

Informe final publicable de proyecto

ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN GENÓMICA EN VIRUS CANINOS

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_155660

Fecha de cierre de proyecto: 01/04/2023

PANZERA CRESPO, Yanina (Responsable Técnico - Científico)

CONDON AGUSTONI, Emma María (Investigador)

FUQUES VILLALBA, Eddie (Investigador)

GRECCO PATIÑO, Sofía (Investigador)

MARANDINO PEREGALLI, Ana Eugenia (Investigador)

PÉREZ CROSSA, Ruben Gustavo (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente)

Resumen del proyecto

La caracterización genómica de un patógeno resulta fundamental para conocer su origen, sus rutas de migración, su variabilidad genética y el ajuste de los planes de control sanitarios. En el presente proyecto se desarrolló una metodología robusta, rápida y de bajo costo basada en multiplex-PCR acoplado a secuenciación masiva para la obtención de genomas completos del parvovirus canino (CPV) y el virus distemper canino (CDV). Estos virus son los principales patógenos en canes domésticos y constituyen una amenaza para la fauna silvestre.

Durante el proyecto obtuvimos 144 genomas completos de CPV de 7 países Latinoamericanos. El sistema fue eficaz para todas las variantes antigénicas conocidas (CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c), para la variante original (CPV-2), para panleukopenia felina y eficaz en huéspedes caninos y felinos. Los análisis filogenéticos/filodinámicos revelan la diversificación del linaje CPV-2a en 7 clados evolutivos. La población sudamericana de CPV presenta diferentes patrones de evolución. Uruguay, Argentina y Chile presentan una población más homogénea, mientras que Brasil, Ecuador y Perú presentaron mayor heterogeneidad. El análisis de co-infectantes/recombinantes reveló la detección de eventos esporádicos en Uruguay, Argentina y Ecuador.

En cuanto a CDV, su gran variabilidad significó un desafío en la puesta a punta, sin embargo, obtuvimos 16 genomas casi completos (coberturas genómicas entre 92-100%) de 4 países Latinoamericanos. Los cuatro linajes circulantes en Sudamérica (EU1/SA1, SA2, SA3, NA4/SA4) surgen de eventos migratorios independientes de Norteamérica y Europa. Las cepas norteamericanas colonizaron el norte de Sudamérica vía Ecuador, Colombia y Perú (SA3 y NA4/SA4). La entrada y expansión en el sur de Sudamérica (Argentina, Brasil, Chile y Uruguay) ocurrió por tres migraciones independientes originando los linajes EU1/SA1 y SA2.

El método desarrollado nos permitirá llevar adelante un sistema de vigilancia genómica en tiempo real que será transferida a otros laboratorios contribuyendo significativamente al análisis evolutivo de ambos virus.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Virología / Ciencias Veterinarias

Palabras clave: Distemper canino / Parvovirus canino / secuenciación de alto rendimiento /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Los principales patógenos en canes domésticos y de gran relevancia para la fauna silvestre son el parvovirus canino (CPV-2) y el virus distemper canino (CDV).

El Parvovirus canino pertenece a la especie Carnivore protoparvovirus 1 (género Protoparvovirus, subfamilia Parvovirinae, familia Parvoviridae). Los protoparvovirus de carnívoros se encuentran estrechamente relacionados e infectan a varios huéspedes carnívoros, incluidos el parvovirus del mapache, el virus de la enteritis del visón y el virus de la panleucopenia felina (Cotmore et al. 2014).

CPV-2 es un virus emergente que produce la Parvovirusosis canina; enfermedad altamente contagiosa asociada con gastroenteritis hemorrágica y miocarditis aguda (Desario et al., 2005). A pesar de los extensos programas de vacunación, CPV-2 sigue siendo uno de los principales patógenos en perros y otros carnívoros de la familia Canidae (Hoelzer and Parrish, 2010). CPV-2 tiene un genoma de DNA monohebra (5,2 kb), polaridad negativa que codifica para dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) y dos estructurales (VP1 y VP2) que conforman la cápside (Reed and Miller, 1988; Berns, 1990). A pesar de ser un virus DNA y replicar usando la maquinaria celular del huésped, presenta altas tasas de mutación y sustitución nucleotídica, similares a virus RNA (Shackelton et al., 2005).

