGTTCTGCTGAAAACGACACT  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_6\_PROBE01 GCTCAACAGGGAATTGGGGCAGAAGGCTGAGTACACGGAAAACGGTGTTCGTTGCCAATTATAAAATTCT  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_6\_PROBE02 CGTCAAGCTTTCGGTGACAATTTTGGGGTGAAGTCTGACTTTTGGCAGTTGCTTTTGCATGTTCCAGT  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_6\_PROBE03 TTTGTCTGGCGTACGTTGAGAAGTCTGCAAATAGTTTTCTAAATTTGATTTAAAGTGATGTTTATAAA  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_6\_PROBE04 TTTGAAGAAGAAGATGGGATGTGTCTGTGTCTGATGCTTGGAAAAATTTTTTCCAGCGTTGATGAGG  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_6\_PROBE05 TACACTTTCATAGGAAGTAAATACAATAGTAACTTCTCTTTTTTATATCGGTTTTCGGAAAAATGGGTG  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_6\_PROBE06 GTCTTTCTACCAGATCTACCCCTTAAAAATTAAGCGAATCATCTGTCTACCAATGTATCTTTTTT  
EUROPEAN\_BROWN\_HARE\_SYNDROME\_VIRUS\_PROBE01 CCGGTGTTCTTACGCAATCTGGGCCACACTTCTTATGGGCTCTGCTTTTACGAGACAAAGTCAAGTGGT  
EUROPEAN\_BROWN\_HARE\_SYNDROME\_VIRUS\_PROBE02 ACAGGCCAATCTCATCAGATGCTTTATAAACTGCTGCAGACCAAAGCAACCAATGACAAATTGAGTTGAT  
EUROPEAN\_BROWN\_HARE\_SYNDROME\_VIRUS\_PROBE03 CATCTATCTTTGTGCGAGTCTGAAAATGTTTTCTTGGAGACCATAAGTTGTGATGGAAGCTCTCTCCAGTC  
EUROPEAN\_BROWN\_HARE\_SYNDROME\_VIRUS\_PROBE04 TTGGGGTACGGCGTACCTCCGTCATCACCATAACAAAGAAGGGAGCATCCTCATAAAGTTGGAACA  
EUROPEAN\_BROWN\_HARE\_SYNDROME\_VIRUS\_PROBE05 TCCCAAGTACGAGCTGTGGATGCTCGCAGCAACCTTTTGTGACGATTGAGCACTCCCATGTTGGT  
EUROPEAN\_BROWN\_HARE\_SYNDROME\_VIRUS\_PROBE06 TAAACAGTTCAACCCAGTCTCATCACCATTGTGTTGAACTCGTCTGCAATGGCCACATCCTCACCAGT

RABBIT\_HEMORRHAGIC\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE01  
RABBIT\_HEMORRHAGIC\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE02  
RABBIT\_HEMORRHAGIC\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE03  
RABBIT\_HEMORRHAGIC\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE04  
RABBIT\_HEMORRHAGIC\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE05  
RABBIT\_HEMORRHAGIC\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE06  
RABBIT\_HEMORRHAGIC\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE07  
RABBIT\_HEMORRHAGIC\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE08  
BOVINE\_ENTERIC\_CALICIVIRUS\_PROBE01  
BOVINE\_ENTERIC\_CALICIVIRUS\_PROBE02  
BOVINE\_ENTERIC\_CALICIVIRUS\_PROBE03  
BOVINE\_ENTERIC\_CALICIVIRUS\_PROBE04  
BOVINE\_ENTERIC\_CALICIVIRUS\_PROBE05  
BOVINE\_ENTERIC\_CALICIVIRUS\_PROBE06  
BOVINE\_ENTERIC\_CALICIVIRUS\_PROBE07  
BOVINE\_ENTERIC\_CALICIVIRUS\_PROBE08  
BOVINE\_ENTERIC\_CALICIVIRUS\_PROBE09  
BOVINE\_ENTERIC\_CALICIVIRUS\_PROBE10  
NORWALK\_VIRUS\_PROBE01  
NORWALK\_VIRUS\_PROBE02  
NORWALK\_VIRUS\_PROBE03  
NORWALK\_VIRUS\_PROBE04  
NORWALK\_VIRUS\_PROBE05  
NORWALK\_VIRUS\_PROBE06\*  
NORWALK\_VIRUS\_PROBE07  
NORWALK\_VIRUS\_PROBE08  
NORWALK\_VIRUS\_PROBE09  
NORWALK\_VIRUS\_PROBE10  
NORWALK\_VIRUS\_PROBE11  
NORWALK\_VIRUS\_PROBE12  
SAPPORO\_VIRUS\_PROBE01  
SAPPORO\_VIRUS\_PROBE02  
SAPPORO\_VIRUS\_PROBE03  
SAPPORO\_VIRUS\_PROBE04  
SAPPORO\_VIRUS\_PROBE05  
SAPPORO\_VIRUS\_PROBE06  
SAPPORO\_VIRUS\_PROBE07\*  
SAPPORO\_VIRUS\_PROBE08  
SAPPORO\_VIRUS\_PROBE09  
SAPPORO\_VIRUS\_PROBE10  
SAPPORO\_VIRUS\_PROBE11  
SAPPORO\_VIRUS\_PROBE12  
SAPPORO\_VIRUS\_PROBE13  
SAPPORO\_VIRUS\_PROBE14

TAATGCCATTGCTAGCAGGATTATACACATTATAAGCATTAACTACACTAGCATCATTATGCATATTGCT  
TAACTTCATTGGATTAACCTAATCTACCTAACTGGTCGGCTTTCAAACCAACCCATTCTCCAAAGC  
ATGGTCCCCAGTTTGTGGGGTGTGAATATGACAAACCAGCTTGGCACCCCTTTGACCCAACAGC  
AACAAACATCCTACCGTTCCACTCACAGACCAGCTCATCAACCCCTTTTCATCAAACCTGATTTGGGCAG  
TGACCAAGGTGGCTCAATTCATTTGGCGTGTATGACTAATCCAGTGGACGCCTATGGAACCTGGTCAG  
ATGGCTTTTCTATGTCTGAATTCATCGGATTGGGACTTGCAGGTGCCGGTGTCTGAGCAATGCATTGC  
AGAGCTGCAACTACAAAAACAAGCTATGGAGAATGGGTTGGTTTTGAAAGCCGACCAATTAGGTAGGTTA  
CAACTGCTGGCTGCCTCATCTTCATGGCTTTTGTCTTTTCCACTGTTGTGCGGTACCTGCCCAACAACAG  
CCTCCACCTCCACATTCCGTGCATCGCCATGAACACGCTGGAGCTGGGGATGGGGAAGCTCCACCCGCG  
CCATGGGATGGTAGAGGGAAGTCCGGATGTCTCCAATGTCACCTCAAGCGGCACACCCGCCACGGGCATC  
CAACGGCAAGCGTGCCACCGATGAATCCTGACCCAGCAATGGTGATCCTGATGTCCATTCCACCAGCCCA  
TTCCACCAGCCCAACCTCCATACATTGCAGCAATGTGCTGGGTGTAGGGGTTCATGCCCGGCCGAGCCG  
CGGCAAAACCCGGCAGGCCGGATGACATGATCGGCCCTCGGGACATAGCCCTGCATGATTTGGACTGCCCG  
GCTCGTACGAGTTCCCGCAACAAGGATGCAGTGTGCACCAACGTGGGGCCCCACAGGACCAAGCATGT  
CCTCCGGTGAGGTGGCGAGGGCCACTCTGGTGAGGAGCTGTGAGGGTTCGGCCGAGGCCACTCTGCGGT  
TACCGGCCAGCTGCGCAGGACCAAGCCAGGTGCCATTGGCAAGCATAACCGAGCTCAAAGGTTGAACTGGA  
CCAAGTCGTCCGCCCACTAGCGGTTGCATTGAAATTGGGCATTGTTCCAGTGAACCCAATGGGCACGTT  
TGGTTCCTCGCCAGCAAGGTTAATGAAATACACCTGACTGAACCGTTCCGGGATGGTGTTGATTGCCGC  
TTGTACTGTCACCATTCTGATTCTATAATGTACACCCTTGACTGCCATTGTATACTGCATTTTGATAT  
CTTCAATAGTGGTGACTGCTAGCTTTTTGCCTAGGGAGGCCATGGATATGAGACCCAACCCGTTGGC  
ATCGCTATTATTTGCCAATAATGGCAACCTGTCTGTATTGAAATAACCAGGTGCCACAGACAGCATGT  
TATAATCCACCTCTCTGTATCATCTGCCATTCTTTTGGCGGGTCCAGTCAATGGGCTTACGTTT  
GGGCCGCTTCGCCACCAACCTGTATGCCCGCTCCAGAGCACTACCTGCTGTGGAAGCAGCAATTGCACC  
ATTTATAGAAGACCCTGTGACGGATTTCCATTTTCAGTTTCTCCTATGCCACCATCACCACTGCCTGTAC  
TCTCCAGAAGTAGCTGAGGTTGTAGCCAGGACTTACTAGCACCATCCGAGATGGATGTGGGCGACTATG  
TAGCATAAATCACTGGATAATCACCTTTGTGCATTGTCTGAGGCTACTGGCTTATCACCTGATGTGGTA  
TGACATAGACTTTGACCCAACCTCGCTCACCCAAATTCTCAAGGAATACGGCCTCAAGCCAACAAGGCCA  
CGACCATCTCCCGGACGCAGCGGGTCCAAGGTAGACTGGATAGAGCCTCAATTGAACGTCAAATTT  
CTTCTAGGAGAAGCCTCACTCCACGGGGAAAAATTTTACAGGAAAATATCTAGCAAAGTCATACATGAAA  
GATGCGCTTCCATGACCTCGGATTGTGGACAGGAGATCGCAATCTCCTGCCCGAATTTCGTAATGATGAT  
CAGGGGCAGGTGGGACCATAACTGGACCCTTTCTTGAATGCACCTCAAAGAAGCTTGCATAGATTGTAG  
GGCGGTGTTGTGCCACAATGGATGATACAGTACCAGCCATGTCCACGAGGGACCCGGCTGCAAGAGCTGC  
CTTCCCCTGTAGAAATGGGCGATCCAGCAGGCCATACTGGACTGTTTCTGTGCTCCCGGCCAGCCGTCG  
CAGGGGTGAAACCTGCACCTACCAGCGCCCGGGTCAATCGGCACCTGATGCAGGTTTTGATGAAGTGAGTG  
GACTCTCCATCAATGGTCCAGCCCGGGTCAATCGGCACCTGATGCAGGTTTTGATGAAGTGAGTG  
GGTAGCGTGTGATCTGGGGGAATTTGGATCGACCCATCATGCATGCTGGCACTATGGACATAGCACC  
TCCATTCCGGAAACAGCGCCCCAACAGCAAAATCTGGAAGGCCCCAGGCCACAACCTGCACAAATCACCC  
GCTTGGTTCATAGGTGGTACAGTACCTGACCCAGTGGGTCACACTGAAGGAACCCACAAAATAGTGTGTTG  
GGTACAGTACCTGACCCAGTGGGTCACACTGAAGGAACCCACAAAATAGTGTGAGATGGAGGGCAATG  
TGTGGGCGGGTGGGGCGGTAGTTTTGAGGTCCGGCTATCGATCTCTGGTCTGGCGTGTTCGCTGGGCG  
GTGGGGCGGTAGTTTTGAGGTCCGGCTATCGATCTCTGGTCTGGCGTGTTCGCTGGGCGTATCATTGCT  
TATCATTGCTTCTGTACATACCACAGGGGTGATCCCTCGTCCATCAGGGACCCAGGCGTGTTCCTCAC  
CACCGGGGTTGATCCCTCGTCCATCAGGACCCAGGCGTGTTCCTCACGCTTTTCGTTCTCGCATCGCAT  
CGGCTGATTTGATTTCTGCCTACTAAGGCCACCAGTCAACAGATGGAGAATGGGTTTTACCCAGAAGG

FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE01  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE02  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE03  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE04  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE05  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE06  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE07  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE08  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE09  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE10  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE11  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE12  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE13  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE14  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE15  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE16  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE17  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE18  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE19  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE20  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE21  
FELINE\_CALICIVIRUS\_PROBE22  
RABBIT\_VESIVIRUS\_PROBE01  
RABBIT\_VESIVIRUS\_PROBE02  
RABBIT\_VESIVIRUS\_PROBE03  
RABBIT\_VESIVIRUS\_PROBE04  
RABBIT\_VESIVIRUS\_PROBE05  
RABBIT\_VESIVIRUS\_PROBE06  
BEAK\_AND\_FEATHER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE01  
BEAK\_AND\_FEATHER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE02  
BEAK\_AND\_FEATHER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE03  
BEAK\_AND\_FEATHER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE04  
BEAK\_AND\_FEATHER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE05  
CANARY\_CIRCOVIRUS\_PROBE01  
CANARY\_CIRCOVIRUS\_PROBE02  
CANARY\_CIRCOVIRUS\_PROBE03  
CANARY\_CIRCOVIRUS\_PROBE04  
PORCINE\_CIRCOVIRUS\_1\_PROBE01  
PORCINE\_CIRCOVIRUS\_1\_PROBE02  
PORCINE\_CIRCOVIRUS\_1\_PROBE03  
PORCINE\_CIRCOVIRUS\_1\_PROBE04  
PORCINE\_CIRCOVIRUS\_1\_PROBE05  
PORCINE\_CIRCOVIRUS\_2\_PROBE01  
PORCINE\_CIRCOVIRUS\_2\_PROBE02

GCACAGACTGGAGGGGGCCTTGTACCCTTTGCTCAAGAATTTTGTTAAACTGCTCTACTTGGTTATTTAA  
TCAATTGATCATCAAAAAATTTGATTTGTGTATGAGTAAGGGTCAACCCTAAAACCAGCAGCACGTGC  
CATCCATCCAGTGTGCAACATTGCAAGAACCTTGTACGGGGCAGTAAGCACATCATATGCGGCTGTGAT  
GCGTAAGGTGACGACGAAGAGCCCAGGCCAAATCAAACACCGAATTAACGGTTACCACATGTTGATTGGC  
TTTCTCTTACTGCCTCTACATGGGAATTCAGTTGGCAAAAATTCGGCTTGCCTCGAATATTAGGAGCA  
AAATGTCAACCGCTGCTGATATGGCATCTGGGAAAAGTGTGGATTCTGAATGGGAGGCTTTCTTCTCCTT  
ATGGCATCTGGGAAAAGTGTGGATTCTGAATGGGAGGCTTTCTTCTCCTTTACACCAGTGTCAACTGGA  
CTGAATGGGAGGCTTTCTTCTCCTTTACACCAGTGTCAACTGGAGCACATCAGAGACACAAGGGAAGAT  
AAGCTTTATGTCGCTTGGTCTGGATCTGTTGAGTAAGGTTTTCTATCTCTGGGTCTGGAGTCTTTGGAG  
TATCACCTTATGTCGGACACTGATACCACGTCACTAGTAATCATGGTGTATAATGATCTTATCAACCCTT  
TAACCGTTAATTCGGTGTGTTGATTTGGCCTGGGCTCTTCGTCGTCACCTTACGCTGGCAGGGCAGTTTCA  
TAAAACTCACAGTGTCCGTAAGGACTTTGTGCACTCCGTTAAGCGTACGCTTCAACGGAGGCGCGATCT  
AAGGATGATTTGGGGATGTGATGTCGGAGTTGCAACTGTTTGCAGCTGCGTTCAAGGGGTTAGCGATGCCATCAGT  
TGGGGATGTGATGTCGGAGTTGCAACTGTTTGCAGCTGCGTTCAAGGGGTTAGCGATGCCATCAGT  
GTTAGTGTGCATCAATTGATATCTTGGGTACTTCTCCGATCGATCCCCAATAGTTGATTGGGCGGCTA  
AGTTGCATCTTGGCCGCAACTTACTCAGCTTTGGAGCATTACAACAACCAGTTAATGGTGTGGA  
ATGGTGTGGAGGCGCGGTCTGACCAGATCGATTGAGTGGCATGACCGCCCTACACTGTGATGTGTTCCGA  
ATGTGCTCAACCTGCGCTAACGTGCTTAAATATTATAATTGGGACCCCCACTTCAAATTAGTGATCAATC  
GATTCGGCCATTTGTCTTCCAGGCAAATCGACATTTTGAATTTCAATCAAGAAACTGCTGGATGGAGCACA  
ATGGTGCAAAACTTGGGGTGGTGTGCAACTGATTTTATTGTTCCCTGGGATCCCTGATGGTTGGCCAGA  
ATGATGCTGTGATGTCGAGCAATGCGTACCAGAAAGAGCGTGGGGTGTAAAGAAAATTTCAACACTGCTTTCATCA  
TAATAGGGAAAGGGTCTGTCGCATCAGCACGCTTCCCGAAACTGGTGTGCTGGTGGGAACCATCCAATA  
CACTCCAAGGTACATTCCGGGCGCAAGGCCAGCAAACCTGACCCCCCTTGGAGGCCACCAGCCTCAGT  
CTGCCTTTTCAAGTATGACTTTCCAGGCGGCGCAGCGTTGGAATCGATCCTTTGATGTTGTGAGGACTTT  
GGTTGTTGACCATGATCCCGGTGAGGGATATGGGGCACCTTGGGTGCGATGCTCCAAGCGAAGCGGGCTG  
AGAGCAAAGACAGAAAAGCAGGGGTTGTTCAATCTGGTCCCAGGATGGGATGGTTCCGTCAGTCGAGCC  
AGACTGTTTAGCTGAATGTTGCCAGTTCACCGTTGATGGTGGGTTTTGGTTCTTCCGACAGGAT  
TCAAGAAGCAGAGTATCGCAGCAATGGCGTACCAGAATGGGTTGGTGAAGTCAAGTCAAGTCAAGTGTAAA  
CAGCAACAGCTCCATCGAAAGCGCGGTGACCGTCTCTCGCCACAATGCCAGGTAAGTATGACGTCCCC  
TTAACTGGCACTTTATGTGGGTAACGGTTCGAGAGGCGGAGCATCTCGCAATAAGGTAGCCACCCATAAA  
TTGCCACACCCCGGTGGCCCGTAAATGACGTCAACCTCAGTCTTAAAATCACGCGGGCGGGAACCAACCA  
CCATCATATCCATCCCACCATCCAGCGCATTTTATAATATTTGGTCCCAGGCTGCTCATTGGCCCATC  
ATTACCGCGCATTTTATAATATTTGGTCCCAGGCTGCTCATTGGCCCATCGACTCTTGGCCACACCCCGG  
GCTCCCCCGTTCCTTCCACATATTGCAAAGTGGAACTACCAGGGAGCAGGGCCCTCACTTTAGCTTC  
ACAATCAAGCGTGACCGACTGATGCTGTAACGTACGTCACGGCGGCCCTGTGGCTCAACAATCCAAATCC  
AATCAGGTTAGCAAAAGTGGAAATGAGACCCCTCAATGAAAGCTGGGAGGAGTGGAAAGGGTTCGGGCAC  
GTCCAATCATCAGGGCCAAATCCCTCAGACCACGCCATACTTACGCTAGATCTCGCTGAACTCTCGCGC  
GCCCTTTACCTACCCTCCAGGTACTTACCCCCAAACCTGAGCTGGACCAACAATTGATTGGTTCCAC  
TTTAAATACCCACACCAATGTCGAGCACACAGGCCTCGGCTATGCGCTCCAAAATGCAGCCACAGCCAA  
CAACTTTGTAACCCCTCCACCAACTTGGCCTATGACCCCTATATTAATACTCCTCCCGCCACACCATA  
TTATGTGGTAAGGCTGACTATTTATGTACAATTCAGAGAATTTATCCTAAAAGACCCTCTAAATAAATAA  
GTTCTCCCCCTCAGGCGGCACCAACCCCTACCCCTACCTTTCAATACTACCGTATTAGAAGGCT  
ATTGAGGATGGGGGAAAGGTTACGCAACTGGCCCCCTTCCCGTGGATTGTTCTGTAGCATTCTTCAAAA  
GGCATGGGGGGAAAGGGTACGAACTGGCCCCCTTCTCCGTGGATTGTTCTGTAGCATTCTTCAAAA

CHICKEN\_ANEMIA\_VIRUS\_PROBE01  
CHICKEN\_ANEMIA\_VIRUS\_PROBE02  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE01  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE02  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE03  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE04  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE05  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE06  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE07  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE08  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE09  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE10  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE11  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE12  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE13  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE14  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE15  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE16  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE17  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE18  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE19  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE20  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE21  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE22  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE23  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE24  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE25  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE26  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE27  
ALPHACORONAVIRUS\_1\_PROBE28\*  
PORCINE\_EPIDEMIC\_DIARRHEA\_VIRUS\_PROBE01  
PORCINE\_EPIDEMIC\_DIARRHEA\_VIRUS\_PROBE02  
PORCINE\_EPIDEMIC\_DIARRHEA\_VIRUS\_PROBE03  
PORCINE\_EPIDEMIC\_DIARRHEA\_VIRUS\_PROBE04  
PORCINE\_EPIDEMIC\_DIARRHEA\_VIRUS\_PROBE05  
PORCINE\_EPIDEMIC\_DIARRHEA\_VIRUS\_PROBE06  
PORCINE\_EPIDEMIC\_DIARRHEA\_VIRUS\_PROBE07  
PORCINE\_EPIDEMIC\_DIARRHEA\_VIRUS\_PROBE08  
BETACORONAVIRUS\_1\_PROBE01  
BETACORONAVIRUS\_1\_PROBE02  
BETACORONAVIRUS\_1\_PROBE03  
BETACORONAVIRUS\_1\_PROBE04  
BETACORONAVIRUS\_1\_PROBE05  
BETACORONAVIRUS\_1\_PROBE06

TCAAGTCCGGCACATTCTTGAACCAGTGCTTTCTGAATTGTCCGCAGTTGCAGATCTTAGCGTGGGAGC  
AACCAGTGCTTTCTGAATTGTCCGCAGTTGCAGATCTTAGCGTGGGAGCGCGAGCATTTCGCGCAGCCACA  
AGATGTTAAAAATCAAGACAATCTGGTTTTCAAAGCTGTAAGCAATTTACTTTTCAGACTTGTGTACGTCAC  
TTAGCTTATCTTCAAAGCAATAACCATGTGCATGGTATGGACAATACTTCACAAAGTAAACTCTGTGAGT  
TAGAGACCGGATGGTACACATTCAGCCAATTGTGGGTAATGCTTGGCACTGTTCCATTGGCAACGAGATC  
TCATTCACCAGCCATTTTAAATCCTTCAGCATAAAGATTTCCCTGATAGCAAAGTAAGAGTGACACCAGT  
CTGAGAACGATGTATGACAACCAATATTCAATCTTTTTATCTTTTGGTGTTCACCAACCACTCTAAGATA  
CACGAGAATTAGAACGACCGCGTCTCTTGGTGGATTCATCTCCCCAGCTGACACGTTGTCCCTGAGAGGC  
ATTGCTTTCCAACAAGTGTGTAGACAATAGTCTACTAGGTAATGCGACCATTACGTATTTTGGTAAATG  
ACTCAAGATGTCTTCCTTCGACAAGATGTTGCATATCTTTGTGCATGGTAAATCTGAGTTCCAATTGGAAG  
CAACCTCAGATGGCCGAGTGTATGCATTAATCTGCCTCAAGGAATTGTCAGTCTTAGGATCATCTTTGG  
TCCAATAACCAATTTGTTGATCCTTATTACCTATTTTTAGGGGAACAAAGTCTCTCGGACATAAGTCCCA  
TTCTTCCAAGCGCTAACACAAGAATTGCATTAGTTTCAGGGTTGAAAGACCACCAAGACTTAGTCCCT  
TGAGATTGAGAATGTGATTAAGTAATAACCTTTCAAATAATTGGAGTCTACCAATTAGTAAGATTAA  
TACGTTCCCTTAGATTTGGAACGAGATCTTTGTTGTTTTCTGTGTCAACACCTAACTTTTTGAGTGCAGA  
CTGGTTAAGGGTAAAGGGTTGAAGAATGAAAGAGGTATATCATTATTCTCCGGCCACGAGAATTAGA  
CCAAAATGCTTCGTCGGGATTATATGCCTTGGTTGCATAAAGGTCTTATAGGCATCATATGCATGGCG  
GTGTTACGTTAACTTGTATGCATTCATTATTTGTTGACTCAAAACTGTGTGGTATGAACATAACAACAA  
CAGGTAGTACTATAATAGTCTTACCCAAATTGCAACATACCATGCACAATTAATAACATTTAGCAATGC  
CAGTAGTTCGAGCTTCTAGAGCAGTTGTACCACACCTCTGTAGGGTAATAACCACCAACAACACTACAT  
CAGTACGTGCTTGTGTTAGTAATCACCAGTTTTAGATTTTACGTAGTAAGCCCATCCTGTGGCAGTAGT  
TATATAGCTGAACAGATCTCACAAAATACATCATCCAAAGTGCAAACGTTACAACCTGCACCTGCAACACT  
TAAGATCGCTCCGTTGAAGCATGACTCACAATCAGACGCTGACTATTGCGACATGACAAATCTGTATC  
CCCATTAAAGGCATCATATAAGAATAATATGATGTAACACAAGCGCAACCAAAACCCGGAGCAGTCTTCA  
TTACCGAACTCACATCTACCCTCTTTATATGTGAAGAAGTCATGCTCAGCAACAGCACCAGAATCTTTAA  
GAAGCACCCTTTAGTAATCTGGTTTCTGTCAAACCTCTATATAAGATATTAAGTCATTGACAGTTTT  
GTGATATGCGTGGCACAACATTAGAAGTCGCTGGCAGCTTGTAGACCTTTGGTGGTTAATCCTGTTTA  
TCATCAAACCTGAGAGCAAATCACTAGTTGCATGCAGCGTTAAAAGAGCATTCACTACTGGTGATTTGA  
TATGATGTTGATAATGATACAAAAGCAAATGATTGCAAACCTTGTTTCATCATTGAATATGATGGTG  
TTATATGCATTTGTAAGGGCTCACCACCTACTACCACCACAGAATCTAGTTTACTTGCATTTAGGGTAG  
GTGTATAAACTGCGCTATTACACAACCGGTGACAAGTGAAGCACAGATTAACCAATTGGACGAAGGTAAT  
AGTTCACCTTGAGGAATTTACCTAGACAAGCAACATCCTTGTGTAGATGTCAAAGCACGATACACATG  
TAGCCCATGCGTCAAAAAGTGACAGTGCCAACACAAGAGGGCAAAGTATCCATAGAATAGCCATCTTGAC  
ACAGTGTAATGGTAAATTGTCTAGTGTCAACACAGAAAGAACTAAACCCATTGATAGTAGTGTGATGATGC  
GCCACAACCGAATGCTATTGACAAAATACATTATCCACAGCATAAGAGTGTGCAAGCCATAAGGATGCT  
CACTACCGAACGAGGGTAACCAAAAAGATCTATGGTACAAGCACCAGCCAAAAGGCTGGTTGAAACACA  
TAAGCAGGAAAAAGAGTACGAAAAGCCAAAGTATAACATTAACCTACTAGACCATTATCATTCACTAATTG  
CTAATGTGACAACACCAACTATACCTTGTCAACCATTGCATCACAGAACCTAACGCATTTAAGCATAGC  
TGTTAAAATAGTATTAATCTTTGTCAAGCTCATAAAAACTTTAATAGTCTTAGGTGTGCTTGCAT  
CTGAGATATCACCCATCGTCAACATCATCCACTTTTAAAACATCAAATTTATTCTCATCAACCAATAA  
CCAAACAAACGCCAAGCAATATAATAGGTAAGGGGTACACACAAATTTGGACCATCAACATTCGCAAG  
GAACGTTAACATCAGCTCATATGAAATGGCTGATATAAACCAGAGGGCACTCTATAATAAAAACTTCT  
TGCAAAGGTGCGACACCTTAGCAACAGTAACATAAGCTGGCAAATCTGACAAAAGAAATAGCCGATG  
TTGTGGCAGTAAGAGTATGATGGTCTCAATAATAGGCCTAACATACATCTTACCCTCATATCTACACA



BETACORONAVIRUS\_1\_PROBE07  
BETACORONAVIRUS\_1\_PROBE08  
BETACORONAVIRUS\_1\_PROBE09  
BETACORONAVIRUS\_1\_PROBE10  
HUMAN\_CORONAVIRUS\_HKU1\_PROBE01  
HUMAN\_CORONAVIRUS\_HKU1\_PROBE02  
HUMAN\_CORONAVIRUS\_HKU1\_PROBE03  
HUMAN\_CORONAVIRUS\_HKU1\_PROBE04  
HUMAN\_CORONAVIRUS\_HKU1\_PROBE05  
HUMAN\_CORONAVIRUS\_HKU1\_PROBE06  
HUMAN\_CORONAVIRUS\_HKU1\_PROBE07  
HUMAN\_CORONAVIRUS\_HKU1\_PROBE08  
MURINE\_CORONAVIRUS\_PROBE01  
MURINE\_CORONAVIRUS\_PROBE02  
MURINE\_CORONAVIRUS\_PROBE03  
MURINE\_CORONAVIRUS\_PROBE04  
MURINE\_CORONAVIRUS\_PROBE05  
MURINE\_CORONAVIRUS\_PROBE06  
MURINE\_CORONAVIRUS\_PROBE07  
SARS\_CORONAVIRUS\_PROBE01  
SARS\_CORONAVIRUS\_PROBE02  
SARS\_CORONAVIRUS\_PROBE03  
SARS\_CORONAVIRUS\_PROBE04  
SARS\_CORONAVIRUS\_PROBE05  
SARS\_CORONAVIRUS\_PROBE06  
SARS\_CORONAVIRUS\_PROBE07  
SARS\_CORONAVIRUS\_PROBE08  
AVIAN\_CORONAVIRUS\_PROBE01  
AVIAN\_CORONAVIRUS\_PROBE02  
AVIAN\_CORONAVIRUS\_PROBE03  
AVIAN\_CORONAVIRUS\_PROBE04  
AVIAN\_CORONAVIRUS\_PROBE05  
AVIAN\_CORONAVIRUS\_PROBE06  
AVIAN\_CORONAVIRUS\_PROBE07  
AVIAN\_CORONAVIRUS\_PROBE08  
AVIAN\_CORONAVIRUS\_PROBE09  
AVIAN\_CORONAVIRUS\_PROBE10  
AVIAN\_CORONAVIRUS\_PROBE11  
AVIAN\_CORONAVIRUS\_PROBE12  
AVIAN\_CORONAVIRUS\_PROBE13  
BOVINE\_TOROVIRUS\_PROBE01  
BOVINE\_TOROVIRUS\_PROBE02  
BOVINE\_TOROVIRUS\_PROBE03  
BOVINE\_TOROVIRUS\_PROBE04

CTGCTGGTTGAGAAGTAGCAGTTTGCTTGGGTTGAGCTCTCCTACCTCTGGTTTGAAAATTTGAAGACTG  
CATCAAAGTCCCAGACAAATTCTGTACTTTGGCCAACCTCTAGTCTTGATCCAAGAAAAATGCACCTGC  
CACTGCCTACACAACCCAAAACAGAAGAAAAATTAATATCATCTACATTAATAATTTATGCCAGTCTTAAG  
TTGCATTAATAGGCTCAGGATCACAAGTGCATGCACATTGTATAGGATTAACAAGTGCAGATAAGATGT  
TATTAAGAACATCCATAGTAAACCCCAACCATTAACTTCTATATTGTACATTAAGAGAAAAATGGTATGCC  
ACGGTAAACGATAGTTACCAACTTTAGACTTAAACAAAACAGCAAAACCCTATTAACATCTAACTTATC  
TAAGCTGTTGAGAGACATAAGCATTAAAGCAGTTAAACGACCATTAATAAGCCTATCAACTCTGAACCTG  
TATCAATACACATAAGATTATTGGTCTCTGGATTAATAACTCCACCAACTGCCAGTTCTAATAAAAAAGCCG  
ACCAATATCCTTTTGTCTCAGAAGGGGGTACTCCGAAAGCAATGGGAACCTTGACCATCTGAAAATTT  
TAAATCTATGATAAGGATTAATAATTAACACCCTCATAAAAAATAATTTGATCACCTTCGCCAGTGAATT  
TACCAAGCTTTAACATTTAGCATTACAAAATTTTGAGAAGGTCTCTTTTACAAAACACTGTTGAAC  
TTTTAATTTTTAAATTAATATGGTTACAATCAGAACGACTATCACAAATAAAAACCAGTCATGGTT  
GCTTTGTCTTATGGAGGCAAATAGCCTTTGAGGGTAAAGCTTAAACAAATATTCTAAGGACACAGCCTTATA  
ACCCATAGGCTGGCCAAGAGGAACCTAACATTATTATAAAGAAATGCACCCTGCTGGGCAATACAGGAAAC  
TTACGCCACTTGTAAAGCTGCAACGCTAAACAACATGTGCGCAAATCAAGCAGTGCCTAGCAGACGC  
CAGACAAAAGAAACCCGGTGCCTAGCTTAACACCTTGCATGTAGAGGTGGCCACGAATAATAGTGGCTGT  
AGGTCTTAGGTAAGACCATACTAAAAGTATATTAAAATTTGGCGCAATGAATAATGCACCTGTCATCCTC  
GGCCACGAATAATAGTGCTGTAGTGTATGGTAATCCTCAATAATGGGTCTAACATACACGGTACCTTT  
GAGTCAATGCAAGATACCTGCAAGTGAGATCAAGACCCGGATCCTTAGCAGTGTGCCAACATCCAAGGT  
TGTCAGTTGAATCTGTGGGTCCACCAATGTAATGCGGGGGGCACCTACGTTGGTTTGATTGGGGTCCATT  
TACCGAGGTAAGCGTAAACTCATCCAGAACTCATGATCAACATCCCTATTTCTATAGACACTCATA  
CAGTACTAGTGCCTGTGCCGCACGGTGAAGACGGGCTGCACTTACACCCGAAAACCCGGTTTAAAAACGT  
CCCCTTAATAAGTGGTTTTGCGAGATCAGCATCCATATGGGACTCAGCAGCCAATGCCCTAGTCAAAGT  
GAGCTGTGAACCAAGACGCAGTATTATTGGGTAACCTTGGGGTGGCGCTGTTTTGGCCTTGCCCCATT  
TGCCGTGTGCCGCACGGTGAAGACGGGCTGCACTTACACCCGAAAACCCGGTTTAAAAACGTTGATGCAT  
CCCCGAAATTTCTTGGGTTTGTCTGGACCACGTCTCCCAATGCTTGAGTGACGTTGACTGTTTTGT  
GGTATCCAGTTGAAACAACAAAAGGAACACCATCTACAAATATTTTTCTACTAGTGGTCCAAAACCTTGT  
TTATGGATGGTGTATGTTTATACATATGACACAGACTGAGAGAAAACCGTGGTACATTCCTACTTGGTT  
ATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAAAGCCCTGGCTTATTTGTTAATGGTACTGCACAAGATGTTA  
ATTTTGTAAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTGTGTGATGGATCACCTAGAGGCTTGTAGCATGCCA  
GATAAACCCACCTAAAACCTGTGTGGGAAGTCTTTTCGACAAATATACTTATAACAAGGAATTGGTGGTGAC  
TACAGTTATGTTGGTGTAAACTTTGATTTTGGTACAGCTATGTATAGTGTGAAAACCTGCACCTATGCAGT  
ACTTAATTTTACTGGTTATAATGTATCCAATTTGGGTGGGTTTGTATTTGCCCTTGTCTACCCAAAAAT  
AGAATGATACTTTTCTTGTCACTTCCACACAGTTATATGAGCCTAAGCTTTTATCATATTCAGAAGTGGT  
GAGCACTCTGTGGTATTGTTAGAACATGGCTACCATTACCACAGAAACCATATCGCATGGATTGCGACTT  
AGCGTCTTGACTGGTCAGCCTTATAAGCTGCTAATTGAAGAGATGCTACGTAAGTTGATAATGCAGTCAA  
CACAAACACCAGTCAATGAAAAACCCCATCTAATATTAAGATGAATATTAACAAGCAAAACCAATTGC  
TAAAATTAAGTGTGTAACCTGTATTAATAGCTTCCGCATATTGCAGTAAACCATTATCTTCATTCTCATT  
TAACACCTAGAGTAAACAACCTTTGTCAAAAAGTAAGTCTTCAATAGTAGACCTACCTTGATTTGTGCCAA  
GACAAATTGTGGGAATGAACTCACATTACATACAAGTGACAAGATTATCGTACGGCAACACAACCTGCAC  
TATTGAACATGGGGCCGAAAACCTGGGTTACGTTGTCTACGGAAATCCAGGAGGAAAACCTGATGGGTACTG  
AAATGCTCTGTACAGCTTGAACCTGGAACCTGTAATATTCATTGTGTCCATACAATATGACTTTGTGGGATA  
ATGTAATAATTAACATCCAAACCTTAACATTAACAGAAATTAGTTGAAAATTTGGTAGGCAAAAACACCGGC  
TATACTGCTTACGTGGTGAATAATTCACACCCTCATAAAAAACCTTCTCCACACCACAATTAATAATC

BOVINE\_TOROVIRUS\_PROBE05  
BOVINE\_TOROVIRUS\_PROBE06  
EQUINE\_TOROVIRUS\_PROBE01  
EQUINE\_TOROVIRUS\_PROBE02  
EQUINE\_TOROVIRUS\_PROBE03  
EQUINE\_TOROVIRUS\_PROBE04  
EQUINE\_TOROVIRUS\_PROBE05  
EQUINE\_TOROVIRUS\_PROBE06  
HUMAN\_TOROVIRUS\_PROBE01  
HUMAN\_TOROVIRUS\_PROBE02  
HUMAN\_TOROVIRUS\_PROBE03  
HUMAN\_TOROVIRUS\_PROBE04  
HUMAN\_TOROVIRUS\_PROBE05  
HUMAN\_TOROVIRUS\_PROBE06  
HUMAN\_TOROVIRUS\_PROBE07  
HUMAN\_TOROVIRUS\_PROBE08  
HUMAN\_TOROVIRUS\_PROBE09  
PORCINE\_TOROVIRUS\_PROBE01  
PORCINE\_TOROVIRUS\_PROBE02  
PORCINE\_TOROVIRUS\_PROBE03  
PORCINE\_TOROVIRUS\_PROBE04  
PORCINE\_TOROVIRUS\_PROBE05  
PORCINE\_TOROVIRUS\_PROBE06  
PORCINE\_TOROVIRUS\_PROBE07  
PORCINE\_TOROVIRUS\_PROBE08  
DENGUE\_VIRUS\_PROBE01  
DENGUE\_VIRUS\_PROBE02  
DENGUE\_VIRUS\_PROBE03  
DENGUE\_VIRUS\_PROBE04  
DENGUE\_VIRUS\_PROBE05  
DENGUE\_VIRUS\_PROBE06  
DENGUE\_VIRUS\_PROBE07  
DENGUE\_VIRUS\_PROBE08  
DENGUE\_VIRUS\_PROBE09  
JAPANESE\_ENCEPHALITIS\_VIRUS\_PROBE01  
JAPANESE\_ENCEPHALITIS\_VIRUS\_PROBE02  
JAPANESE\_ENCEPHALITIS\_VIRUS\_PROBE03  
JAPANESE\_ENCEPHALITIS\_VIRUS\_PROBE04  
JAPANESE\_ENCEPHALITIS\_VIRUS\_PROBE05  
JAPANESE\_ENCEPHALITIS\_VIRUS\_PROBE06  
WEST\_NILE\_VIRUS\_PROBE01  
WEST\_NILE\_VIRUS\_PROBE02  
WEST\_NILE\_VIRUS\_PROBE03  
WEST\_NILE\_VIRUS\_PROBE04