CPV-2 emergió en Europa en 1978 (Appel et al., 1979), y se expandió mundialmente generando una pandemia. Luego fue reemplazado por un nuevo linaje genético (linaje 2a) del cual originan el resto de las variantes circulantes. Se reconocen tres variantes antigénicas denominadas 2a, 2b y 2c, clasificadas en base al aminoácido 426 de la proteína VP2: Asn (2a), Asp (2b) y Glu (2c) (Truyen et al., 1996; Parrish et al., 1991; Martella et al., 2006b). Actualmente las tres variantes circulan mundialmente con distinta prevalencia y nivel de variabilidad genética. Uruguay presenta una dinámica particular marcada por poblaciones homogéneas (2007-2009 variante 2c), invasión de una nueva variante (2010 detectamos una variante 2a que coexistió con 2c por un corto período) y reemplazo (2013-2023 variante 2a) (Pérez et al., 2007; Pérez et al., 2012; Maya et al. 2013).

En Argentina, Brasil y recientemente en Perú se detectó la circulación de las tres variantes (Calderón et al., 2011; Pinto et al., 2012; Fontana et al., 2013; Espinosa et al. 2022). En Ecuador, la variante 2c coexiste con otras variantes muy diversas filogenéticamente (Aldaz et al., 2013). En Chile análisis basados en VP2 revelan una mayor prevalencia de CPV-2c en comparación con CPV-2b (Véliz-Ahumada et al. 2021) y se ha detectado la circulación de CPV-2c en felinos silvestres (Sacristán et al. 2021). En México recientemente se identificaron variantes del tipo 2c de diferente origen (Faz et al., 2019).

El virus distemper canino, actualmente, canine morbillivirus (Paramyxoviridae-Morbillivirus) tiene una distribución mundial y presenta un amplio rango de huésped (Ludlow et al., 2014; Martínez-Gutiérrez and Ruiz-Saenz, 2016). CDV causa una enfermedad sistémica conocida como moquillo o joven edad (Carré, 1905; Appel and Summers, 1999). En cánidos, la enfermedad se controla mediante vacunas (virus atenuados y recombinantes), sin embargo, brotes de la misma continúan siendo reportados, así como una expansión en el rango de huésped (Martella et al., 2010; Origgi et al., 2013; Riley and Wilkes, 2015; Sarute et al., 2011). El reciente reporte de diferencias antigénicas entre vacunas y cepas de campo, pueden indicar una baja protección de las vacunas (Anis et al. 2018).

CDV presenta un genoma de RNA (15.7 kb) no segmentado, cadena simple y polaridad negativa que codifica para seis proteínas estructurales y dos no estructurales (3'-N-P/V/C-M-F-H-L-5') (Lamb and Parks, 2007). La glicoproteína hemaglutinina (H) implicada en el reconocimiento del receptor celular presenta la mayor variabilidad genética y su análisis reveló la existencia de más de 20 linajes circulantes en el mundo. Los estudios filodinámicos revelan que las variantes actuales se han originado en Norte América y divergido en dos linajes, uno con escasa capacidad de dispersión y otro que dio origen al resto de los linajes de distribución mundial (Fischer et al., 2016; Ke et al., 2015; Panzera et al., 2015). Hasta la fecha se han identificado cuatro linajes en Sudamérica: Europa1/Sudamérica 1(EU1/SA1) distribuido en Europa, Argentina, Brasil y Uruguay, Sudamérica 2 y 3 (SA2 y SA3) exclusivos de Argentina y Colombia, respectivamente y Norteamérica 4/Sudamérica 4 (NA4/SA4) con variantes de Colombia, Ecuador y Norteamérica, (Martella et al., 2006a, Panzera et al., 2012; Espinal et al., 2014; Duque-Valencia et al. 2019).

A pesar de los antecedentes expuestos para ambos virus, existen muchas interrogantes a nivel nacional y mundial. La mayoría de los estudios se basan en el análisis de secuencias parciales, permitiéndonos conocer solo parcialmente los mecanismos que rigen la evolución de estos virus. Para comprender los diferentes mecanismos de generación de variabilidad (mutación, recombinación y cuasiespecies), y ampliar los estudios filodinámicos es necesario estudiar la evolución genómica, analizando los genomas en su totalidad. A la fecha existen un poco más de 500 y 200 genomas completos de CPV y CDV, respectivamente, publicados en las bases de datos.