TACACACACCATTGGCCATATAGGGCCGTCCAATAGAACAACCAGGTTTACCCCCACCGTAGCATGGGTA  
CAAAAGGCACATTTGGGGACGCCTGATTATATTGGCGCCTACTACCGCGTTGCCCGTTATTTGACGATT  
CTACACACGTTTCGGGAGGGAAAGTGCACCTTTCCGGAGGGCGGTTTGACCCGCTTGTAAGTACTAAATGC  
CGGGTGTTCGGTAATGTCAAGGGACTCAAATCCACAACAGATGACATCTTCATCAAATTCAGCAGCAGCTT  
AGTAGTTTAGAAAAGATGTAATCCAAAAAGTATGTTTACTCACTTTAGTCCCAAATAAGGGCCTGCAGCA  
CAACTGATAACTTTGTCCATATCTAAGGGTATTCTGGTAAAGTAGTAGTTGTGGATGTTTCGTTCC  
AGAACGACGTCTAAATTGTTGTTTCTTTTTCTTAAACCTCTATAAGCCAAATTATTAAGTGGAAAAA  
GGCTATACCTCGTTAGTCGCTTAAGCGCCTGCCCGTAGGGAGGTGAGGTTTAAAAAGGCTAAAGAACAAA  
AGAATGGTGGTTTACACGCTTCTGCTATTGCATCATCAGACTCGTTGCCTTCAGACCAAATAGACTGTAT  
CAAAAAGATAATCACAACATTATCATGAGACTCAGCTAAACCTATGTATGGTGTTCATCATTAAACCC  
GTGATTGAACCTTTGGTACAATCAGATCTACTATCACCAAATAAACAACAATTAATGTAATATATAATGG  
TATCAACACCCCTCATATAACAATACTACTGATTACGTGGTGATAAATTAACACCATTATAATAAACTTT  
GTAAACAAAACCTGGACCAAGTTGGCACAGTATCACTAAGCAAAGCAAAGTAGGGTTGTAGGCCAAGTA  
TAGAACGTGCTTTTAGTTGTATAAGCTTGTACAACACTGAAAATTGTTGCCATTTGATTAAGCTTAATATT  
TTTTGTCTAATTTTTTCAATAAATCATCATCATCCATGTTTTTTTCAATACATTATAATAATCATTCAA  
GTTTAGTTTTATTTGACAATTTAATTGTCGTATAGAAAAAGTTTATTATAATGGTGTAAATTTATCACC  
AAAAGCACGTTCTAGTTTTACAACACTACAAGATGTTGTGTGCTACTAATAAATACTTGCCTAACAAAC  
TGCCTGAAGAATTAAGACCACGCTTTTGATTTTGAATGCGTGATCTATTCTGACGACTGCGATTCTGATT  
GGCGTCTATTAGCACGCTGTAGGGTGCCTGAAGAATTAAGACCACGCTTTTGATTTTGAATGCGTGATCT  
TTTACCGGCTACTGGGCACTTACTGTAATTTGCCACTATTTAGTTTATGTTATGTTAATATGATGTTTG  
GTTATTTTTAAGTTATTTGATAAGCTTTTCAACACTCATTTTTTACCATTGAGGGGCTTGAAGAA  
TTATGAGGGCGTCAACTTTTACCACATAGAAATTATACCTGTTACCAAGAAGGCTCCTCTGGTTGGGTT  
TATTCTATGGCATCAACATCTCGCTGTATTAAGCTTATTAATTTAGATCCACCAACTAATTTTACCAACT  
TCCATTTGGTTATTATTATGAGTACCATCATTTTACCATGGATTTTACACTAATGGAACATCAGGTTTA  
TCACCAATTTGGAGGGGCTGGAATAATTTTGGCTTTTTCTCAGCCTTACATCTTTGGCAATTGCTTATT  
AAAGTGTTGGGCGTATCATCTCATCCACCCCTTTGGCTGAGAATACCAACAGTGTAACCAACATAGAAT  
TAGGAGTAGGAAACAGAGACTTTGTGGAAGGAGTCTCAGGTGGAGCATGGGTCGACCTGGTGCTAGAACA  
CTTTGGGGACAGCTACATAGTAGGTTGGAAACAGCGCATTAACTCCATTGGTTGAGGAAAGGG  
AGTTCCATTGGCAAGATGTTTGTAGTCCACATACAGAGGTGCAAAACGAATGGCCATTCTAGGTGAAACAG  
AACAGCTTGGGATTTTGGTTCCGTTGGTGGACTGTTACATCATTGGGAAAGGCTGTGCACCAGGTTTTT  
AGTGCAAAGTCCGATGGAGAAATTGAGAATCAAGGGAATGTCATACACGATGTGTTGAGGAAAGTTTTT  
ATGTGTTGAGGAAAGTTTTCAATTGACAAAGAGATGGCAGAAACACAGCATGGGACAACAGTGGTGAAG  
AACCATGGCCAGGGAAAACCACTTTGGATTTGAACTGACTAAGACAACAGCCAAGGAAGTGGCTCTG  
GCTCCGTGTAAGTCCCCATAGAGATAAGAGATGTAACAAGGAAAAAGTGGTTGGGCGTATCATCTCAT  
ATCGGCCTAAAAGCGCCTTGGTCGGGGCTAATGCTGTAACCTTGAAGAACGTGATAAGAGCCAGCACGAA  
AATGAAACATCTTACTAGTTTCAAACGAGAACTTGAACACTCATTGACGCCGTGAACAAGCGGGGACAGA  
TCCGTGTGCGGTCCAAACACATGGGGAGAGTTCACATAGTGAATAAAAAAGAGGCTTGGCTGGATTCAACGA  
TGAGAACTGGATCATAAGGAATCCTGGCTATGCTTTCTGGCGGCGACACTTGGCTGGATGCTTGGCAGT  
CGATGGCTCATACGTCAGCGCCATCGTGCAGGGTGACCGTCAGGAGGAACCAGTCCCAGAAGCTTACACC  
GACAAGACTCCAATCACAAGCTGGACAGACGTTCCGTATGTGGGAAAGCGTGAGGACATCTGGTGTGGTA  
GTGTTAGCAGGGCTAGCAGCGGAACAACCACGTTTGTGTCGTTGTGAATGTTATGGCTCTCAGTATCAT  
TTGCTGAAGAGCATCTGGCAGTTTCCAGGGCCATTCTGTGAGCTCTTCTCCTTCTGCAAGTGGC  
TCAGTAGCTGATGCTGATTTGGCTGTCCACCTTGGCGAAGGACCTCCTGGGTGCGCAAGAACAC  
TGCAAGTGCTTCCCATGTCTTCCCATGAAGTGCTCAGGCATCTTCCAGAACCTCAATGAGCCCTAT

WEST\_NILE\_VIRUS\_PROBE05  
WEST\_NILE\_VIRUS\_PROBE06  
WEST\_NILE\_VIRUS\_PROBE07  
WEST\_NILE\_VIRUS\_PROBE08  
YELLOW\_FEVER\_VIRUS\_PROBE01  
YELLOW\_FEVER\_VIRUS\_PROBE02  
YELLOW\_FEVER\_VIRUS\_PROBE03  
YELLOW\_FEVER\_VIRUS\_PROBE04  
YELLOW\_FEVER\_VIRUS\_PROBE05  
YELLOW\_FEVER\_VIRUS\_PROBE06  
YELLOW\_FEVER\_VIRUS\_PROBE07  
ZIKA\_VIRUS\_PROBE01  
ZIKA\_VIRUS\_PROBE02  
ZIKA\_VIRUS\_PROBE03  
ZIKA\_VIRUS\_PROBE04  
ZIKA\_VIRUS\_PROBE05  
ZIKA\_VIRUS\_PROBE06  
ZIKA\_VIRUS\_PROBE07  
ZIKA\_VIRUS\_PROBE08  
ZIKA\_VIRUS\_PROBE09  
ZIKA\_VIRUS\_PROBE10  
ZIKA\_VIRUS\_PROBE11  
HEPATITIS\_C\_VIRUS\_PROBE01  
HEPATITIS\_C\_VIRUS\_PROBE02  
HEPATITIS\_C\_VIRUS\_PROBE03  
HEPATITIS\_C\_VIRUS\_PROBE04  
HEPATITIS\_C\_VIRUS\_PROBE05  
HEPATITIS\_C\_VIRUS\_PROBE06  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE01  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE02  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE03  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE04  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE05  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE06  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE07  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE08  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE09  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE10  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE11  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE12  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE13  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE14  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE15  
BORDER\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE16

CAGGAATTAGCACAAATCATCAAGAGAAGGGAGAGCAGCAACATTCCGGCGATCTTCGTTCTGGAACCTC  
AATGCTTTAGCAGTGGAGTGAGGACCGCTGTTGTCACAGCGTACAGTGACCAGGCTGTTGCCGGCCTCAA  
TGTTCTCCTGGTTGGTCCATCTCGCTTTGAGAAACGATGCCACCATAAACACTGGTTGATCTTGAAGGT  
CTGTTACCCTAACGGTGAGGGTGACTTGTCCCCAGCATCCGGCTGCTAGCAGGAGAGCCGACACTCCAAC  
TTGGAACAGACCTGGACCTTCAAGAGGTGTTCAAGGATTTATCTTTTCTTTTGTCAACATTTTGAC  
CTTGGCTGTTCTAAGGAAAGTCAAGAGAGTGGTGCCAGTTTGATGAGAGGATTGTCCTCAAGGAAACGC  
TTGCCTACCTTGTGGGAAGCAACATGACGCAACGAGTCGTGATTGCCCTACTGGTCTTGGCTGTTGGTCC  
TGACTTGCCTACGCATGAAAACCATGGTTTTGAAGACCCGGCAAGAAAAATGGATGACTGGAAGAATGGGT  
ATCTGGAGGATGGGATTTATGGCATATTCCAGTCAACCTTCTTGGGGCCCTCCAGCGAGGAGTGGGAGT  
ACTGCTAAGCTGTGAGGCAGTGCAGGCTGGGACAGCCGACCTCCAGTTGCGAAAAACCTGGTTTCTGGG  
ATATTGACGCCAGGAAAGACCCGGAGTGGTTCTCTGCTTTTCTCCAGAGGTCTGTGAGCACAGTTTGTCT  
TAGCCTTCCCTTTGCACCATCCATCTCAGCCTTAGAGCTCCAGCAAGAGCCGTGTGGACGGCTCCTTCC  
CCAGATCAAACCTGTGATGCGGGTGTCCAGCCAGCTGTGTCATCAGCATACATCTTCTCCTGGTAT  
GGAGCTTGTGAAGTGGTGGGAGCAAAACGGAACCTTCCCAATTGTCATCCAGTTGAGGGTTTCCCA  
TGGGGTCAAGGTCTGCATGTCCACCGCCATCTGGGCTGGGACCTTGCAGGGTCCATCTGTCCCTGCATA  
AGACCATGCTCATAACCTGACGAGTGCCTTCTTGGGGTCTGGCACCCCTAGTGTCCACTTTTTCTTGAA  
CTGGGGTACAGATTTGCATGTCCACCGCCATCTGAGCTGGAACCTTGCAGGGTCCATCTGTCCCTGCGTA  
GCTTGTGAAGTGGTGGGAGCAGAACGGGACTTCTTCCCAATTGCTCCATCCAGTGCAGGGTTTCCACTC  
CTTCAGCGCAGCTTACCACAGCCCGCTGCCGGAGCCGAGATTACATCCTCCTCATATTTCACTGGCCT  
TGTGCCCTTCTCCATTTGGTGGTAATCAGAGCTTCACTTCCAGATCAAACCTACTAATCGGGTGTGTC  
GGAGTACCAGTAGTTCTCCAGTTGGAACCCAGTCAACTGGCACAGATGAACAAATGGAGTTGGCCAT  
ACACGCCCTTCAATCAAGTTTATCCATTTTCAAGGCGACATTTCAAGTGGCCAGAGGACAGCCTTCCCTT  
TGGGCTCAGCCCGGGTACCCTTGGCCCTCTATGGCAATGAGGGTTGCGGGTGGGCGGGATGGCTCCTGT  
CACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGTGAGATCGTTGGTGGAGTTACTTGTGCGCGCAGGGGCC  
GCATGTTGACTCGTCCGCTCTGTGAGTGTATGACGCGGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCACGCCCGC  
CCAGCTGTCCGCTCCATCTCTCAAGGCAACTTGCACCGCAACCATGACTCCCCGACGCGGAGCTCATA  
ATCTCTCAAGGCAACTTGCACCGCAACCATGACTCCCCGACGCGGAGCTCATAGAGGCTAACCTCCTG  
CTGTGAGCCGCGAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTAGTCTGTGTGAA  
TTTCTGGAGGTCCTTCCGTCAGATTGGCTTGTGTCTTGTTCATCAACCATATCCATGGATTTATGTTGA  
GTTCTAATTTTTTCCCAATTATACCAATTGCTTCCCTAGCCAGGATGTCAATTTTGCAGCCCTTGCCT  
TTGCCAAGTGCCTGGGCACTCCTGTACATATCTTTTCAAGCCAAATACCGTGCAGGCTTCTGTTAACACC  
TAGGGAACAGCACTGGTACTTGGACTTCATAGCTGTTGTATGCCAGTTGAATTGGTTACAGGTTGGTCTGT  
CACTAGTGTCCGTTGACCACTACCTTTTGGCCCTCGCTGATGTACACCTCCCCATCAGCTGTGACTAC  
AAAAACCAGCTGCTCCTTCTGTTGATACCTGTCTCCAGTTCTCCATCAACTGCATCATAAGTAGC  
CGTCAGGTGGCTTAGATCTACTACTCTTCTACTCTCTTTGGGTGTGATCTTATGGCTCCCCGCTGAC  
ATGGTGTCTTACCTTATACCCGGGAATGACCACTGGTTTTTGTGTTGACCCACTGTACATGACCTTCGT  
AGGGCACGCCTGTGGCTCGGCAGAAAGCATAAACCATGGTTAAGACATTTAACATACTATTGCCAGCACT  
ATTTCTTTCTAGACTCAGGTGGCTTGTCTTGTGTTGTTGATAAGCCATCTTGTGTGTTCTTGGCCTTAC  
GTAAGAGATCATAGTGGTAGTCTTTGGAGCCAACCTGCTGTCTTGGCTCCTATAGTATCTCCCGGGCTT  
AGCTAGTTGGCGTCCAGTTCCCTGTGCAAGCTGGTATGCCGACACCATGGTTCCGCCTTTGACTGTTCT  
TTGCTGTTATAGTCCCCATGTATACTTTACAGCTAGTTGGCGTCCAGTTCCCTGTGCAAGCTGGTATGC  
CACATTTACAGCCCGTGTCTACAACCTACATCTAGGCTGGCAATGTGACTCCAGACTATTGCTATTGGT  
ATGCCGACACCATGTTCCCGCTTGTGCTTCCCGGGTGGGCACTGTAGCAGAAGTCTTCAAATTA  
GGTCCCCCTCTGTAATTTCTGGGGTTTTCTGCTTCTCATGTAGGATTTGTATACCCTTACTGGCAAATTT

BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_1\_PROBE01  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_1\_PROBE02  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_1\_PROBE03  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_1\_PROBE04  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_1\_PROBE05  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_1\_PROBE06  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE01  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE02  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE03  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE04  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE05  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE06  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE07  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE08  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE09  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE10  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE11  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE12  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE13  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE14  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE15  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE16  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE17  
BOVINE\_VIRAL\_DIARRHEA\_VIRUS\_2\_PROBE18  
CLASSICAL\_SWINE\_FEVER\_VIRUS\_PROBE01  
CLASSICAL\_SWINE\_FEVER\_VIRUS\_PROBE02  
CLASSICAL\_SWINE\_FEVER\_VIRUS\_PROBE03  
CLASSICAL\_SWINE\_FEVER\_VIRUS\_PROBE04  
CLASSICAL\_SWINE\_FEVER\_VIRUS\_PROBE05  
CLASSICAL\_SWINE\_FEVER\_VIRUS\_PROBE06  
CLASSICAL\_SWINE\_FEVER\_VIRUS\_PROBE07  
CLASSICAL\_SWINE\_FEVER\_VIRUS\_PROBE08  
CLASSICAL\_SWINE\_FEVER\_VIRUS\_PROBE09  
CLASSICAL\_SWINE\_FEVER\_VIRUS\_PROBE10  
CLASSICAL\_SWINE\_FEVER\_VIRUS\_PROBE11  
HUMAN\_HERPES\_VIRUS\_4\_PROBE01  
HUMAN\_HERPES\_VIRUS\_4\_PROBE02  
HUMAN\_HERPES\_VIRUS\_4\_PROBE03  
HUMAN\_HERPES\_VIRUS\_4\_PROBE04  
HUMAN\_HERPES\_VIRUS\_4\_PROBE05  
HUMAN\_HERPES\_VIRUS\_4\_PROBE06  
HUMAN\_HERPES\_VIRUS\_4\_PROBE07  
HUMAN\_HERPES\_VIRUS\_8\_PROBE01  
HUMAN\_HERPES\_VIRUS\_8\_PROBE02

AGTAAAAACACTCAGGACGGCTTGTACCATAACAAAAACAAACCTCAGGAATCACGCAAGAACTGGAAA  
AGCAACAAAAAGAAAACACAGAAACCCGACAGACTAGAAAGGGGAAAATGAAAATAGTGCCCAAAGAA  
GCCCAAAGAATCTGAAAAAGACAGCAAAACTAAACCTCCGGATGCTACAATAGTGGTGGAAGGAGTCAAA  
TTGTACAATATACCGCTAGGGGGCAACTATTCTGAGAACTTGCCCGTACTGGCAACTAAAGTAAAAAT  
AAACACACCTACGGTGAGGTGACGTGGGAGCAACTTGAGCGGGGGTAAATAGAAAGGGGGCAGCAGGCT  
ATGGGGGTTGGGACTGAGAGATACAAGTTAGGTCATAGTCAATCTGCTGCTGAGAAGGTTGAAAATTC  
TAGTAGTAGAAGGGTTAAGTACCAGGTGAAGAAGAAAAGCAAAAGTAAGGGGAAAAAACTCAAGATGG  
AACAAGAATAAGCCCCCTGAATCAAGAAAGAAATTGGAGAAGGCACTGCTGGCATGGCCATCTTGGCAG  
ACAGAAAAAGATAGCAAAACCAGACCCCTGACGCGACTATAGTAGTAGAAGGGGTTAAGTACCAGGTGA  
GAGTGAAGCAGACCGGATTTTATATTACCTTTTTTGAAGCCGTGTTAATAAGCTGCATCAGTAGCCAA  
TGAGACTGGCCATTGCAAAAGTGATGTACAAGTGGGTAAAGCAAAAACAGTGGTGATACCCGGCTATGA  
ATGGGATTCATTCCAGGACCCCGTGGCAGTGAGCTTTGACACCAAAGCATGGGATACACACAGTCCACGT  
ACACAGGCTAGGGACAGGCCTACAACCTGACAGGCTGCAACAAAGGCAAGAATTTCTCCTTCGAGGTG  
TGCTGTTCAAGGACGACGATTGCGGCAACATGCTGCAAGAGACCGCGATACAGATACTCGATGGGGCAAC  
AGCAAGGGTAGGGACGGCCAAGTTGACAACCTGGTTAGGGAAGCAATTAGGGATCCTTGGTAAGAAGTTG  
AACAGGAGTCTACATGGAATTTGGCCAGAGAAAATTTGCACCGGGTACCAACTCACTTAGCAACAGACT  
TTACCTAATACTGGAAATACATACTATATGCACAGAAAATCATTAGATGAGGTGTCAGGAGGAGCAAT  
GGGCCATAGATGATGAGGAATGTAAAGGGCTGAAGAACTGTATCTTGTCTAGGGAGAGTGAAGAATTT  
GAAATATACGGGGCACCCAAGGTGATCACTATCATAAAAGCTAGTACCCTAAACAAAAACAGGCAGTGA  
TTGGGCCCATAGTAACTGTTATCTTGGAGAAGACTGAGGGTGATGCTGATGACAGTGGCCAGCCAGGCT  
CAAATCAATGATTAACCTGGGAAAATATCAGATCAACTATGCAAGAGATGGACACAAAAGAACATATAT  
AAACAAGCAGACCCCTGGATTGCATGAAGAACTAATGAAGGTTTTTACTGCTTAAAGATCCCAGAGCTG  
CAATTAGAAGCCGGGATAAACCGTAAGGGAGCAGCCGGCTATCAAGAGAGGAAGAACATAGGGGAAGTGC  
TTAGGTACTATGAAACAGCCATTCCCAAGAATGAGAAGAGAGACGTCAGCGACGACTGGGAAGCCGGAGA  
TCTGCTCACTGGCCTCGATTGCATTGTGGGCTGCCACGGCCCTACCCTAGCATGACTGCTATGCCAC  
CCGTGCTGTGGCCAGGTAGGTGGGGACTCCTTTGCATATTTTTCCGGCCAGATCCCATGCAAGCTCCT  
AAGCCACCTTGGTTTCATATGGCCACCAGTCTGGTCTAACACACACATATTTGCCAACATCCAGACTGA  
CAGCCTCGAACATTATCAAAGTGAAGAGTTCCCTACCGGCTGTCCTTTGGGCAACTCTTTTGCCTCCA  
AGGGGTCTATATTGTACCAGTTACACCATCCATGTTTGTCCATTATGCTCTGTAACCTACAGCACGT  
ATAGGGCTTTTTCTAATTTCTTCTAGATTCTGGTGGTTTTATTCTTGTGTGGTACAGGCCGCTTGGGT  
TCCTGAGTTCACGTGTAGATTGAGTCTGGTTTGTGTCGCAGCCTCAGGTTCTCATGGGATTGAGGAAT  
CTGGTTTTATGGTCCCTATATCTTCAATTTACAACCGTGAAGCCAGCCAGGTTGTAACCGTAACAGCAGG  
CTCCTTCCACTACAATCGTAGCGTCAGGTGGCTTAGTTCTGCTGTCTTCTCATGCTCTTTTGGGGCTAT  
TTTTAGGGGCGAAGTCAGACAGAAACACAGAGAGAGCAGCAGAAATCTGATAGGTGACCCCCATCTC  
GGGACGGGCCAGCTGATTGCCATCTCCCTCAGCTAGACTTGATACTGTACGGAATATACAGGAG  
CGTTAACCCGGTAGCCGTACAAGGCCACAAAATGGGCGAGCCATCTCATCCATGTTTCCAACCCCTCAAT  
CCCCCTCGGCAACCTCCTGATTGTAGTTTTACAGGAGACCACACAGGGCGGCCCTCCCTTGGAGAGTTG  
ATCTCCCCCGTTCCCCGCGCGGCACGCCCTGCCCGGAGTCTTGGCGTGGCATGGAGGGTGGTGAGG  
AAGCCTGCCTCATCTTACCATTAGCCTGGGCATGCGTGAAGTGCAGCGTCTGAGGCTGCTGCTTTC  
CCTCCGGATCCCACGTACGCCGGGCGAGGGGCACAGCACCAGCTCCGCCACGTATCCCCGTTTTTCA  
TCGTAGACATGGAAGTCCAGAGGGCTTCCGTGGGTGTCTGCTCCGGCCTTGGCGTGCCTCTTGGGCAC  
AGGGAGTCTTGGTAGAAGCAGAGGGGGGCTGAGGCCCGCACATCCACCACCCCTCGGGCGCTGGTG  
CCGATTCATGTTTCCATCGCCGCTAACCTGCAGCATGCTCAACCCAAGCTGGTTTATACCGGTGCTG  
CGCATAGTTGTACCATCTGCTCCACAGTGATGTAACATGATCCATGAACAGTACACGGCGTGATA

HUMAN\_HERPESVIRUS\_8\_PROBE03  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_8\_PROBE04  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_8\_PROBE05  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_8\_PROBE06  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_8\_PROBE07  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_8\_PROBE08  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_8\_PROBE09  
HUMAN\_HERPESVIRUS\_8\_PROBE10  
HEPATITIS\_E\_VIRUS\_PROBE01  
HEPATITIS\_E\_VIRUS\_PROBE02  
HEPATITIS\_E\_VIRUS\_PROBE03  
HEPATITIS\_E\_VIRUS\_PROBE04  
HEPATITIS\_E\_VIRUS\_PROBE05  
HEPATITIS\_E\_VIRUS\_PROBE06  
HEPATITIS\_E\_VIRUS\_PROBE07  
HEPATITIS\_E\_VIRUS\_PROBE08  
HEPATITIS\_E\_VIRUS\_PROBE09  
HEPATITIS\_E\_VIRUS\_PROBE10  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE01  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE02  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE03  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE04  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE05  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE06  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE07  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE08  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE09  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE10  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE11  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE12  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE13  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE14  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE15  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE16  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE17  
INFLUENZA\_A\_VIRUS\_PROBE18  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE01  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE02  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE03  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE04  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE05  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE06  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE07  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE08

ATGCAATGCTTCCAATAGCGCTGTCAATTCTCCGTCCCCTTCTTCTGGTAAGCACCTGTGTACAATACGC  
TTAAAAATCCCTTTGGGGTCTCTTGAGTCCCTGCAGATCCGCCACGCCACGTCCCCATTGACGCGTC  
CCGGGGGCTGGCAACCTACGTAGGTTGACAACAGCGAGCTTGTCCAAGAGACTTCGTTTTCCCACCGTC  
GGCCACCTGGCCACCTACCGCCGGCTCTCAAGTACTCCACCCTGCCCGATCTATGGCGGTTTCTAAGT  
TGAATTCAGTTCTATGGAGAGGTTGGTTCTCCCATTGATGAGCTGCGTGGCGGAGCGGGTTATTGTCTG  
CTGCATTCAGTGAGCATGGCAGATGTTCTGTCACCGGGCGCCACTTTGGGAAGGCCTGTAAGGTCAAT  
GAACCTCCCCTTGACACCACAGATTATTCTTTGAGGTGACTCTAGGGCACAGAATTGCCGACTGCGTA  
TATACGTGACGTGAGGCAAGGTACCGTAGCTATTATCTTGTGCGCTGTAATCTTTGAACAGTTAATCGC  
GGGCCGACTCATCAAAAACCAACACCCCGTGGGTCAAGATGAAAGCCGGCCGAGAGCCAGCGCCTACTG  
TGGCTCCACTAGCTCGTACAATTCACAGGTTGTAACCTGTACGTGGCCAATGGCCGGGATAAAAACGGC  
TCACAAAAGAGGCAGCATCAAGGATGCGGGTACCTTTGGTAAAATGCATGACAGAGCCCACCGCCAGG  
TCGTGAGCTTGGGAGAAAATCACTCACAGCGAGGCGGAGCTGCTTCGCCCGCTCGGGGCCAGGGCCCA  
CTGTTAATCAAATGTTACGACACTACAGGTGGTGGTCTTTGGGGCAGGTAGAGAAGGCCCTGTTCC  
CAGTAAGCCGGCCGGCAAGCGACGACGCTCAGGAAGCGGCCAAGGCCGGGGGCCACCACAACACTGC  
CCTGTTCAAGCTCAGGGCAGGGCGGTAGAACAGCCGCGACAGGGGCAGGTCTGTGGCCAAGCTCCTCAGC  
TGTGGCGCTCTGGGCCATTAGTCTCTAAAACCGCCCCGTCAACAAACGACGTGCGGAAGGTTTTATTACC  
CAGCCGCCGAGAAGACGGTGTGCATCAAGGCATCCCCATAAAACACACCCTGAGGGAGCAGGGCCAGGAT  
ATATGCCGGTCCCGAGGAGTGGGTATGCAGCGGTACCGAGGCGGGAGCAAGTCTCCCGGTAGGCAGCCTC  
TTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGATTCTGGACATTTGGACATATAATGCAGAATTGTTAGTTCTACTG  
CAGTAGAATAACAATTCCTGATTATATGTCCAAATGTCCAGAAATCCATCATCAACTTTTTATTAAAA  
ATGAATGCATGGAAAGTGAAGAAATGGGACTTATGATTATCCCAAATATTCAGAAGAGTCAAAAGTTGAA  
TTCAACTTTGACTCTTCTGAATATTTGGGATAATCATAAGTCCCATTCTTACACTTTCCATGCATTTCAT  
GGCAATCAGTTTCTGGATGTGTTCTAATGGATCTTTCAGTGCAGAATATGCATCTGAGATTAGAATTTCC  
GAAATTCATCTCAGATGCATATTCTGCACTGCAAAGATCCATTAGAACACATCCAGAACTGATTGCC  
ATGATGCAACTTATCAGAGGACAAGGGCTCTTGTTCGCACCGGAATGGATCCAGGATGTGCTCTCTGAT  
ATCAGAGAGCACATCTGGGATCCATCCGGTGCGAACAAGAGCCCTTGTCTCTGATAAGTTGCATCAT  
ATGAAAGAATGTGCAACATTCTCAAAGGGAAATTTCAAATGCTGCACAAAAAGCAATGATGGATCAAGT  
ACTTGATCCATGATTGCTTTTTGTGCAGCAGTTTGAATTTCCCTTTGAGAATGTTGCACATTCATTCAT  
CACTGAGTGACATCAAATCATGGCGTCCCAAGGCACCAAACGGTCTTACGAACAGATGGAGACTGATGG  
CCATCAGTCTCCATCTGTTCTGAAGACCGTTTGGTGCCTGGGACGCCATGATTTTGTGCTCACTCAGTG  
AGGGATACTCTCTAGTCGGAATAGACCTTTCCAGACTGCTTCAAACAGCCAAGTGTACAGCCTAATCAG  
CTGATTAGGCTGTACACTTGGCTGTTTTGAAGCAGTCTGAAAGGGTCTATTCCGACTAGAGAGTATCCCT  
TCATAAGGATGATGGAAAGTGCAAGACCAGAAGATGTGCTTTCCAGGGGGCGGGGAGTCTTCGAGCTCTC  
GAGAGCTCGAAGACTCCCCGCCCTGGAAAGACACATCTTCTGGTCTTGCACTTTCCATCATCCTTATGA  
AAAAGGCAGCGAGCCCGATCGTCCCTCTTGGATGAGTAATGAAGGATCTTATTTCTCGGAGACAA  
TTGCTCCGAAGAAAATAAGATCCTTCACTACTCATGTCAAAGGAAGGCACGATCGGGCTCGCTGCCTTTT  
AAAGGGTCTTTGGGAAAGCACTAAGAGTAATATTCACCAAATGTTTGTGATGATTATGATTTGGAAATG  
CATTTCAAATACATAATGCATCAAACATTTGGTGAATATTACTCTTAGTGCTTTCCCAAAGGACCTTTT  
ATCAATACAGAGACGGCACAGGAGGACCTACAAGGTGGGGACCTCAGGATCTTGCCCTAACGTTGCTA  
TAGCAACGTTAGGGCAAGATCCTGAGGTCCCCACCTTGTAGGGTCTCTGGTGCCGTCTCTGTATTGAT  
ATCCTCAAAGTTCACCTCATCTGCCAATGGAGTAACCACACATTATGTTTCTCAGATTGGTGGCTTCCC  
GGGAAGCCACCAATCGAGAAACATAATGTGTGCTTACTCCATTGCCAGATGAGGTGAACCTTTGAGGAT  
GCAAGTGGCAGGACGTAAGTAATAAAAGGGTCTTACTTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTCCACGAAA  
TTTCGTGGAGGCAATCTGCTTACCAATTAAGGCAAGGACCTTTTATTACCTGCTCCTGCCACTTGC

INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE09  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE10  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE11  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE12  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE13  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE14  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE15  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE16  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE17  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE18  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE19  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE20  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE21  
INFLUENZA\_B\_VIRUS\_PROBE22  
INFLUENZA\_C\_VIRUS\_PROBE01  
INFLUENZA\_C\_VIRUS\_PROBE02  
INFLUENZA\_C\_VIRUS\_PROBE03  
INFLUENZA\_C\_VIRUS\_PROBE04  
INFLUENZA\_C\_VIRUS\_PROBE05  
INFLUENZA\_C\_VIRUS\_PROBE06  
INFLUENZA\_C\_VIRUS\_PROBE07  
INFLUENZA\_C\_VIRUS\_PROBE08  
INFLUENZA\_C\_VIRUS\_PROBE09  
INFLUENZA\_C\_VIRUS\_PROBE10  
INFLUENZA\_C\_VIRUS\_PROBE11  
INFLUENZA\_C\_VIRUS\_PROBE12  
NEW\_CASTLE\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE01  
NEW\_CASTLE\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE02  
NEW\_CASTLE\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE03  
NEW\_CASTLE\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE04  
NEW\_CASTLE\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE05  
NEW\_CASTLE\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE06  
NEW\_CASTLE\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE07  
NEW\_CASTLE\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE08  
NEW\_CASTLE\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE09  
NEW\_CASTLE\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE10  
NEW\_CASTLE\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE11  
NEW\_CASTLE\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE12  
NEW\_CASTLE\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE13  
NEW\_CASTLE\_DISEASE\_VIRUS\_PROBE14  
CANINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE01  
CANINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE02  
CANINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE03  
CANINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE04

TTTAAAAGAAGAGGTGAAAACAATGTACAAGACCACCATGGGGAGTGATGGTTTCAGTGGACTAAATCAC  
GTGATTTAGTCCACTGAAACCATCACTCCCCATGGTGGTCTTGTACATTGTTTTACCTCTTCTTTAAA  
GCCCTGTGTTTGCAGTAGAAAAGACCTATTGCTCTAAGCAAGCAAGCTGTAAGAAGAATGCTGTCAATGAA  
TTCATTGACAGCATTCTTCTTACAGCTTGCTTGTCTAGAGCAATAGGCTTTTCTACTGCAAACACAGGGC  
GAGGGACACAGCAGAGGATTATGATGACCTCGATTATTAAGCAATAAAAATAGACACTATGGCTGTGACT  
AGTCACAGCCATAGTGTCTATTTTATTGCTTTAATAATCGAGGTCATCATAATCCTCTGCTGTGTCCCTC  
CAAATGGGCCATTACCCGAAGACAATGAACCGAGTGCCTATGACAATTGGATTGTGTTCTGGAGGCTTT  
AAAGCCTCCAGAACAATCCAATTGTGCATAGGCACTCGGTTTATTGTCTTCGGGTAATGGCCATTG  
AGAATAACAAGAGTGAATACATCAAAAAGCATTATCATTAAACACAATGACTAAAGATGCTGAAAGAG  
CTCTTTCAGCATCTTTAGTCATTGTGTTAATGATAATGCTCTTTTGATGTATTCCACTCTTGTATTCT  
GACTAAAGATGCTGAAAGAGGCAAACTAAAAAGAAGAGCAATTGCCACCCTGGGATACAAATCAGAGGA  
TCCTCTGATTTGTATCCAGCGGTGGCAATTGCTCTTCTTTTAGTTTGCCTCTTTCAGCATCTTTAGTC  
AAAGAGGATTTGAAAAAGCAATGGCTCACCTTGGTGAGATTGGGTACATGTAAGCTCCGAAATGTCTA  
TAGACATTTCCGGAGCTTACATGTACCAATCTCACCAAGGTGAGCCATTGCTTTTTCGAAATCCTCTTT  
TCCAAATCCTTACGATGAGATTGAGCTATGCATTTGTTTTGTATTGCAGAAATACTAAGAAGATCTGT  
ACAGATCTTCTTAGTATTCTGCAATACAAAACAATGCATAGCTCAATCTCATACGTGAAGGATTTGGA  
ATTGAAACAGGAATTAGAAAATGTTTCAGATGCATAAAAGCGGATTGCTTATGGCTACCGATGAAATCT  
AGATTTTCATCGGTAGCCATAACGAATCCGCTTTTAAATGCATCTGAAACATTTTCTAATTCCTGTTTCAAT  
GAGCCCAGCTCGATCCCTATTGGGAAATGAAACACCAGATATTGACAAGACTGAAGCTTATATGCTCTCG  
CGAGAGCATATAAGCTTCAGTCTTGTCAATATCTGGTGTTTCATTTCCCAATAGGGATCGAGCTGGGCTC  
GCAAGCCGACATGTAATAAAGCAACTTCTAGTTTGAAAAAATCAGAAGGAAGAGACATCAGAAAGCAAA  
TTTGCTTCTGATGTCTCTTCTCTGATTTTTTCAAAC TAGAAGTTGCTTTATTTCAGCATGTCGCTTGC  
ACGAAATTGCTGGTATTACTGGCCTTGGAGAAGAAGCACTATCTCTCCAAAGACAAACAGAAAGTTTGGC  
GCCAAACTTTCTGTTTGTCTTGGAGAGATAGTCTTCTTCTCCAAGGCCAGTAATACCAGCAATTTCTG  
TATAATGAGACCCCACTTGGAAAAAGCAATAAAAGGAGTTGAAGGCAGAGTTGGAGAGATGGGACGAATG  
CATTCTGCTCCATCTCTCCAACCTCTGCCTTCAACTCCTTTTATTGCTTTTTCCAAGTGGGGTCTCATTATA  
ACAAACGCATGAGCTGCTTCATCTTCTGGATGTCGCCTGAGAGGCTACTAAGTGCAAGGGCTGATGTCTT  
TGCCGTTGGCAAAGCCATCAATCTCAAGCACGGCCAATGTGGCTTATTCTGTTTCCCTGCAAGGGCAAC  
TGGCTTCCATGACTGCAACAAATGTTTTAGCTGTTGGATTTTCGACCCCATCATAGGGATGGAGGATGT  
GGAGACCATGAGGGGTTGCACCAGCTGATAGTTGTGACTCCTCCATTGTCCATGATATGCTGTGTTTAC  
GCCTTGTTCGACTCATCTGCAGTCTCATACGCAGTCAATGGCTTTTGTACTGTGACCCATACTTGGAC  
CCTGTGAGTGGGAGCATAAAAGAGATATGAGAGCACCTTGCTGAGTGGTTTGTGGCATCTTCGCTAAC  
ACTTGTAGGAGCTTGGCTGAAGAAGCTGGGTGCATTGGGCGTGACATGATCAATGCACGGACAGTGTG  
TGGATGGTTGTTTGTGAGATCTGTCTGTGATCGGGGTTGTCTTACTGGCCGGTGGCTGGATGCTCCC  
TATCACCAAGTAATGTATGACGGCGCATTATCTCTTTCATCCGATACAAACGCATGAGCTGCTTCC  
CTATGCTGTGGTACCTCGGAGACTCGTTGGGCAGCAGCTGCCAGGCCCTCTTGTGCTGCCGGGTTAG  
CAAGGCGCTTGATTTTCTGATTTCTCGATCGACCCGGCTGCATCTAACTTGTCTTAGGAGCTTGGCTGA  
CCCCCTCATGAGCTCCATTGGGGCGAGTCTGAGCCGCGAGGAGCTGTTCGTAATCGAATACGGAAGA  
AGAGGATGATTTCTTTTGGACCCTGCCTTGTGTCATATACTTATTGATTGCCTTGTTCGACTCATC  
ATCGGGCAACTGCCCGTAGTCACTCAAAGATGAAATGTTGGCACAACCGGGATCCAAATCTTCATCAT  
GTCTGGCTGTAGTACGCCCAACTCCTAAAGGCAGCGATCCAAATGTTCTTCCAATTGGAGGTCCGAGGCC  
TCTCAGAGAAAAGCTCATCTGACTACTGTCAGACTCAGCCTCATTGAGGTCTGGGAGGGAGTTG  
TCAAATCTTATTGATCTCCATGACGGGTAAACAGGATTTTCTTGAACCTAGCTGGGATCCAAAGC  
TACCGACAGTGCCTGCAGGTACCACGAGACTGTCAGCATCTTCGATTCCCTTAACTCTTACCCTGTG

CANINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE05  
CANINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE06  
CANINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE07  
CANINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE08  
MEASLES\_VIRUS\_PROBE01  
MEASLES\_VIRUS\_PROBE02  
MEASLES\_VIRUS\_PROBE03  
MEASLES\_VIRUS\_PROBE04  
MEASLES\_VIRUS\_PROBE05  
MEASLES\_VIRUS\_PROBE06  
MEASLES\_VIRUS\_PROBE07  
MEASLES\_VIRUS\_PROBE08  
MEASLES\_VIRUS\_PROBE09  
MEASLES\_VIRUS\_PROBE10  
MEASLES\_VIRUS\_PROBE11  
MEASLES\_VIRUS\_PROBE12  
PESTE-DES-PETITS-RUMINANTS-VIRUS\_PROBE01  
PESTE-DES-PETITS-RUMINANTS-VIRUS\_PROBE02  
PESTE-DES-PETITS-RUMINANTS-VIRUS\_PROBE03  
PESTE-DES-PETITS-RUMINANTS-VIRUS\_PROBE04  
PESTE-DES-PETITS-RUMINANTS-VIRUS\_PROBE05  
PESTE-DES-PETITS-RUMINANTS-VIRUS\_PROBE06  
PESTE-DES-PETITS-RUMINANTS-VIRUS\_PROBE07  
PESTE-DES-PETITS-RUMINANTS-VIRUS\_PROBE08  
PHOCINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE01  
PHOCINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE02  
PHOCINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE03  
PHOCINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE04  
PHOCINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE05  
PHOCINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE06  
PHOCINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE07  
PHOCINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE08  
PHOCINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE09  
PHOCINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE10  
PHOCINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE11  
PHOCINE\_DISTEMPER\_VIRUS\_PROBE12  
RINDERPEST\_VIRUS\_PROBE01  
RINDERPEST\_VIRUS\_PROBE02  
RINDERPEST\_VIRUS\_PROBE03  
RINDERPEST\_VIRUS\_PROBE04  
RINDERPEST\_VIRUS\_PROBE05  
RINDERPEST\_VIRUS\_PROBE06  
RINDERPEST\_VIRUS\_PROBE07  
RINDERPEST\_VIRUS\_PROBE08

AGACTGTCAGCATCTTCGATCCCTTAACCTCTTCACCGCTGTGATCATAAACATGATCACATCGTATTC  
CATGTGAGACTGACCTCTCTTCTGTGCCCTTTTAAATGGATCCACACTCCGGATCCCTTGTCTTACCTTC  
CAGGTTTGGTCTCTGAGGCTGCTGACCTCTTGAATCTCCTCAATGTCAGGAGGATTCTCTGAGGGCT  
GAGTTAAGATGTGCAATGGGGTGTATTATAAAATACCAGTTGTTCTTGACACCTGCAGTTCGCCCTTAC  
CCGCGGATGCGAGGTGCACCGCCTTCAAGTTGATCCAATTGCTGAGAGGCATGGTTTGTGAGACCCGAAC  
TCATGTTGAATCCCTCAGGGCTTTCGACCTCAATATCTGAGATTTCCCTTGTCTCGAACCATCCGGACCT  
GTGAAAAGTATTGGTCCGCCTCATCTCCATGTTGGTACCTCTTGTGCGAAGGTAAGGCCAGATTGTGA  
AGGTGGTAGGTTGTATCGGAGCGATCGACCTTTGATGTCCCATGCCGACTTGTGAAATCGTAGATCTC  
GGGCGTCAGTGACCTTCGACTGTCTGCGGATCTTGGCCTGACTCCGATGCAGTGTCAATGTCTAGGGG  
ACTCCGATGCAGTGTCAATGTCTAGGGGATGCTGGTTGGAGGATGGGCAGCTCTCGCATCACTTGCTCT  
ACCCGTTATCCGAAAAGACGGGTGATGCTCATATAAACAAACCGGAACCTCTGCGGGGTGCCAGCGGTAT  
ATGTGGAACCTGACCTTTCCAGCTGACCTCCTCACCATCTCTTGCCTAATCTAAAATATGCTGGATCAA  
CAGCTGACCTCCACCATCTCTTGCCTAATCTAAAATATGCTGGATCAAAGTAAGATCGACCAAAGT  
CAGGGCCAATCGCCTTGTCAATCCTAAGGGTCACTAGCAGGTTGAAGGCCACTGCATTGACCGATGAA  
CCTGCCCTCTCTTCTTGCAGGTGGCTCGGTCCTGTCTGGGTTGTCTGATATTTCTGACCATGCTGCCA  
CACTTTGATCACCGTGTAGAAATGACACTTGGGCTTGTCTGGGTCCGACCGCTCTACTGATCCTGTCTC  
AAGATGATGAGCGACCTGTGTCATAGATATAGTACACGATAGCATGCTCGCTCCTAGAAACATCATAAGT  
GGACACTCCCCACAGACGCATTTTGTCTGATGACTCCCATCTTACTCTGGCACAGCTTGGGTTGCACC  
TAGCTAAGTCAAGACTGACCTGATCACCCCGTAAGCAGGGATTCTCCCCTTGACCACGGGCTGATCC  
AGTCCACATCGCTGTCGTCAGATCATCTCTCCTCATTGAAGACGTTAGCAACTGGAGGATCTGCTTG  
CTATTGCCATGATTCGACTTCTCAAGACTGGTTTAAACTCTCAATTGCTTGGGAGTTCGAAATGATTG  
TAATATGGAGACTTGTCCACCTATTCTCCAGGGCAAAAACCTAAACCCATCTTTCAATCTTCATTTT  
CTCCTGCAGTTATCTGAGCGGCTGTCCGAACTCCAAGTGTACTCCGGCCAGAACAGCTCCAGCAAAGCG  
TGGTGGTTCTATGCGAGCAATTGACCTTTGACATCCCATGCTGATTATCGAAGTCGTAGATCTCGGT  
AATATTGATGACTAGACCTGGTCATAATCTTATAATGGAACTATCAGTCCCGATGATTCCAATTGTTGA  
GCTCCTCAGGTCTTGGCGGTGTACGACCGACTCCTAGCGGTAATGAGCCGAATGATCTACCAATTGGAGG  
GAACTGTAGAGTTCTCCCGTCCCTCTTTTGGCCCCCGGCATTGTGGCCTGTGCCAAGCAGAGCAGTCAA  
AGGATCTATCAATACCTTAGCATCATTAATTTCTTCAGAGCACTGCCTAAGTTTGTCCCAACATCTAA  
TTACCAAGATGTTGAATGCCAATGCATTTTTACATCGAAATCAAACATTCCGCGAGGGATCCTGTAACA  
AATCTTCGCTAGAATCTCAATGCTATCATCAAGGCTTCCCTCTCTTCTTCCGAATCCCCTATTACTTGG  
TTGTAGGTTTGTATCCCTGATGTTGCTGACCTCTTGAATCTCTCCATGTTAGGAGGATTTTCTCTGAGGG  
TGACTTGATGATGCACTGCCTCTGTTTTTCCATATCCTCTATCAACAACCTATTGAACTCCAATTGCT  
TATAAGCAGGGGAGACCTCCCCATTTGTATCTGACTGATTTAGAATCTTGGTGAGCTGTCTATTTTGGC  
ACATCGCTGACACTGTTTGTATCTTTTGTGGCGTGTGTGATTCATCGATATTCTGAGTGATTTCTTCT  
CAAAATTTTCTTCAAGTATCGTCACTACTAATAGGTAAGTCTTACCGTAGATCCCTTCTGAGATTGCAGT  
ACCCAGACAGCCGATCATCAATGAGCTGATTGGAATCTTATCACCTCCTTGGAAATTCAGACTCATGGT  
GGATCATTTCTTGGCCTGCTTGTGATTTCTCAATTGCTTATTGATTGTTTCCAGACTTGCCTTAAG  
CGGATCTGAACCTCTAGTATCTTCCCTGGTACAGTGAATAACCGCTGTGAGATAGACGCTTATACTCAT  
GCTTTTGGATCTCGTCCCTTCTACTGTTTCAACATCGGAGGCTCTTGTGCTGGAGAGATGGGAGAAGA  
GATGAAGAGCAATCCCTGCTGTAATCTGGGCTGCGGTTGCAACTCCGAGAGCTGCACCAGCCAAAGCGAC  
CAACATGGACCATAAATGTCGCCTCGGAAAGGCCAATCCCCCGCTGCTGGTCTTCCAGGTTCAAGTGT  
ATGAAGACTCGGCCATCGTTCCAGATGAGGTCGATTTACAGTCTGTGCCCTTTTAAATGGGTTTCTGTA  
GCTCTGTTGCTGGAGAGATGGGAGAAGATCCCAAGTCAAGCGGGAGCACTCCCTCGGGATCAGGTTCCG  
CATCTGTTCTCGTCAAGGGACAGCCCATATGGCAGTCCCTGCAGCTATGATCCCCCTATGAGTTGTGAT