Las metodologías basadas en secuenciación masiva han revolucionado nuestro conocimiento acerca de la evolución genómica de los patógenos de interés en la salud animal y humana. Estos abordajes nos permiten un relevamiento en tiempo real y una rápida respuesta, como quedo en evidencia con SARS-CoV-2.

En el presente proyecto nos propusimos analizar la evolución genómica de los principales patógenos virales en canes (CPV y CDV) mediante la obtención de genomas completos por secuenciación de alto rendimiento.

Metodología/Diseño del estudio

Selección de muestras

El grupo de Genética de Microorganismos cuenta con un biobanco Latinoamericano de muestras caninas y felinas desde el año 2006 e ingresan anualmente más de 20 muestras con diagnóstico clínico de parvovirus y distemper.

Muestras materia fecal (estudios de CPV)

Se seleccionaron muestras lo más heterocrónicas posibles (período 2006-2023), provenientes de Uruguay y muestras de 6 países Latinoamericanos (Argentina, Brasil, Chile, Ecuador, Perú y México).

Muestras orina y secreción ocular (estudios de CDV)

Se seleccionaron muestras lo más heterocrónicas posibles (período 2005-2023) provenientes de 4 países Latinoamericanos (Argentina, Perú, México y Uruguay).

Muestras vacunales

Se emplearon muestras vacunales correspondientes a la vacuna Nobivac Puppy DP (CPV) y Vanguard Plus 5 CV (CPV y CDV). La primera contiene la cepa de parvovirus tipo 2 C154, y la segunda la NL-35-D y de distemper canino N-CDV.

Extracción de ácidos nucleicos

Todas las extracciones se realizaron de manera automatizada de modo de estandarizar el procedimiento, Para ellos se utilizó un equipo de automatización de preparación de muestras Qiacube (Qiagen) con DSP Virus Spin Kit (Qiagen) siguiendo el protocolo especificado por el fabricante.

Diagnóstico mediante qPCR

Todos los ácidos nucleicos fueron sometidos a los protocolos de diagnóstico mediante qPCR. Todas las reacciones de qPCR se corrieron con un blanco de PCR, un control negativo, un control interno del huésped (sonda específica para el gen ribosomal RNA 18s tanto canino como felino) y fueron realizadas por duplicado.

En el caso de CPV se utilizó una sonda que reconoce una región conservada del gen VP2 y el caso de CDV una sonda que reconoce una región conservada del gen N.

Diseño de cebadores quiméricos

Se generó un conjunto de datos para ambos virus con secuencias genómicas publicadas en las bases de datos. El conjunto de datos con secuencias de todo el mundo constó de 375 y 196 secuencias para CPV y CDV, respectivamente.

Una primera aproximación consistió en aplicar la herramienta Primal Scheme (Quick et al. 2017) utilizando los conjuntos de datos y fijando un tamaño de amplicones de 250-300 pb. El programa nos devolvió un set de cebadores capaces de amplificar fragmentos superpuestos de 250 pb de longitud que cubren el genoma completo de CPV (5320 nt) y CDV (15690 nt). Una segunda aproximación consistió en la anotación del set primero de cebadores y el rediseño de los mismos teniendo en cuenta posiciones variables en ambas poblaciones virales. Posteriormente a cada cebador se le añadió el adaptador Illumina en el extremo 5' para permitir la adición de los índices en una segunda ronda de PCR. Esto permite independizarnos del kit de construcción de librerías y disminuir los costos y tiempo de la secuenciación.

Reacción PCR-multiplex-NGS

Las librerías de Illumina se prepararon mediante dos rondas de PCR. La primera reacción de PCR consiste en realizar la multiplex-PCR combinando los cebadores en dos pools de modo de generar los amplicones de ~250 pb que llevan consigo en los extremos el primer juego de adaptadores de Illumina. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µL, con 12,5 µL de 2x Immomix (Bioline), 1,75 µL del juego de cebadores CPV (concentración final de cada cebador de 0,02 µM) y un volumen de extracción de ácido nucleico viral de 2 µL. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Arktik Thermal Cycler (Thermo Scientific). La amplificación se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñida con bromuro de etidio, usando un transiluminador MultiDoc-It Imagins System (UVP).