RINDERPEST\_VIRUS\_PROBE09  
RINDERPEST\_VIRUS\_PROBE10  
RINDERPEST\_VIRUS\_PROBE11  
RINDERPEST\_VIRUS\_PROBE12  
BOVINE\_PARAINFLUENZA\_VIRUS\_3\_PROBE01  
BOVINE\_PARAINFLUENZA\_VIRUS\_3\_PROBE02  
BOVINE\_PARAINFLUENZA\_VIRUS\_3\_PROBE03  
BOVINE\_PARAINFLUENZA\_VIRUS\_3\_PROBE04  
BOVINE\_PARAINFLUENZA\_VIRUS\_3\_PROBE05  
BOVINE\_PARAINFLUENZA\_VIRUS\_3\_PROBE06  
BOVINE\_PARAINFLUENZA\_VIRUS\_3\_PROBE07  
BOVINE\_PARAINFLUENZA\_VIRUS\_3\_PROBE08  
BOVINE\_PARAINFLUENZA\_VIRUS\_3\_PROBE09  
BOVINE\_PARVOVIRUS\_PROBE01  
BOVINE\_PARVOVIRUS\_PROBE02  
BOVINE\_PARVOVIRUS\_PROBE03  
BOVINE\_PARVOVIRUS\_PROBE04  
BOVINE\_PARVOVIRUS\_PROBE05  
BOVINE\_PARVOVIRUS\_PROBE06  
BOVINE\_PARVOVIRUS\_PROBE07  
BOVINE\_PARVOVIRUS\_PROBE08  
CANINE\_MINUTE\_VIRUS\_PROBE01  
CANINE\_MINUTE\_VIRUS\_PROBE02  
CANINE\_MINUTE\_VIRUS\_PROBE03  
CANINE\_MINUTE\_VIRUS\_PROBE04  
CANINE\_MINUTE\_VIRUS\_PROBE05  
CANINE\_MINUTE\_VIRUS\_PROBE06  
HUMAN\_BOCAVIRUS\_PROBE01  
HUMAN\_BOCAVIRUS\_PROBE02  
HUMAN\_BOCAVIRUS\_PROBE03  
HUMAN\_BOCAVIRUS\_PROBE04  
HUMAN\_BOCAVIRUS\_PROBE05  
HUMAN\_BOCAVIRUS\_PROBE06  
HUMAN\_BOCAVIRUS\_PROBE07  
HUMAN\_BOCAVIRUS\_PROBE08  
HUMAN\_BOCAVIRUS\_PROBE09  
HUMAN\_BOCAVIRUS\_PROBE10  
HUMAN\_BOCAVIRUS\_PROBE11  
HUMAN\_BOCAVIRUS\_PROBE12  
CANINE\_PARVOVIRUS\_PROBE01  
CANINE\_PARVOVIRUS\_PROBE02  
CHICKEN\_PARVOVIRUS\_PROBE01  
CHICKEN\_PARVOVIRUS\_PROBE02  
CHICKEN\_PARVOVIRUS\_PROBE03

ATTCAACCCCAATCCCATAGCATAGCTCCACAACAGGGGGTATGCTCCTGCACTGAACTTGTCTGGAT  
ACACCATCATCAGCGCCTGATTGAACCAGGATAGAGTCAGCATCTTCGACTCCCTCAACCTTTTCACCGC  
GAAACTGGTGTGCCACTCCTAGTTCTTAATTATGCCTACTTTCGAAGACTCGGTAATCCTGTTGCCA  
CTGATTGAGTTTTGTCACTTTGGACTACCTCCACCAATTAATGCTGATATCAGGGTCATCAGTGATTCT  
ATCAACAGGTATTGAGGACATTGTACTTGACATTGTCAGTAGTAATGGATTAATTATAACAACAAGATTCC  
GGTCCACACAAGAAGCCAAGCAAAGCTTGAAGAAACACATGAAGAACATCAGCAGTTCAGATACAACCTT  
AACTGACTGGATGTTGGGAGTGATCTTGAGTATGATCAAGACAATATGTTGCAAAATGGTAGAAGCACT  
GACAAGATGGAACAGTTAAATCCAGTCTAGTGTGAGCGGTGATGCAGTAGAACAAATTGGATCAATTAT  
TTTATTCGGTGATACTTGTAAATCAGATATTTGGGTTAAAGGAATTATTTAATTGGCTGCACCCTCGCCTT  
TAATCCGCCTGAAACGATTGAAGATTGGGATCCCATAGAAGATGAGAATATCTTAGACAATATTGTTAAA  
AATTGGATCCTAAGTTACAATCAATGTATTATAAGGGTAACAATTTATGGGAAATAATAGATGGACTATT  
GTGGACTATTCCAATGAGACAAAATATTGGGGTCCAGAAGGAAGACTGCTTTTATTAGGTGACAGAATA  
ACTAAAAGAGAACATCAAGAGGTACCAATACAGAGAATGACTCATGATAGTGGTATAGAACCTCTAAATC  
CTGTCTCCTTCCTGCTCGCTTCTGGTAAGGTCTCGAAGCAGTAGAGGACGATTGGTTCTTCTCCCGCT  
ATGGATGCTGTACGTACGGGTATCTGTGATCCCCGTCGCAGAAGATGTGCATGCCTGCAGTCAGATCATT  
GTCCATTGAATATTTATTAGTCCCTTTGCTGGCCAGTCGAGTCGAGTGCCAGTAGAAGCCGCAGAAGCTG  
TTCTGGCGGATGTGACATTGGAATGGATCCGCTTGTGTGTCCAGGAGTGTCTTTCTGTTGACTCTCGG  
ATAGCCCCACTGCGTGCCAGATGGCCTTAGCGAGATTGGTTTTCCCTGTGCTCGCCGGCCCATAGAAAA  
AACCAGATCCTACCACGGACCCGAGTCGCCAGTTCAATTGGCTGATTGCCAGCCTCGTCGTTAGGTATATC  
TGAACCCAGTAGCTTGGTGAGCGAGTGAGTTGATGTCGTGAGCGCTCAGTCTATCAACCTCCTCCCGCAT  
CTGACATCCAGTTGCTGGTTCTAGTGATGCTTGAATCGTTGCTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGG  
GTCCGAGGGCTTGTCCCGAGTAGCCGCGCTTTGTGTGTTCCAATGTATCCAAGCGATGGTCCCTGGCAT  
ACGGACTGTATCGCGTGTACACGAATTTTCTGAGTTGTTGTAGTTGTTTCGTGTAGCGAAGTAGCGTCT  
TGTGCCAGTAGAAGCCACAGAACGCAGGAAGAGGTTCTTTGCTTCTGCTTTTATGTTTCATTGAATACATG  
TGAAGGCAGTGTAAGCTGATGTCACAGGTGGAGCAGTCACTACAGTACTGGTCCGAGGGCTTGTCCCG  
TCGATTGTCTCGAAACAGTGGAGGACGATTGGTTCTGGTCCATCCCCTGTGGAATGATCCCAAGTCTCT  
CTGGCATCCACTGTGATGGCTTGTATACGGACTGTATCGCGTGTACACGAATTTTCTGAGTTGTTGTA  
TTTGTAGTTGTTGAAACTGTTGTTTCATTTCAAAGATTGAATTAGTACCATCTAGCAATGCGAGT  
ATTTGTCTGAAAAGTGAGAACCTCCGACCCACCCTCCAGTGGAATCCCCACACCAGATCCTTTTCTCC  
GTTTGTACGCCCTTGGTTTTTGCACCAGATTGGATTTTCTCTGGTGATAGGAAATCTGTCCAGACTTG  
AGTGCCAGAACATATTTCTGTATTTTGTATCTAGTGTCTTTTCTTTGATTAACAATAGTTCTCTAGTGT  
TTGGGTGTTCTGATGATATGAGCCCGAGCCTCTCTCCCCACTGTGTCGGATCGGGCTGCGGCTCCTGCT  
TCTTTGTTGCGTATCTTTCTACCTCCCATAAATTTACAGCTGACTTGTCCAGTACAGTATATGTTTAG  
TCTCCCCTCTTTCTGGACTCCCCTTTTCTTTGTAGGAGCGATGCTTGTCTTTTCAATTTCCCTGAGCTCAT  
TACTTCTGTTCTCTCCCCTGAGGTGTTTTGTGGTCCGTCACAGTATCAGGTTGTTGGTCTTGAATGTC  
ATCCTTTTCTCCTCCAATACTTCTGTTCTCCCCTGAGGTGTTTTGTGGTCCGTCACAGTATCAGG  
CATCTGCTTCCATGCTTTACGAGCAGAAAGCATTTCTCGTCAAGTATCTCGTCTGCTTCTGTCTGTGA  
GCTGTGATTTTCCACTTTGGTTTGTGTTTCAATGGCCTCTGTTTTGTAGAGGTGACCATTCTGAATTGT  
GAAACATCCATATGCCCCACTAGATTGTATGTTGGTTTGGTTTCTTTGTATAGGAGTTGGTCTCTAAG  
GTCTACCAATGCATATCTGGATCACCATCTGCTGCTGATTTTCAATATGTTTGCCTCCCCCGTCC  
TTTGGCTCCCCCGCTCCTGCTGCAATAGGTGTTTTAAATGGCCCTTGTGTAGACGCCCAAAAAGAATA  
CTGCTTTGTTGACAGCTGTTGAGTGGGAAGTTTTGTTGTTATGATTACGTTACCGTATATTTGTAC  
CGGCTCCCCCACCCTTCCCCAACCGTTTCCAGTACTACATAGCATACAGGTAGAGTATGTTCCCTGG  
CGTGGAATATAATGCGTTTTTTTTTCCCTGCTTGTCCGGATAGCCAGCACAAATATCAGTCTAGCAACGTA



CHICKEN\_PARVOVIRUS\_PROBE04  
FELINE\_PANLEUKOPENIA\_VIRUS\_PROBE01  
FELINE\_PANLEUKOPENIA\_VIRUS\_PROBE02  
FELINE\_PANLEUKOPENIA\_VIRUS\_PROBE03  
FELINE\_PANLEUKOPENIA\_VIRUS\_PROBE04  
MINUTE\_VIRUS\_OF\_MICE\_PROBE01  
MINUTE\_VIRUS\_OF\_MICE\_PROBE02  
MINUTE\_VIRUS\_OF\_MICE\_PROBE03  
MINUTE\_VIRUS\_OF\_MICE\_PROBE04  
PORCINE\_PARVOVIRUS\_PROBE01 \*  
PORCINE\_PARVOVIRUS\_PROBE02 \*  
PORCINE\_PARVOVIRUS\_PROBE03  
PORCINE\_PARVOVIRUS\_PROBE04  
PORCINE\_PARVOVIRUS\_PROBE05  
PORCINE\_PARVOVIRUS\_PROBE06  
PORCINE\_PARVOVIRUS\_PROBE07  
HUMAN\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE01  
HUMAN\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE02  
HUMAN\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE03  
HUMAN\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE04  
HUMAN\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE05  
HUMAN\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE06  
HUMAN\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE07  
HUMAN\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE08  
HUMAN\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE09  
HUMAN\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE10  
HUMAN\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE11  
RABBIT\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE01  
RABBIT\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE02  
RABBIT\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE03  
RABBIT\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE04  
RABBIT\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE05  
RABBIT\_PICOBIRNAVIRUS\_PROBE06  
ENCEPHALOMYOCARDITIS\_VIRUS\_PROBE01  
ENCEPHALOMYOCARDITIS\_VIRUS\_PROBE02  
ENCEPHALOMYOCARDITIS\_VIRUS\_PROBE03  
ENCEPHALOMYOCARDITIS\_VIRUS\_PROBE04  
ENCEPHALOMYOCARDITIS\_VIRUS\_PROBE05  
ENCEPHALOMYOCARDITIS\_VIRUS\_PROBE06  
ENCEPHALOMYOCARDITIS\_VIRUS\_PROBE07  
ENCEPHALOMYOCARDITIS\_VIRUS\_PROBE08  
ENCEPHALOMYOCARDITIS\_VIRUS\_PROBE09  
ENCEPHALOMYOCARDITIS\_VIRUS\_PROBE10  
ENCEPHALOMYOCARDITIS\_VIRUS\_PROBE11

ATAGTAGAACTGAATCTTGATTTTTTTATCTATTCTCACTGAGGATCCCCCATGATACATTTTGCAGA  
TTCCATCTGTTTGCCTCCCCCGTCTGCTGCAATAGGTGTTTTAAATGGTCTTGTGTAGATGCTTC  
GTAAGCCCAATGCTCTATTTGTTTGCATGTATGTGTTAGTCTACATGGTTTACAAATCAAAAAAATGT  
GTCTACCAATGCATATCTTGGATCCACTCTGCTGCTTGTATTTTTCATCTGTTTGCCTCCCCCGTCC  
GGCTCCCCCGTCTGCTGCAATAGGTGTTTTAAATGGCCCTTGTGTAGACGCTTCAAAGAATAATA  
CCAAGTTAAGCTGGCTCATGGTGTGCAATGATTGCCAGTCACTTGGCTGGAGCCAAACTCCCCAAGC  
TTGCTGCAGGTGTGTATGGCAAAATGTTGTTGAGTCTACTGCAACCATCATGCAAGCTGTAAGGTCATT  
CAGGTCTTGTATAAGCGGCACAGACTGCATGTTCCAGTAGCAGTTGGTAACCATTTAGTTACACTCAT  
ATATTTGCTCTTGGAGGTATACAGGACTTGGGTGTGAAAATGCAGTTAGTGGACCATAGCTGTTAAAAAC  
TTTGAGCATTATCTTGAAGCCAGTTGGTAGCTTTTAGTACCTCTTCCGAGTAAGTGTTCCTCCGCTGCCAT  
TGTCCTGATTGCTGAATCTGGCGGTGTTGGAGTAAAGTGCAGGTTGGTGAAGTGGTGTGTTGGCTCG  
TCCGTTTTGTGAGGCTGCGATTTCTGATCCCATTCCATGTCTGTTGCCTGGTCCCATGATGTTTCTGC  
CATTACCAACTAAGTTTCAATGTGTTGAGCAATTACTTTTTCTGTTGATGCTGGCCCATGAAATAG  
TGACTTTTTGTGTTTTAAATACATAAGAGAATGCTTCTTTTTGAGCATTATCTTGAAGCCAGTTGGTAGC  
TTCCCCAATGATGCATATAGCTAGCCATTGTTGCTTGGTAACTTTCTTTACCAACCAAGCACATATTAG  
TCATTTCCGCATCTGTTGTATCTTTGTTGAGTTATTCCAAGCAATTTCTTTCCATTTAGATTGACTTT  
GATCAGCCAACAGCTCTTTGGCTACACTCTGGCACGTTGGATTAATGCTGGTCAACTTGGAGAAGTC  
GGCCACCTCCTGGCCTCGCCACCCGAGCACAGCTGCACCAGACCATTCACGACCATTTGCGCATGAC  
AAGAAGGTATGGATGGTGGAGTCTGTTGAGTGTGTTTATCTACACTGATCATAGTGTAGTCAATTAACGA  
GTTGATAGACCTGCAGCTACGAATATTAACAGCGAAAGGAAACATCCACTACCCGCTGTTTCCAGTC  
TGCTGGCAATGTTTCTTGTGATTTACGATTAGCGGATGCGATTTTCTCAGACTGGCTCGATGGCAGCT  
TATTAATAATTTACTCCATACATTAGGGGCTACTTGCATAAGTAGTCTCTCTTTCTTAAATAAATTTCA  
CATACTTCATGCATCCGAGCCAGAGTTTACCCGTAAGGATGGTCCAATCATTACAGTGCAGCAAGGGAC  
CAAGATTTTCTGTTGGTGGCACGTATCGATTCGTTCCAGCTCAGCTCGGTCCAGAGCTAGCTGTCTCTCTT  
ACGACTTGGTGTAGCCAAGGAAATCTGGCATCATGTCGATAGCCTTCTGGGCCACACCAGCGATGTTGTC  
CATCACATGGTATAGTCTTAGATACAACCTGCTTTCCGCTTGGAGAAGTATGGCGATCCACTGTTGGTTGA  
ACGTCAGGGTTTTGTGTAATTTGCCACTGACGGCTGGGAAACCAGTAAGAGTGAAGTTCAGGATAG  
ATTGTTTTGCCCTACAAACGTAACACAAAGTACGCAACAGAGTGGTCCAGACTGAAATGATGACCG  
TAAGTGATAACTCTCTGAGAAGCATCTCCGCTGCGTCTTCCAACATTTCTTGAAGTACAACACATTCC  
ATACTAGCATTGTTACCCACGAACAGCTGGTCTTTAGACCAGACACAAGTGAAGGATCATATCTAAGAT  
AAGGATTTGCTTGACTCTTTCTTCATATTTACCTCCTAGCTGAAGAGTCCGAATAATCCACCTTTACCA  
GCCTTATCGAACTCGATGGTAGCCATAAACGTGTCCACTCCAGCACGCTACTATACTGCGGCTCCATGA  
TAGTTAGCGAAAGTTATGGCTCTGCGAATTTCAAAGAGCACACGATYCGCTTCTTGAATAGCAAGAACC  
GAGTTCTGGTCCATTAGGCAGGTTATCCTTGGACCAACGGTTGTCCATGGCAAAGCATCAAGGTTGG  
GCAGTGTTTTTGGTTAACTCTCGCTGTCTCATTGTAAGTCCCTGCTCCTGCTCATCCAATTGCACACG  
ATGGGGCAAAGAGCCGATCATATTCCTGCTTCCAGAAATGAACGGCAAGCATAGTATCGAAGTGAAGTT  
CAATCACCAAAGTCCAGGAAGCATGTTGTGTCAGGAGGAAGTGGGGGCTATGTTTACATATGGCACCTC  
TCAACCAATCAGAAAACACAGAGTTACGCTCCTGTACTTTCCGCAAAGCCTCTTGAATTCCTCAAGCTG  
GAGTCCCTGGACGATAGTATGACAACATTGCTTCCAACGCTCTCTGTTTCATGACAGGCCGATACAGAGG  
ACTGAACTTGACCCGCCATCCAGTTTTACCAGGTAGTCCGGCGGAGGGCCGACCAAGACACCACC  
TTACATTTCCCATGCATCCGATAGAGAACTTAATGTCTTTATAATCTTCATTGCTTTTTGGGCGTCTC  
GCTCATCCAATTGCACACGAACAGATCAGGCTTACCATCTGCTTACCAGCCTTGGCCATCTTGACAAC  
AACCGACAAGACGCCACTGTTGAGGTTGTTGACCGTATTGCCGGCAGTGTCTTGAGACACTCG  
AAGCTGATCCCATAGCTTTGCTGGCAAGGTCGTTCCGCGAGTAGGGTTTGGCCATTGATGACACTGCCCG

ENCEPHALOMYOCARDITIS\_VIRUS\_PROBE12  
THEILOVIRUS\_PROBE01  
THEILOVIRUS\_PROBE02  
THEILOVIRUS\_PROBE03  
THEILOVIRUS\_PROBE04  
THEILOVIRUS\_PROBE05  
THEILOVIRUS\_PROBE06  
THEILOVIRUS\_PROBE07  
THEILOVIRUS\_PROBE08  
THEILOVIRUS\_PROBE09  
THEILOVIRUS\_PROBE10  
THEILOVIRUS\_PROBE11  
THEILOVIRUS\_PROBE12  
THEILOVIRUS\_PROBE13  
THEILOVIRUS\_PROBE14  
THEILOVIRUS\_PROBE15\*  
THEILOVIRUS\_PROBE16  
THEILOVIRUS\_PROBE17  
COSAVIRUS\_PROBE01  
COSAVIRUS\_PROBE02  
COSAVIRUS\_PROBE03  
COSAVIRUS\_PROBE04  
COSAVIRUS\_PROBE05  
COSAVIRUS\_PROBE06  
COSAVIRUS\_PROBE07  
COSAVIRUS\_PROBE08  
COSAVIRUS\_PROBE09  
COSAVIRUS\_PROBE10  
COSAVIRUS\_PROBE11  
COSAVIRUS\_PROBE12  
COSAVIRUS\_PROBE13  
COSAVIRUS\_PROBE14  
COSAVIRUS\_PROBE15  
COSAVIRUS\_PROBE16  
COSAVIRUS\_PROBE17  
COSAVIRUS\_PROBE18  
COSAVIRUS\_PROBE19  
COSAVIRUS\_PROBE20  
COSAVIRUS\_PROBE21  
COSAVIRUS\_PROBE22  
COSAVIRUS\_PROBE23  
COSAVIRUS\_PROBE24  
ENTEROVIRUS\_A\_PROBE01  
ENTEROVIRUS\_A\_PROBE02

GCTTACC GCCTTGGCCATCTTGACA ACTTGGGAAAGTGCCAGAGTCGCAGCACACAACATTGCAGAAAT  
ACAGACAGACAGTAGTGGTCAAATCTGGATTGTGAAGATAAAGAACTGAAGCAGCAACCATTTTTACAAT  
AGAGGTGTCTTTGACCAACAAACAGGATTGTGTAACCTGTGCCTTGTCTGCATAAAAGAAAGTGATAGG  
TTCCAATTGCTCTCAGTAACATACTTTGTAACCAGACATGGGTGCTTGGGATTTAGTTAGCACCCACC  
CTTCAACCATTTCTGAGTGATTATCGTAGCAGCAGCCATACCGCCACCACCAGCCGAGTGCATTGCGTA  
TTCCGAAGTCAGATGTTGGAGCAACACCAAAGCGTGAGGTGTTAGAAAAGTCAGAGAATCCGTTAAACCA  
CGTCAATTTGATCCTGTAGGGCAGCATTGTCTGTCTCAGGCAAGTCAACACATAGTCCATGTCTATTACC  
GAACAAACGAAATTTGATTGCTAGAACAGCTCCAACCAGCCACATGTGTGGGTCTCGAGTGTCTGCGAG  
ATAAAGAGGCAATGGATGCAAAAACAATCGCTGAAACTTTGAGCCAATCTGATAAGAAATTTGTCTTTT  
TGCACACGAGCATTCTGCCTGCCGTGTCAGACC GAAGCCTGGAATCCGGAAGGTGAGCACAGGACGTCC  
CAGAACCACACCAACCACGTGCGAGTTTGTAGCTCGATAGTGGAGGCAGTGGTTGAAGCAGGCTCCAGTTGT  
TGGTGATGAGTGGGAAGTTGGCACCATTGGCGCCACCAGACCCGACCCATCGCCACTGGACGGGAGCCTT  
CAATACCAGCAAAAATGATAGCAGAAACCTTCAACCAATCAGAAAGAAAATCAGAACGCTCGCGGGCTTG  
ACATTCCTATGGGGACAGCTCTGCTGTAAGTAAGGAAAGCCACCCGGGTTTGGTTCTCGGGTAGCTTACTGG  
CAACTCTCACGGGCGTGGGCCAAATTGATTCTTTAAATTTGGAGGCTAGTTTTATGACAGCAGAAAGTGA  
TGGGGACTGGATTGTCAGCATTGATCTTGGTGGTGGTGGGCGTTGGCCAGGGGAAAAAGAGGGTGGGGC  
CATGTATGAGTCTCTGTTTGTAGTAGTCAGCATGGTATCCGCGCACAGCCTTGAAGAACTCGCGGAAAGT  
CTGCTTCAATCAACTCTCTGTTGATGATGGTAGCGGCGGAAGGCCCTCCGCCTCCAGCAGAGTGCATTCC  
AAGTGGGCGAATTGCTGTCTGTCTCAGTCCCATATGCCTGCAAAACCCCTTCCAGCAGCTTGAGAGTTTAC  
AAAGATTTCTGCCTTGTCTGTGTTACTAACAGAGAAAATAAGGGAAACTACGCTCGCTAGTCTGTCACT  
GGACCACGTAAACTCAAGGTCAACATTAAGTAAGGAAAAGGGCAACATCTATAAGAATTCATCACC  
GCGAAATGGGCAACCGTAAGAAAAGTCACTGCCAGCTGACATCAACATCAATATCTGTTGGGTAGGAGG  
ATCTAGCTCTTTCTGATAGCCTAATGTGTGGTGTCCGAATGAGCGGTCTGGGAGCATAACCCTTAAATC  
GTAACATTACTTCAAAGCCATTTTGGCAAAAGCATGTGATTTAATGTTTTTGGCCATAACATTTCCATG  
GTGTTATGATTTACATTAGCATCAGGATTTGTTGTAGGAAACCTTATAACAGGTCTGGGAATATAGCC  
TAGACACCAAAGTGTGCTGAAAGTGAGGGTCAGAAAAGTAGAACATTGCACTTGAAGAGAGGAGTGTCTT  
AAGATACATTTTTGTTGGTGTATTGTCTGAGTAGAATAGTGTGAGTGGGCAATTTCTCAGCCGGAGG  
AGGAAAGTGCATTAAGCAGA ACTTGCATTCCAAGAAAACAGATACAGTACCGTTTTCGGGAGTAGA  
TAGGGGATGCCCCGTCAGCATATTTGAGGGGGTTACTACCATAAATACTGCACTCCAGATATTATGAAC  
CCTGGGCAGAAGCATCAATAGAGCCATAATAATTATTAGCATAAAAAGTTATTAACAGTTGTGCCATTATT  
CCGTGGCTAAGTGAACCGTGACAGTGTCAATCGTGGCGCCCGGAGGGTACCAAGTGACGCGCCAGCGGCC  
CTAAGGAAACCAAATCACCCACTGGTTCAAGCATGTAATCTTTGGGAGGATTAACAGTCATTCCATAACA  
TTCTGTCTAAAGCACGAGGGTCAGAAATGGTGACGGGGTTGAAATCTACAAGATTTGTTGTTGCAATTAT  
CAGATGATGTATTAGGATCCATCCTGTCCAAGCCAGGTATTTCCAAAATTGCCTCTTCCACAGTTAAAGG  
AACCTGGTAGTGCGAGCTGCTTGTGAGTAACTGGTAGCTGAGTTTTTAAATCAATCAATCCATATTCAA  
AACTCCGAGAATGCCAGATACAGTACCATTTTCAGCAGGAGTATCGCCCCGACTGAGGAGGCAGAAGC  
TCTCTCTATTGTTTACAGTAAGAGACATATTACCAGATTCACCTGTAGTCTAAAACCTTGAACAACCTC  
TTGAAATAAGAAAATAGGGTTTCTGTTTTGTGGTATCTTCATCTGCCAGCAGGAAACAAGGGACTTTTGC  
GTTCTTTAAACAATTCAGCAATTCTTTGACTTTGTTGTTGAGTCAAAAACAGAAATCACACTTCTTTT  
GACCCAAAGTCCCATATGGTGTAGGTACCATCATTGCTTGTGTTTATGTTTTGTGGTTTACCTGCACCTGG  
CTATGTTTGTGCTTTTGGGTTAATCAACTGGTGTGGATATGAAGAGTTGTTGAGGAATTGTACCAGC  
AGTTAGCATAAAAATATTGACAATAGTACCCTGATTGCCATTGCTGGACACACTCTCCTTGTATTATT  
ACCAATCGCACCTCATGCTCGCTGTAGGGCATTCCGAGCCTGGAGATTGCGGAGGTATTCTCAGGTGCCA  
ATCATGGCTAAAAAATTCACGCATGGCTAATGCTGCCAAAGGGCTAGAATGGATATCTAACAAAAT

ENTEROVIRUS\_A\_PROBE03  
ENTEROVIRUS\_A\_PROBE04  
ENTEROVIRUS\_A\_PROBE05  
ENTEROVIRUS\_B\_PROBE01  
ENTEROVIRUS\_B\_PROBE02  
ENTEROVIRUS\_B\_PROBE03  
ENTEROVIRUS\_B\_PROBE04  
ENTEROVIRUS\_B\_PROBE05  
ENTEROVIRUS\_B\_PROBE06  
ENTEROVIRUS\_B\_PROBE07  
ENTEROVIRUS\_B\_PROBE08  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE01  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE02  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE03  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE04  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE05  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE06  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE07  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE08  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE09  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE10  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE11  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE12  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE13  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE14  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE15  
ENTEROVIRUS\_C\_PROBE16  
ENTEROVIRUS\_D\_PROBE01  
ENTEROVIRUS\_D\_PROBE02  
ENTEROVIRUS\_D\_PROBE03  
ENTEROVIRUS\_D\_PROBE04  
ENTEROVIRUS\_D\_PROBE05  
ENTEROVIRUS\_D\_PROBE06  
ENTEROVIRUS\_D\_PROBE07  
ENTEROVIRUS\_D\_PROBE08  
ENTEROVIRUS\_D\_PROBE09  
ENTEROVIRUS\_D\_PROBE10  
ENTEROVIRUS\_D\_PROBE11  
ENTEROVIRUS\_D\_PROBE12  
ENTEROVIRUS\_D\_PROBE13  
ENTEROVIRUS\_E\_PROBE01  
ENTEROVIRUS\_E\_PROBE02  
ENTEROVIRUS\_E\_PROBE03

CTAGTCTCAGTCCAGTCTGGTTTAGAGCACTGGAGCTGGTCTCAGGGAGGTGGGCTATAGTGAGGAGGC  
TCCCGGAGCTCCAAAACCTACGTCCCGGGATTCTTTGCCTGGCAGACTGCTACCAATCCTTCCATCTTC  
TTTGAGGCCATCCACAATCGAATGACGCAGACTATGGCCAATGTCCAAACAACATGATGGGCACCTTTA  
CACCTAACAAAGTCTGTGAGAACATTGTTGGCCCCAGGTTGTAAGGGAACCCGGAACACTTGCCTTCT  
TTGCGTCTCTTCTGTTTTTTGGAACCCCTGCGCCTGGTGGTGAATGCTAACAAAAACTTCCCACTGGC  
AAGGGGTATCCTTTAACATACGCACAGAGAAATCATTGCATGCCGATACGAAGCACAAAGATGTCGCATGT  
CGTCCGCTGGAACAATGATATTTGTTGGTACCAGCATGTAACATACCCTGCCGCTGTATACTCATCTC  
TGTATTACGCCACCTACAATAATAATTCTGAGAAGGGCTACGCAGAGTGGGTTATCAACACCAGGCAGGT  
TGAGGTGGACTCTGTGGTCCCAGTGAACAACACTGACAACAACGTGAATGGTCTTAAAGCCTACCAAATC  
GCCAACAAATGTTCTCAACAGGACTTTGTTAGGTGAGATTTTGAACACTACACCCACTGGAGTGGTAGTA  
CTGGTACCAAACAATATCATTGTTCCAGCGGACGTTCAAAGCACATGCGACATCTTGTGCTTCGTATCG  
GCATCACATGAGGAATCTTAGTAAGTCACATGCCTTCTTCAACCATTGCCAAGGAGATATACACA  
TTAGTTTTGATTGACTAATATGGGAAGTGTCCCTAAGCAGTCTGACACTGAAATCTGGACACGCATAAC  
CTCCACACTGCAACTACACTGGCAATGATCAGTCCCTGGGCTTAGATTCCACCACCATTAATC  
TAGTAACGTTAACGATCCAGCCTTTCTTCTCACAGTAATCCCTAACCTTTGAGAATCCACTGCTTGTA  
GTGCACACCGCTGTACTGTGTTAGAGATCCACGGTGAACCATGGAACAACACTGGATTGTAACCCTAG  
ACACCAAAGGTCTCTAATGTCAGCAAAGGCTACTATCCCTCACCCCTGCAGTGATGATACCAATCAC  
CTCTGCGACTGCTGCAATGTGGTAACAGCTTGAGATATAGTCATGGCCCTATTGATGTTCTTTCTAA  
AGGCACAGGGCGACTGGAAGTCATCAGATGTAAGGAATTGATTGGAACCAGGTGTGTTTATTGTTGGCAA  
TCTACTGATTGTGTGGGTGAACCCTGCACCAAAGCTGTACCGAGGGATTGATGTAATGTTATTCC  
TGAACATCTGGTGGGGTTGAAGCAGGCACAACAATTCTAGTTTTGATAAAAGCAAGTTATAAAACCCGCC  
CAGTCCCGTGGTTCGCGCCATTATATGCTGTGGAGGCACGCCGGATTAGCAAATGGAGAGCACAATAA  
CAATGCAGCTAAAGGGCTTAGATGGGTGAGCAATAAAATTTCCAAGTTTGTAGATTGGTTGAAGTGTAAA  
TTTTACGTATTCCAGGTTTACCTTGAATGACTTTTGTGTTTACAGAGAATTACCCTAGTACAGCCAG  
AACTGAAGCAACCAATGGAGTAAATAGCCAGGAGTGCCAGCTCTAACTGCTGTGGAACAGGAGCATC  
GAAGTGAAGAATATGATGGAAGTACTGAAATGACACACTGATCCCAATGAACGCAGTGGACGGGAAGG  
TAGGGTTACAATCCAGTTGTTCCATGGTTGCACCGTGGATCTCTAACACAGTGTACAGGCGGTGTGCAG  
AGTGGGTGTCAGATTTAGTGTGACAGTCTTAGGGACACTTCCCATATTAGTCAATCAAACCTAATAG  
CATGAGTAGCTAGCATGGCTTGCATCTATCTGTTGGGCTAGATCCACCAGGTGGTGTGTAGCAAATGAT  
GATATCTAGCTGGATAGTAATCACTTTTATTGATCCACTGAATACCAGGGCCCTCAAAGCATACTGGGTA  
GGTCGTTTATTGCATCGGGTGTGGGGTCTCAGGTGTCACAGATATTTAATTTCTTGAAGTTGGTGG  
CTCTACTAATGTGCTTGTCCACCACAGTTCAGTGGGTGGGTGCATGACTATCCATCCCTTCTTGGCA  
CTCTGAGCCTCTCCACTCCACTAGCGTCATTACATTGTTAATTTCCATCATAGATTCAATTTGCACTAT  
CAACTATCCCTCACCGCTGCGGTGACGAGTCTATCACTCCATGTGAGCAGACTAAGAGGCCCCCGCA  
CAAAGATTCTCCAGAAGCCAGAGAAAAGCATGAATTTGTACAAAAGCTCAAGCAACTGCCCGCTATTGA  
GCTCCTTTGTATGCACTAGAAGCTAAGAGGGTTTCTGCCCTAGAAAAGGAAAATTAACAACACTACATCAGT  
GCTAACGTTGCCACTGGAGGCTCAAGCATAACTTACAATCAAATAAATTTCTACAAAAGATAGTTATGCAG  
CTCCCATGTGTGCTGAATACAATGGGCTTAGAAATGCCATTACACAAGGAGTGGCCACTTGCTGTTGCC  
ATGATGTAATGCTAGTTACCCACATGAGATAGACCCTGGCCTATTGGCAAAGCCGGGAAAGAGTATGG  
TCCTGCCAAAGTATGAAGATGATTACAATGATGCAATCTCAGCGTAAACACTAGCAAGTTCCCAAACAT  
TAGAATTGCAGTTGTACCCACCATGCATCAGTTGAGGAAGAAATTTACATTAATGATGTTCCAGTAAAA  
TAGTGCGGGTCTCAATCATGCTCTCATCCCTGGCAGTTGACGTGGCACCAGTCTCAGCGGCTGCAGGGC  
CCTGGGTGAAGTCTTGTGTTCTGCGCTGCAAGCCGCGGTGGCTGTAGTAGTTAATGTTTATAATT  
GGTCTTCAAGTATGCCTGGGATCTTTCGTCCACCGAATGGACTCATGGATGTTGACATGTCCATGACCGG

ENTEROVIRUS\_E\_PROBE04  
ENTEROVIRUS\_E\_PROBE05  
ENTEROVIRUS\_E\_PROBE06  
ENTEROVIRUS\_E\_PROBE07  
ENTEROVIRUS\_E\_PROBE08  
ENTEROVIRUS\_E\_PROBE09  
ENTEROVIRUS\_E\_PROBE10  
ENTEROVIRUS\_E\_PROBE11  
ENTEROVIRUS\_E\_PROBE12  
ENTEROVIRUS\_E\_PROBE13  
ENTEROVIRUS\_E\_PROBE14  
ENTEROVIRUS\_E\_PROBE15  
ENTEROVIRUS\_E\_PROBE16  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE01  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE02  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE03  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE04  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE05  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE06  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE07  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE08  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE09  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE10  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE11  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE12  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE13  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE14  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE15  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE16  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE17  
ENTEROVIRUS\_H\_PROBE01  
ENTEROVIRUS\_H\_PROBE02  
ENTEROVIRUS\_H\_PROBE03  
ENTEROVIRUS\_H\_PROBE04  
ENTEROVIRUS\_H\_PROBE05  
ENTEROVIRUS\_H\_PROBE06  
ENTEROVIRUS\_H\_PROBE07  
ENTEROVIRUS\_H\_PROBE08  
ENTEROVIRUS\_H\_PROBE09  
HEPATITIS\_A\_VIRUS\_PROBE01  
HEPATITIS\_A\_VIRUS\_PROBE02  
HEPATITIS\_A\_VIRUS\_PROBE03  
HEPATITIS\_A\_VIRUS\_PROBE04  
HEPATITIS\_A\_VIRUS\_PROBE05

TCATGAAGGGTACTGAGAATTGGGCAGGTGGTCCGTCGGTGTCCGCGAATACCGAGGGGTTGCACCCAGA  
AGTCGTACCATTTCTCTCGAGCGCCTTGAATGAAGGTAGATGGAGGGCTCTCCCAGACAGGAACGGAACG  
TGAAGTCAATGCGCCAGTTGGTGATACTGGTGCCAGTGGCCAGCAGCGGCATACCCACGAGTGAGGAGCC  
CCAGGTTGTACCTCTTCTTGTATGGTGCTTGTCTGGGTGCACGTGGGATCCAGCAGCTGGTGTGTTTTAT  
TTGAGCCTCCGGTAGCGTAGGTTCCAGTAGTGTGGCTCCCGCAGTATTTCTGCTCAACTGGGCTCCCAT  
CTGGCAATCTTACCAGCGTGATCTACTTGTACTAGAGTTGATGCTCACGGGTGTGACACCATCGTCCGA  
ATCCGGTCATGGACATGTGCAACATCCATGAGTCCATTCCGTGGACGAAAGATCCCAGGCATACTGAAGA  
CAAAGATCCGTTCCGTTCTGTCTGGGAGAGCCCTCCATCTACCTTCATTCAAGGCGCTCGAGAGGAAATG  
TTCCACACCAACCCTGGAACCATCTCCGGCTGTGCCGTTGGATGCGACCCTGAAACCTTCTGGAGCAA  
AAAATATTGATTTGGATGATCTTAAGATAATAGCCTACGGGGATGACGTGCTCGCTCGTACCCGTATGA  
TTGATGATGAATCCCCACCAAGGCAGGCCAATGCGGTGGTGTGGTTATTAGCATGGGTAAGATAGTGG  
ACACTGATGCCACATCAGTGGACAAGCCCACTGAACCAGGTGTATCAGCGGAGCGCTTTTATACCCCTCCG  
AGCCCTTCTGGCTCGAGGATGGAACGTCTTTAGGAAACTCCCTGATCTATCCGCACCACTGGATCAACT  
TGCTGGAGGAGTCATGTGAAGACCTAGTTTTGCCAGCTTTGGCCAATTCAGCTGGGTCAATTCTGTA  
GTACTGCTACCACTAGTAATGTGCCCTGATGAACTTCGTGGCATTACATTGCACGTGTATAGACCACCC  
TGCGTGCATCTCTGGTCCACCTGATAGATTCGTAATCTCTTTCATGGGCATAACCGGATGCACAAGAAA  
TTCCAGTGCCAGCTGTGCCGTGAATCAGGAGACATACAGGCTCAATCCGTTGCTTGCTCTTGAACGTAT  
ACTCACCATCCATCATTACTGGAATCTTGCTCCAAAAGGTATCTGGGTACATCCAACAGCGCATCCAGT  
CTACCACGGCCTGCTGCTGGTATCCGTCAAAATGGTCACTGTCTGGAGGAATCGCATAAACTTCTGAGT  
GTGGGGCATATCTCCGTCAGTGGTGGTACTAGTGAATGTTTCAAAGATGGTCTCTCTGTTGTTCACT  
ENTEROVIRUS\_G\_PROBE08  
AGAATATGAGCACTCAGAAGTTTATGCGATTCTCCAGACAGTGACCATTTTGACGGATACCAGCAGCAG  
CATTGATACCATGATCTCAGCGATGAGAGCGGAATGGAAGAGGAGAAATCAGGTTGGGCTCTGTTATGTA  
CTGAAAATTATAGCGTATGGGGACGATGTCATCGCCAGTTACCCATACAGAATTGACCCAGCTGAATTGG  
AGGCGGCAGAAAACGGCGCCAGCTCTAATGCTAGTGATGAGGGCATGATGAAACTAGACATGTCGTCAA  
AGTACATTAGGAACCCAGTGTTTGAGACCCAGGACAGAATTGTACCAACAGGAACAACATAACCACGAC  
CCTATGGTGAATGGCCATCGTACTTAAGTGATTTGGATGCTACCCTGTAGACAAGACTACCAACCAGG  
ATTCGTTGGGATTACCATTACATTGGCCCCCATGTTTTCAGAATTCTCAGGGCTACGCAGAGCAATAGCC  
AGGCACTGTGTCAAGTTGAGTCCCTACTGGAATCAACAACGTGGATGGTAAAACAGGGATTGAGAGATT  
TGGCTGCACAACCAATTTCTCATTGAGAATTCTAAAGGATAGACCTGACATTACACAAACAGCAGCATT  
ENTEROVIRUS\_H\_PROBE01  
TTCCACGCTCATCTCAGAAGTGCATGACGATTCTGCACGGCCCCGCTCTCAATGGTGGACTCAACACT  
ATGTGGTTACCGCTTGATAAATGATGCTGAGTTTGCATAATCACGGGAAACCGTGATCTCAGTAGGAGT  
TCTCTATATTAACATCAAAATGGAACCGCCTGTTCCAGAGCCTTGCTATCTGATATTGTGGGGCATGTAT  
CTGGAACATCCAGCCCCTTCTGTCTGCAATAATCTCGGACCTCCCCTGAGTCAACGCTACAGAGAAGATC  
CTGAAATACTCTGGCTATTGCACGGCCAATTATTGAAGTTGCCACAGACTTTCCAGCACCAGGACTCCC  
GAACAGCCCAATGCTAAAGTCACTACTAGACTCACGCGTGCAGACACTACATCAGTGATTACTTTTTTC  
TGTGCCAAGCCAAATAGCACAGGGAGGTGACATGTTCTTGGGTGTGTTTTGCATTTCTGTCCATCTAAT  
AATCCTCGACCACAGCTACTTCTGATTCAACTGTCCGCGTGCTGCCAGACATGATATAATTGGTAACAGT  
TGTCAGCCGGAGTCATTGTTAGACCATAGTCTCGTCCAGCAATCGCCAATTTCCAGCATCAATCTTATA  
ATCTCATTGGACATCCTGACACTAACTGACAAAATCTGACCAATCCTCATCTGTTGTGTTTTGGCCAAT  
CTGAAGCATTAAATGAAACTGAGCAGCCAAAGTTGGAATAGATGTCCAAGTAGTAAAATGAGTAATTTT  
TTGCTTCTTAAACATAAACTGTTTTGGACTGGATTTGACCAATTTGAAGTTGCTATTATAAAAGGAGA  
CAACATTACCAGCTGAAATTGAATGAAAGTTCCACTCTATTAATAAATAAACTCCATCATTTCAATTC  
CCCCACCACACATTCAGGAAGACCTTCGCCTTTTCTCTCCATGCCTGATCCACAGTTAAATCAACTGT

HEPATITIS\_A\_VIRUS\_PROBE06  
HEPATITIS\_A\_VIRUS\_PROBE07  
HEPATITIS\_A\_VIRUS\_PROBE08  
AICHIVIRUS\_PROBE01  
AICHIVIRUS\_PROBE02  
AICHIVIRUS\_PROBE03  
AICHIVIRUS\_PROBE04  
BOVINE\_KOBUVIRUS\_PROBE01  
BOVINE\_KOBUVIRUS\_PROBE02  
BOVINE\_KOBUVIRUS\_PROBE03  
BOVINE\_KOBUVIRUS\_PROBE04  
BOVINE\_KOBUVIRUS\_PROBE05\*  
BOVINE\_KOBUVIRUS\_PROBE06  
HUMAN\_PARECHOVIRUS\_PROBE01  
HUMAN\_PARECHOVIRUS\_PROBE02  
HUMAN\_PARECHOVIRUS\_PROBE03  
HUMAN\_PARECHOVIRUS\_PROBE04  
HUMAN\_PARECHOVIRUS\_PROBE05  
HUMAN\_PARECHOVIRUS\_PROBE06  
HUMAN\_PARECHOVIRUS\_PROBE07  
HUMAN\_PARECHOVIRUS\_PROBE08  
HUMAN\_PARECHOVIRUS\_PROBE09  
HUMAN\_PARECHOVIRUS\_PROBE10  
HUMAN\_PARECHOVIRUS\_PROBE11  
HUMAN\_PARECHOVIRUS\_PROBE12  
HUMAN\_PARECHOVIRUS\_PROBE13  
HUMAN\_PARECHOVIRUS\_PROBE14  
LJUNGAN\_VIRUS\_PROBE01  
LJUNGAN\_VIRUS\_PROBE02  
LJUNGAN\_VIRUS\_PROBE03  
LJUNGAN\_VIRUS\_PROBE04  
LJUNGAN\_VIRUS\_PROBE05  
LJUNGAN\_VIRUS\_PROBE06  
LJUNGAN\_VIRUS\_PROBE07  
LJUNGAN\_VIRUS\_PROBE08  
LJUNGAN\_VIRUS\_PROBE09  
LJUNGAN\_VIRUS\_PROBE10  
LJUNGAN\_VIRUS\_PROBE11  
LJUNGAN\_VIRUS\_PROBE12  
LJUNGAN\_VIRUS\_PROBE13  
SALIVIRUS\_A\_PROBE01  
SALIVIRUS\_A\_PROBE02  
SALIVIRUS\_A\_PROBE03  
SALIVIRUS\_A\_PROBE04

CACCACCCTGGGACGGATCAGATTTCCAATCTTCTGATCCAAAGCAAAGACATCTTTGCTCTTGCATC  
CACCATAATGTTTACAAAATTTGGTTGCCAATGCAATTGATGTTAAGCTCTTTCTCCCCCTCTTTTGCC  
CAGAAATCCAGGGAACACGAAATCTCAAAGTTGACTGCACTCTGTAATATCCACTTGCACAAGGAGC  
CCATGGTGGAGGTGGCAGCGGAGACTGGGACCTCCGCCATGTAGAAGTTGGAGAGCATTGGCGCGTGGG  
TTCCCATGACCCGGAGGAGAGCTGGCCAAAGTTGGTACCTGACCAGTCCTCCATCCGAAGTATGAGGT  
AGCACACGACCAGCGGCCGTAGTGTGCTGAGCGGAGCCAGTGAAGAGGAGGTGGGCGCGGAGTTCACCCG  
GAGGGAGTTCCTGGCCAGCCACGGCAGATCCGAAAGTGCCCGCACCTGGGACGGCGGAGTCTTCCAGTG  
GAATGTCCTCAGGGGGCTTTTGGTATCTGGGTTTGGGGTCAAGAACACCAGAGTGAAGTGGACAGGGATC  
AGGAGTTGGAAGCAGATAAGAAGGCGTGGATGGTAGCACTGGGAGGTGCTGCAGAAGGTGCAACAAGGGG  
CGTCAACCGCGGGGTCCACGTAAGAATAGAGGGTTTTCTCACGTGTCTCCACACGGAATCTGCGCCACGA  
ACAGGGTGAGTTCACCACGCCACTGTGTGAAGAGGTCCAGGACGAAGGAGATGGGTGTGCCAGATGCAGA  
AACGGCGCAGTTGGTCTCAGGAGTGGAGGGATTGTCAGAGTACTGGAAAGTGGTGCCTGGCTCAGGTGT  
AGCGTGCCGGTGGAGATGGTGAAGGCAACCCGGGATGATGATACTTTGCAGTCTCTCTGTTCTATTTC  
CTAAAGGGCCATCATCTGTGCTGAGGTTAGTCCCAATTCTGTTGGTGAATGGTTTGTCTTACAATCTTC  
CATGGAGGCATAACTCCATCAAGTAGGATTGGAGTTGCTGCTTAAATGTGCTGAAATTTTTCATCCACAT  
GTACTGTAATTATGCCACTGGATGATAAAAAATGGTTCTGTTTGTCTCAGTGTGATATGTATGCCAAC  
AGCTAAGGAATATCTTATTCTACCAGAGCTGGTACCAGTTAGCAATGGTTTACACAGTAAATAACCTAA  
ATCCATCATATTGGGAGTAGTCCATTTATAATTGTAATCATTGAGTGCATTAATCATGAAGTGCCAATC  
AAAGGACCAGACAAAAAGAAAACACAAGAATTTATCAGCGTTACAATGATTGTTTGTCTAAATTTAA  
CACCACAAATAAACCTGATTTTTCCAGTACAGTCTTATTAGATTAGGTGCTCTGAGGAGAAGTTC  
CAAAAGTGAAGGCAATTTAAGATTCTTGGTATGCACATTGCTGGGAATGGTGAAGTGGGTGAGCTAT  
CCTCAGCACAAAGATGATGGCCCTTAGGAAATGACAAACCAAAATTTTTCTTAACTTAAAGTCTATGAA  
GGTGCCCTATCACTTCTGTTTGCCTACTTTACTGGTGAATTAACATCCATGTTCTATTTCTTAGTGATA  
TTAGCTTGAGATGTCCAAATTTCTTTCCCTTACCAGCACCAAAACAGCAACACGTAATATAGAGG  
TGGAGCTGAAGTGACCGGTTACGCAAGGACGAACCACCATGAAACCAAGGATGGAGGTTGAATTC  
GGATTGATTGCTTACCAATAGTTTATGGGGATGATGTCATCTTATCCCTTGACAAGGAAATAGAACCAGA  
TGTTAGGCACCATGAACATTGCATCATCCCCATCTTAATCTGAAGAATGCAGTTGACTGCATTTGGGGA  
CATAGAATGCTCTTCCACCAACCAAGGCAATAGTTTACCACCAGTTGTTGGAGAGAACATTAGCGATGTT  
CTTCATCCACTCGTTCATATGCTTCGAGACGTGGCTTCCCTGGGCGCAGGTAGTGGGAAGAAAAAATT  
CTTCTGGATTAACCTTGAGGCGGAGCGGTGCATCTGGTGTCTAGCTTCCAAGACAGCTTCAAGTTCTTC  
AACATCATATAAAAAATGAAGGATCCAAAAGAACAGCGGAGAGCATCAACCATTAGTGAATACTTTGAGG  
AAATGATGAGGGTCAATGTTAGAGTGCCTGCGAATACTGACTTGACTAGACTGGAACCCATTGGCATTG  
CTTGCGCATTAGAGCTGTAGCCAGCTATTGCGCAACAACAACTAGATGTGGCCCGTTCAATGGCGGCC  
ATTTTGAATCAATGGCGAGTGCATGCAGGACTATGAAGTGGCCCTGCATCGCATGCTACGCTATGTTT  
ATCTATCAAACCTCCGGCTCAGGAGTTGGCCCTGGCAGTGGGAATGAATCCCTGGACAGATTGGGATCCAA  
CAAGGGGAAGAAGCTGCGACTGAAGTTGGTCTTAGGGCAACAGAAAATGATGGCAGTCTTTCAGAACAA  
ATCCAGAAGATCCTTTGAAACAATTGCGGGAGGCGGCCAAGGCTTACTTTAATAATGCACAGTGATGA  
GGAGATCGCCAGAATGCCAAGTGTGTTCTTAGGAGAGAGTACTGAACCAGATGGTCCAAGGGGCTATTT  
CCAAATGCAGTCAACTGCATTCTCAGATTAAGATGGGGGATGATGCAATGTTTCATGGTGCCTACCACAT  
GGTCCAGGGTAGGTTCTCTCCCAAGAGTGGCGGGCAGCGTACTCGAGCCAATTGCGCACGCGCCCGGGG  
GCTGGATGTTGGTGACAGAGTTGGCAGCGTGGGAGAGGGTAAGAAGTTGCTTGGCCAAATCCAGGTTGGA  
TTGGACTTCTGCGCCATCAGCTCCCGACTGGAAGAGGCAAGGGCAGGACACTGTGGGAGGCGGACTGAAA  
GCGAGAAGCAATGCGAGAGGCAATAGCAGAGGAGGACAGAGGGGATGGTGGCGTCAAAGCAAGAGTAA

SALIVIRUS\_A\_PROBE05  
SALIVIRUS\_A\_PROBE06  
SALIVIRUS\_A\_PROBE07  
SALIVIRUS\_A\_PROBE08  
SALIVIRUS\_A\_PROBE09  
SALIVIRUS\_A\_PROBE10  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE01  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE02  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE03  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE04  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE05  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE06  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE07  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE08  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE09  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE10  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE11  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE12  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE13  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE14  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE15  
PORCINE\_SAPELOVIRUS\_PROBE16  
PORCINE\_TESCHOVIRUS\_PROBE01  
PORCINE\_TESCHOVIRUS\_PROBE02  
PORCINE\_TESCHOVIRUS\_PROBE03  
PORCINE\_TESCHOVIRUS\_PROBE04  
PORCINE\_TESCHOVIRUS\_PROBE05  
PORCINE\_TESCHOVIRUS\_PROBE06  
BK\_POLYOMAVIRUS\_PROBE01  
BK\_POLYOMAVIRUS\_PROBE02  
BK\_POLYOMAVIRUS\_PROBE03  
JC\_POLYOMAVIRUS\_PROBE01  
JC\_POLYOMAVIRUS\_PROBE02  
JC\_POLYOMAVIRUS\_PROBE03  
JC\_POLYOMAVIRUS\_PROBE04  
JC\_POLYOMAVIRUS\_PROBE05  
JC\_POLYOMAVIRUS\_PROBE06  
JC\_POLYOMAVIRUS\_PROBE07  
JC\_POLYOMAVIRUS\_PROBE08  
AVIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE01  
AVIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE02  
AVIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE03  
AVIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE04  
AVIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE05

GCGGCCGTAGCACTGAGCAGGACCAGTGAAGATGAGAGAGATCTGTAGAGAGCCACGCCATTGGGAGAAG  
GTTACCACCGACCATGGTATACCACAGGGAGTCATAGACATGGTAAGAAGTAGTAGTGAAGAGAGGTAG  
TCCTCAAACCTCCCGCCACGCAACCACATGATTGAGTTGGTGAGGGTTTTGCTCATCCACGACGGGATGGA  
GAGTTTGGTCTGGGGTCACTTTTGACGAGGACCCCAAGCCACTCGAGAAGATTCTTGATGTGGGACATA  
GTGGGTGACAGAGTTGGCAGCATGCGAGAGAGTGAGAAGTTGCTTGCCAGGTCCAGGTTGGACCGAATG  
AGGGAGGAGTCGAGGAAGCAGTGACAGAGTCAGTGTAGAGTTCCAGGATCTTTTCATGCTGAGAGGTGAG  
CTGTCACCCATCTATTAGAAGAATCAGAAAGGAGGAAAGGGTTCCTGAATGTTGTGGATGCAATCTTTCA  
TCATAGTGTACCTAGGCATGCCATGTGAGTGGAAACATAGTGTAGATGGTGTGGATGTTCTGTAGT  
TACACATCGGTGGTGTGGAACCCAGAGGGTTTGCAGCCCTGTTGAAGAGAGACTACTTTGTCAACAAACA  
ATGGAATCTACTACTCTTTTCATTTTGAACCTGGATCCCAAGAAACAGAGAGCCCGTGTGTACCTTA  
CCAAGAAACAGAGAGCCCGTGTGTACCTTACCACCAGTGTACACACGAGAAGTCGATTGGACCGTACAC  
ATTCTGAAAAGGGGTTTCAAATTTGATGAAGAGTACCCCTTCTGTGTATCCTGTATTTCTATGGAG  
GGTTGGGTTGGCTGCAATCCAGATGTTGACTGGTCAAAGTTGCGCGAAATTGGTGTAGTCCATGTTTGTG  
GGCAGGGCAATAGCAGATAAGTTAGATAATCAGAGACCCTATACCCTTCCACCCGATCCCAACATTTTG  
ATCTCAAATCTGTCCAAATACACCGGTGTCCATTAGACCCCAAGCAGCGGTAAGACCATTCTCCAAT  
CATTGTGCCATGCCAATAGACACAGCGAGGTGACATGTTCTTGAGTGTAGCTGGCATTCTGGTCCATCT  
TGGGTAACCTGCTCTGTTGGATAGTTGTTACCCTGGTATGTTACACCATTCTGTATTCAAATCCATTACT  
ACTTAAATTTGTGTGCTTCTGAAACTCTGGGTAATGGGTATGCCATTATCTCTATGTGTTGTCAAAA  
ACCTCAAGCCTGCAAACCTGGGAGCACATTGGGGCAACGCTAACAGTTATGGGAACAAAGGTAGAAGCACC  
ACTGACATGTTGTTGGGCACCTGGGGTACAACCAGTGTCTGTTTGTGGAATACAGTTACCCATCCATT  
CTGTGGCCATGGCTACCACAAAACATAAACTCAGAGACCCTATACCCTCTGTAATTTGCAACATCTTG  
CGTTTGGATCCAATTCATAGGGATAGGCAACCAATAAATCATCACCATAACACAAAATAACAACACTCATC  
CATGAATCCCAGGCCGCGGACAAAAGAGTCTCACATTTTCAAATTTCAACCACACAGAAACAGCCAATCC  
ATGGTTCAAGACGCAGAAGTGGTGCCAGTGGTCTTGGTTTAAAAGCAAATCTGAATTATATTTCAACTC  
ATGAGTGGCTCTTATCTTTCGCTTTCAGAGAGAAAATTTTCAAACATGCCATGGTGAGTTTCAACTGACT  
CGGGGTTCTCATTGAAGCACTGGGTGCCATTGCCTTGTACATCCCCTCAGCTGGCTGAAGTGGAGA  
AAGTACAGACGGCCAGCCGCGACCCTGTCAGGCAGCACAAGTCCAGTCCCTGCATTCCCATACAGGAACTC  
TTGCTGGCATCACTCTCACAGCAACAGATAGCCACATCTCAAATAGGTGGCATGTAGGGACTGACGTAT  
GAATATCATAGTACTCATCTGGGTTAAACAATTCAAAAGCCATGCCATGATTGCTGATAGAGGCCACAGT  
AATATTGTTGAATATAATTATAAAAAGTTTATAGGGGCATTTACAATTGTCCAGGTAGTTTCTCCAAAAA  
ATCTTTCTGTTCTTCTGCAATTCCTGTGAGGTTATAGAAGGTATATCATCCCTAATAACATGCCACAA  
TTCCCTCCCTTTGGGCAACTTGCCTTACCATAGAGGGCCTAACTGGAGACAATCTAGAATAATAGTCTGA  
CCATGCCATACATAGGCTGCCATCAACTCTAGGAGTCCCTTCTGTTAATTAATCAGTAAGAAGGAAAGA  
AGTCTTCTGGATTAATAATTGTAAGCCATAGCTGGCTGCTGAAAAAGCCCAACTGTTGAACTTTATG  
TGGTGGGATCAGGAACCAACATTCAACAGGATATGCTTTGTTCTTATCTAGGTACGCTTGTGCTCTGT  
AGGTTAAGGCTGGCAAATCATCTTAAACAAGATTCCAAAAGCCTGGGAGATTGTGGAACAAGGACGG  
AGTCACTTTCAAATGTATCTGATATAGATATTGACTTACTAAAACCCCTAAGATGCTCATCTGGGTCAAC  
CATCAAGCAACACTGTTGTGGCAGTGTGTTATATGAAGAAGTGGAGGAACATTTTCTCCTCCTGTTAG  
AGGGGTTTTTAAACCTCCTTTTCTTAGTGCACCTTAAATATCTGGAGAGTCCCTCCTCACTGCTGGGA  
CCCAACCAATCTGCTTACGGATAGGGGGCGAAAAACCTGGAAGAGACCCAGCTAAAAGAGGTTTAAAT  
GCGTTAATATCCATCGTCCGTATTTTCTGCTGCCAACGTAGCAGCTTCGGCTTCAGACAACCCCTACCATCA  
AGGCTGTCTGTGATTCCAGCAAGCAGGAGTCTCAAATAGCTAGATGTTATTCTTCAACGAACGAGTG  
GAGTGCAGTAAGGACGACGCAAGGTTCAACAGCCGTCATAGCAACACCCGACCTAGGACGATGACGTA  
AAGCTGACTTTGACCACCCACGCCATGATTCCATAAACAGATTTCTGTAGTGTGACGCCCTTCTTACCACT

AVIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE06  
BABOON\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE01  
BABOON\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE02  
BABOON\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE03  
BABOON\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE04  
BABOON\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE05  
BABOON\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE06  
BABOON\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE07  
BABOON\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE08  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE01  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE02  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE03  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE04  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE05  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE06  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE07  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE08  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE09  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE10  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE11  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE12  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE13  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE14  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE15  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE16  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE17  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE18  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE19  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE20  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE21  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE22  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE23  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE24  
MAMMALIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE25  
NELSON\_BAY\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE01  
NELSON\_BAY\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE02  
NELSON\_BAY\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE03  
NELSON\_BAY\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE04  
NELSON\_BAY\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE05  
NELSON\_BAY\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE06  
NELSON\_BAY\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE07  
NELSON\_BAY\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE08  
REPTILIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE01  
REPTILIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE02

ATGTGACAGGAAGATCAGTCGGCAGAAAAGACAACGGTCGCGCTTCGGGTCCAGTCCCAGATCCAACCA  
TAGC AAAAGATTGTATTAATTAACCTTAAAGCTAAATCATTATTTGAATCAGCAACTAAAGCATGATTA  
CTCAAATCCTTACCATAAACAATCACTCAATAAAGTTTTGAGAATGTCAGCAGAAACACGAGACGTGGGG  
GTGGAACGTTGCCAGCCAATGGCGCGACAATCAAATCAGTACCCAATAAATATTTCTTAATATCACCATG  
GAGTAGTGAGTATCTGGATTGCGAGATAGCAATACCATCATGTTTCATATATATCCAGTATGGCATCCAA  
TAACCAATAGAGAGTATTTTGATTTCAGTCTGCTTCATCAATCTTTTCATCGGGGGTAAGTATAAAGT  
GACTTTCCGCGCTGCGTGATGCAGTCTCTACATGGTCAATGAACTCAGAGCCCAACCTGCTCAGTCAAA  
TCCATGATGGTTATAATTAAGAATAAAAAGATTCTTCACTCACACCCCTTCTCTTAGTAAAAAAGAAGAA  
TTCATTCTTTTCATTCTTACCACCTTTTCAGTAAATGCAGTCGACTCAAAAATGTCTGATCTTTACGACCA  
CAGCAACTCCAGTCGCAGTATTACCATTCCAGCACCTAAGAATCGTAAAATGGCCCGTAACCATCCCAT  
TTAAGGGCATAATGGATCGTGGCCGCTCTGCACCTGGTTTCGCAATCCCATCGAAGTGTGAGCTAGTAT  
GGTACGAACGTTCCAACATCCACTAGGCTGCGCTGTAGGCCGTATGTCCACGCATGTGACTGGAGAGGTT  
GTCCATATTTCTCGCCAAGTCCCGCGCTTTTCTATCATTGACGGCGCCGACCTAGCATACTTAGTGGGA  
CAACGTCCACTCACCTTAGTCGCATCAAATGCGCAGACACTTGGGGAATCATCGCAGCATGACATCT  
CCCACCACCAAGACACCGGCACATGTCTTGGCGACCACATCAGCTCACTCACCCATTACACGCGAATCGG  
GCCTAGCAGCTCTCACTCCAACGACAGACTCATCATTTACAATGGATGCAGGAACCCCCATAAACGGTTT  
TTCAAGGATTTAGCCTCTGGTCCCGTCCCAAGATCTAGCACAACGTCTCCATCATATACCGCTGACGAC  
TCAGTCGTGAGGTGTGTGGGGGGACCCCTCACTCCAAGACGATCAGATAAGGGGTGCAATCGCGGCACT  
CTGAAGAATTCGCCCCGTTCTTTCCACGATTGGATGACGACTAAGATTTGGAATTCGACAGCCAAATAT  
CACCAAGAAGAAGTACACTCCAGATGTCCAAGTAAGTATGAGTGTGATGCACACCCGAAAGCCGACGAAG  
ATACTGACCGTTCGCTGTCTCAATGAGTGGGTGAAGTAAACGAGTCTGCAAGTCTCACCCCAACGATTC  
CATACTCTGTTAAACAGTTATTGAATACTGAGACTTTATCGGTGCGAGGGCGCCAATCCGTTGATGTTT  
GACGTGCAAGCGCTTTCTCGACGCTCATACTTGGCCGAGATGTTTCATGAACATTCAATTGATTTCTCC  
GGCTGAATTGGAGGGTACAGGTGAACTCCGACATTTTTATTGTAGATGATTACATACATATATGTCTTCC  
TACTTCGGTACGTGTTGAGGGGGTGGCTCAATTACGCACTCAAACAGTAAGTGGCTGCCATGACCGT  
ATGCAAAACAAACGAATCATCGCTCTTGGCAAAAGTCGGGATGACTTGGTTGCATCAGTCAGTGATGCTCA  
GACAAGCTCGAAACGTGGGCGAGAGAAGACGATCAATATAATCAGGCTCATCCCACTCCACAATGTCC  
ACCACCGATGGGGAGACATTAGTTCTTACGCTTAGTGTGGTCAGCTCCTACTCTCGATGGATTAGTCGT  
ATTGCATACACATTGTGTCAAGCCTCGGCTAATAGGCCTTGGGAATATGACGGTACATATGCTAGGATGA  
TCAATTTGATCCTGAGTTCAACGTTGACGGGGTGTGTTGTTGGGTTACAGCTGCCACTGATTGACAA  
GCAACAGGCACCAATCGTACTGACTCCCGCTGCTCTCACAATGTTCCAGATACTACTAAATTTGGGGAT  
TGAATGATGTGTACCAGAAGATCTGGATCGTGTACGCACTGAAGGAGGTTCCCTGGTGGAGTTGAATG  
TGAAGTTGGAGGGCGACGCTCGTCAAATCAATTTCTAGGACTTTTGACTCAAGATCAAATTTGGAGTG  
CTCATTATTCGAGAGCAACCACTCCGATTCTTGAAAGATGCCAGCTGTGTTTTCTGGGATGCTGACTGG  
CTCTTTTCGCTGCTGGGACTGAGTGGTCTGTATAGTGAACGACAACGTGAGAGGAGAAACCTCGAGA  
GACCAACTAGCAGCTTCGAGACCAACGGGAGTCAGAGTAGCGGGCAAGTACCAGGATGATGGCAAGT  
TAATATTCAGTCTCTGACCATTGGTGTGTAGAACAAAGTCCACGCCTCATCACGGACACCACGTGTCTT  
CTAGAGACTGAAGCCACACAGCGTAATGCTCGCAACCATATCTGTAGTACGTCACACACGAACAACCTT  
AACGAGGGTACTGAGTGAGATCGAACAGGCACCAGAGACTGGGACGTAGGGAGGCGCACGAGGTGGAT  
AACCATAGTATAGAACCCCGCAGCACTGAGCCGACGAATATGCATTGCCAAGGCGGATGACGTCGGGTG  
TGGACATGACTACGAGTAAGGGCTATTAGCTCACGACGATACGTGTGCTTGACCTGGGATGCTTCCACT  
TGGATTGACAGCGTCTGAGCCGGTACGGATAGACTGCCACTTGGTCAAGATCTGTATTGGATTATCATCT  
ACGGATTACAGAGGCTACATCCCTTCTAGAACCCGTCAGGTCTCGCTTATCTCTACTAACGATCACTCT  
CACTTTACCAGTCATATCGTCCGGCAGAGTGTACGAATGAATTAAGTGTGAGCTTCTCTGTATCAGCA

REPTILIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE03  
REPTILIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE04  
REPTILIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE05  
REPTILIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE06  
REPTILIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE07  
REPTILIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE08  
REPTILIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE09  
REPTILIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE10  
REPTILIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE11  
REPTILIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE12  
REPTILIAN\_ORTHOREOVIRUS\_PROBE13  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE01  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE02  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE03  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE04  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE05  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE06  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE07  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE08  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE09  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE10  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE11  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE12  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE13  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE14  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE15  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE16  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE17  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE18  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE19  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE20  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE21  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE22  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE23  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE24  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE25  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE26  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE27  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE28  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE29  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE30  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE31  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE32  
ROTAVIRUS\_A\_PROBE33

GTTATTCAGTGGAGTATTTGTCACGTTATATCTTGCATGGCACTTATGGTGGTAGAACTCCTCTCCTTCC  
CTGAGTCACCGCCGCTCTCAAAGCCGCTATCTGCTCCACTTGTTTTCGAACTTGCCTAACTATCTCTTCA  
CAATTTGGTCAGGAGAGCCGAGTGATGGGGGTGACACCGTGGTAGCTCCAGCCTGTTACACGCCCCCGCC  
CGAAATTGTGAAGGTAGGCCAGGCTTATTGCTGCGCTCAATGTTGCGGGGTACTACACTATGGAGCACCA  
ACTTTAATTCATTCGTACACTCTGCCGACGATATGACGGTGAAAGTGGTGAAGGCGATTACGATACTA  
TAGCGGAGATTTTGGATGGCGCAAAGATGTGGTCATCGGTCCTCTCACCACCTGAGACGCATATGGAAAA  
CCAGCTGGAGTGATGGTACAGCTGAGAGCGACAGTGGATGGCCCTCCCTCCCAAGTGTCTACATATGCG  
AGAAGAGAAAAGAAGGAGACAACACTGAGTTCCAAAAACGGTATCTACGGAATAGCTACAGTTGAGTG  
GGCGGCATTAGAGGTATCGTTAGTAGAGATAAGGCGAGACCTGACGGTCTAGATGGGGATGTAGCCTCT  
GCGTAGCACGGTAACGGATTTAGGATCCTTAGTGAGTGACAGAGAAAGTGAGGTTGGACGGTGTGGCGAGA  
TTGGTCTTAGAAAACGACTGAAATATTTGGACTCTCATGGGCGCAGTCTGGAGTTGAGATGGGAGCCACA  
ACGTTGATGATGCAGCTATCTCATCAGCTATTCTGATTTCTGACTAGATAAAGACATAAACGCTCTTTG  
TAATGGCTACAGACGTCATTTGTATAATTTAGTTAATAAATTCCTATCAGTCTCAAATCCTCGTAA  
TTCCGTTAGCCATATCATCCATAACATGCATGTTTTCTTTGTAGAAAAAATTGCTTCTTTCCAAATTT  
GTATTCTGATCAATGATTCTAGATCTTTTGAATTAATCTAATAATTGATAACATCCATAATTTATTGA  
TAACACCTGGAGTATATCTCCGTGAGCAATATCATCCATAACATGCATATTTTCTTAGTCGAGAATAT  
CGCACCTTCTGTTTTCTCATCTTGAATATGGCATCACAAACTTGCCGTTTCAGAATCGACAACCTTTG  
GGGTCTGAGGGTCACCATTCCTATAATGCATTCTTTGCATTCCGAATGCTGGATAAACAATGGTATTTAT  
TTCTGCTATTTGAAATGGTGTCTGTGGGTCTCCATTCTGTAATGCATCCGCTGCATTCCAAACGCTGGA  
TTTGAATCTGCTCAGCAATTTGAAAAGGAGTTTGAGGATCACCATTCTATAATGCATTCTTTGCAT  
ATAGACACGCCATCTGCATTTGTCTTAACTTCGATCTAATCGAGAAACTGGTGGATCGGATCGT  
TTTGAACCTGCAGATTGTGAGTTATATAAATGATAAATATTCTGACAAGATTAGATTATACTTCCCCAT  
CAGATTGTGAATTATAAACAATGATAAATATTCTGACAAGATTAGATTGACTTCCCCATTGTACAGCT  
GCCAATTGAAATGAAAGATAAATATTCTGACAAGATTAGATTATACTTCCCCATTGTATAGCTTTAATA  
CTGCAGATTGTGAATTATATAAACCATAAATATTCTGACAAGATTAGATTATACTTCCCCATTGTATA  
GAGATCTCAATGAAGTTATGTTCCACATTTTCTCCAAAGTTAATCATTTCAGATTTTGGATAGTTACA  
TGTTTGTGGACTTGGTATGACGGTTGCATTTCCAATTAGCATGCATAGTGATGTGACCGAAGTTAACTGT  
TAATGTTTGTGGACTTGGTATAACAGTCGCATTTCCAATAAGCATACATAATGATGTAACCTGACGTTAAT  
TTCTGCTATCTGGAACGGTGTCTGTGGATCCCCATTTCTATAGTGACATTGTTGCATTCCAAACGCTGGA  
AAAAGGAGTCTGGGGGTACCATTCCTGTAGTGACATTCTTTGCATTCCAAAGGCTGGATATATGATGGTA  
TTCTGCTATTTGAAACGGAGTCTGGGGATCACCATTCTATAATGCATTCTTTGCATTCCAAATGCTGGA  
TTGTCTTAACTGCATTGCATCTAATCGAAAACTGGTGAGTGGATCGTTTGAAGCAGAATCAGATGGTCC  
CTGGTGGAAATACTCCTGGCGTATATTTCCATTAGCCATATCATCCATTACATGCATATCTTTTTTGT  
CACGTTTTTCATTATTTAATAAATTTATACCAGCGCGGAAAAAATTTTGCCTCCTGCAATATATCTTTT  
CAGATTGCGAATTATAAACAAGATAAATATTCTGACAAGATTAGATTGACTTCCCCATTGTACAGCT  
CAGCTATTTCCGATTTCTGACTAGACAATGACATGAATGCTCTTTGTATATACACTTCATCATCAGTTGT  
TTTGAACCTGCAGATTGTGAATTATATAAATGATAGATATTCTGACAAGATTAGATTGACTTCCCCAT  
CGCTTGTCCGGTTTGTATATCTCCAATTTTTCAATATTGACTCTTTTGGTTCAAATGTTGGTATCGTC  
TTTGAAATGTATCCCATATAGATTCAAAATTCATGTAATTCAGCCTATCCTGTAGTAAAACCTGGTC  
TTTTGTGGTTGAAGTCGGTATCCAATCATAATTTGCAACTAAGTAGAAATCATTAGAATCAGAATTTATT  
AGTCTGTGGATCACCATTCTATAATGCATTCTTTGCATTCCGAATGCCGGATAAACAATGGTATTTATT  
CACTGCACCTTCTGTTTCTCATCTTGAATATAGCATCACATATACTTGCCGTTTCAGAATCGACAAC  
AGGTCGTGATTGCGTCGATGAATCCATAGACACGCCAGCGTCTGCATTTGCTTAACTGCATTCGATCTA  
ATCTACCATTATACATATCATCCATTACATGCATGTTCTTTTTCGTTGAAAAAATAGTTTTTCTCCAAA



ROTAVIRUS_A_PROBE34	AACGTAACGACGTAATGTTCCACATTTTCTCCATAACTTTATCATTCTGATTTTGGATAGTTACAGAA
ROTAVIRUS_A_PROBE35	TTCCATTAGCCATGTCATCCATCACATGCATATTTCTTTTAGTTGAAAAAATTGTTTTCTACCAAATTT
ROTAVIRUS_A_PROBE36	GTAGATTAATTCAGCTCTGAAAAATTTTTCTCCGGAATATATCTTTTAGCAATTTCTATGCCAC
ROTAVIRUS_A_PROBE37	TGTCAAAGTCTGAACATGTTGCATATTCATCGTTACACATGCAATTAGTGTTTCGTAGTTATAAGCTAGT
ROTAVIRUS_A_PROBE38	GGCACCAATTATAATTTACAAC TAGATAAAAAATCATTAGAATCAGAATTTATTTAAATAGAATCGGTT
ROTAVIRUS_A_PROBE39	ACTAGGTATAACAGTTGCATTTCCCAATGAGCATGCACAGCGATGTAAGTTAGCTGTAATTTTTCC
ROTAVIRUS_A_PROBE40	CATATGCATAGATGCTCTAAATCAAATTGTTGTGGTATTTGTTTATAAACTTTTGTGTAGACGTTGGA
ROTAVIRUS_A_PROBE41	CTTCGCTTGTCCGGTTTGATATCTCCAGTTTCTCAATATTGACTCTTTTGGTTCAAATGTTGGTATC
ROTAVIRUS_A_PROBE42	AACTGCATTGATCTAATCGAAAACTGGTGAGTGGATCGTTTGAAGCAGAATCAGATGGTCCAATATCC
ROTAVIRUS_B_PROBE01	TATGTCAATCATTTTCCGTTACACATTTGTATCAATCTTTAGTTACGTCCATCCCTTGAAATGCTCT
ROTAVIRUS_B_PROBE02	AAATGTCGGCCGATCAACGGTCCATGCAATTAATTCATTGAATACCAAATTACACAAGTTGTCAAAAAGTA
ROTAVIRUS_B_PROBE03	GTATCATTGCAGTGTGCGACGGCGGCTAAATTTGCGATTGATAAATCAGAAATGAGACTTTTTCAAACGTA
ROTAVIRUS_B_PROBE04	CTCTGACAGTTTCTTAGGACATCACTATTGTCGGTGTTCATATCTGATTTCTGTAACTTTTTGGAC
ROTAVIRUS_B_PROBE05	GTGCGTTGTAATCATTTAACACGCTTTTGCCAGCTGTGTTTAGATTCTGATTTGGAGCTAAACCAAGTAC
ROTAVIRUS_B_PROBE06	TTCAGAGTTGATTGTTTCAGCGGAGTATACCGATGCTGCATCATCAAACTCGAAGATTTACTTTGCTT
ROTAVIRUS_B_PROBE07	CACAGATGCAAGAGCAGATGTCGTGGCGTCTGCGACAGTAAAAGAAATCTCAGCCATACGATAAATTGCA
ROTAVIRUS_B_PROBE08	TTGTTGTGTTGTATGAGCAGTTAGTGTGGCGATTTTCCAATCATAATCGCGTATACGTCTGTGCGATGAT
ROTAVIRUS_C_PROBE01	TACTCATCAAACATTGAATCTTCCGAATATGGTGAATTCATCGTTTTAACATTCCATAGCATACGCCACA
ROTAVIRUS_C_PROBE02	CTATTAACAATGCAGTCATATGAATACGCATTTCTTTATCTGCTTCATTACCTTTCATATTCTTCAT
ROTAVIRUS_C_PROBE03	TCCCTCCTGCATCCTTGATCGCTTTATCTAAAGAAGATGAAGCAGCTGATCCAGCTACGTTAAAGATCCA
ROTAVIRUS_C_PROBE04	CATCCACTTCATAATACGATGGTCCATTTGCGGAACAGTTTCATCTTTCTCCTGGATAGCATGCGCGAC
ROTAVIRUS_C_PROBE05	CTTCAATATTAATTTTAAAGCTATTAGTGTCAATTAATTACATTTGTTAACCCGACATCTTCAACGTA
ROTAVIRUS_C_PROBE06	TTGAGAACCAGTTCATTGATTCTGTTTGGCCTTTTTTACATTGTCGAAATGGCATCAAGATTAATTCCA
ROTAVIRUS_C_PROBE07	ATCTTCTAGCTGAAACGTAATCAGCATGAGTTTTTGAATCCCATATTGATTCAAATCCATCATGTAATCC
ROTAVIRUS_C_PROBE08	GCATAATTGCATCTCCATCAACCCGATCATTTTAAACGTCAAATGTATAATCTGTCTATAAGTTTTCCGA
ROTAVIRUS_C_PROBE09	ATGAACGGGATGGCGTCCGTTACCAGCAGGAAGCGCAGGGATTTTCATAGACAAACTTCCGCTCTAATC
ROTAVIRUS_C_PROBE10	CTTTAATTTTAACTTTCTTCTTCAATCATTTTCACTGCATTTTGTTCATCATAATTACGTTTGATGA

\* probe showed non specific reactivity and was eliminated from analysis

### Anexo 3. Tablas de identidad en secuencias de virus

**Tabla 2.2** Identidad entre especies de la familia *Astroviridae*

Género	Especie (identidad intraespecie)	Similitud (%)			
	Chicken astrovirus				
Avastrovirus	Duck astrovirus	45			
	Turkey astrovirus	45	56		
	Human astrovirus (81%)	39	40	39	
Mamastrovirus	Mink Astrovirus	39	40	41	47
	Ovine Astrovirus	38	41	40	47 56

**Tabla 2.3** Identidad entre especies de la familia *Caliciviridae*

Género	Especie (identidad intraespecie)	Identidad (%)			
Lagovirus	European Brown Hare Syndrome Virus				
	Rabbit Hemorrhagic Disease Virus	71			
Norovirus	Norwalk Virus (70%)	35	35		
Sapovirus	Sapporo virus (62%)	40	41	41	
Vesivirus	Feline calicivirus	42	41	35	40
	Rabbit vesivirus	41	42	35	41 59

**Tabla 2.4** Identidad entre especies de la familia *Picornaviridae*

Género	Especie (identidad intraespecie)	Identidad (%)				
Enterovirus	Bovine enterovirus					
	Human entero virus A	59				
	Human enterovirus B (73%)	60	62			
	Human enterovirus C	57	59	62		
	Human enterovirus D	58	59	62	63	
	Porcine enterovirus A	48	49	49	48	49
	Porcine enterovirus B	64	60	60	60	49
	Simian enterovirus A	58	57	60	58	59 50 59

**Tabla 2.5** Identidad entre especies del género *Rotavirus*

Especie (identidad intraespecie)	Identidad (%)	
Rotavirus A (76%)		
Rotavirus B	40	
Rotavirus C	58	42