Los productos de PCR de pool_1 y pool_2 de cada muestra se combinaron y purificaron mediante una concentración 1,8X de AmpureXP (Beckman Coulter). Los 100 ng del producto de PCR purificado se utilizan como plantilla en una segunda ronda de PCR para agregar los índices para multiplexar las muestras (librerías específicas de muestra). Las condiciones de la PCR siguieron el protocolo de Illumina del kit de librerías con 6 ciclos. De este modo las librerías quedan listas para ser purificadas por beads.

Secuenciación de Illumina

Las librerías fueron pooleadas a las concentraciones que recomienda los fabricantes y se secuenciaron durante 151 ciclos en ambos extremos emparejados (2X150). La secuenciación se realizó en la Plataforma Genómica de FCien utilizando un Mid Output Kit (300 cycles) en un equipo MiniSeq.

Eficiencia de los cebadores

Con el fin de probar la eficiencia de los cebadores, el flujo completo de trabajo se realizó varias veces y se fueron ajustando aquellos pares de cebadores que no eran eficientes. En ambos casos se realizaron 4 flujos completos generando nuevos sets de cebadores.

Análisis bioinformáticos

Mapeo de referencia

En primer lugar, utilizamos BBDuk para eliminar el adaptador de Illumina, el conjunto de cebadores y las lecturas de baja calidad (puntuaciones de calidad de Phred <30). A continuación, las lecturas resultantes se asignaron al genoma CPV o CDV de referencia utilizando Minimap mediante la realización de un flujo de trabajo diseñado y con el software Geneious Prime 2020.1.2 (<https://www.geneious.com>). La secuencia consenso se obtuvo por mayoría y cada uno de los genomas fue anotado usando la cepa de referencia.

CPV clasificación antigénica

En base a las anotaciones y la posición en el aa 426 de VP2 se realizó la clasificación antigénica de CPV (CPV-2a, 2b y 2c).

Análisis de recombinantes

El SplitsTree4 (Huson and Bryant, 2006) se utilizó para inferir una red de recombinación a partir de genomas codificantes

completos de cepas de CPV y CDV. Se obtuvo un valor de prueba Phi de $p < 0,05$ considerado la evidencia estadística de recombinación en el conjunto de datos.

La identificación de posibles secuencias recombinantes y parentales y la localización de posibles puntos de ruptura fueron realizados utilizando el programa RDP4, que implementa siete algoritmos distintos para la caracterización de secuencias recombinantes (Martin et al., 2010).

Análisis filogenéticos y filodinámicos

Se generaron dataset con las bases de datos para ambos virus y se le adicionaron las secuencias obtenidas en el proyecto. El dataset resultante fue alineado con MAFFT (Kato and Standley, 2013). Las secuencias que mostraron señales de recombinación fueron eliminadas del dataset. Los árboles de máxima probabilidad se infirieron en Geneious usando FastTree (Price et al., 2009) con un Bootstrap de 1000 réplicas y fueron visualizados con el paquete ggTree en R.

En el caso de CDV, debido al bajo número de genomas completos en la base de datos, se generó además un dataset con el gen de la hemaglutinina, que es la región más usada para la identificación de los linajes de CDV.

Los análisis filodinámicos se infirieron utilizando la cadena bayesiana de Markov Monte Carlo (BMCMC) usando el paquete BEAST 1.10.0 (Drummond and Rambaut, 2007) a través de Cipres Science Gateway (<https://www.phylo.org>). Previamente se evaluó la señal temporal utilizando el software TempEst. Los árboles de máxima credibilidad (MCC) se generaron con TreeAnnotator y se visualizó usando Software FigTree 1.4.3 (<https://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Resultados, análisis y discusión

En el presente proyecto desarrollamos una metodología de enriquecimiento viral basada en un sistema de multiplex-PCR acoplado a secuenciación masiva para analizar la evolución genómica de los principales patógenos virales en canes (CPV-2 y CDV). Para cada uno de los virus se generó un panel de cebadores quiméricos (adaptador Illumina en el extremo 5' y secuencias específicas del virus en el extremo 3') capaces de amplificar el genoma viral completo mediante amplicones solapantes (Figura 1). La metodología desarrollada implica la generación de librerías Illumina mediante dos rondas de PCR para su posterior secuenciación en el MiniSeq de la Plataforma Genómica de FCien-UdeLaR y análisis informáticos (Figura 2).

Parvovirus canino

Un total de 238 muestras colectadas entre los años 2006-2023 fueron analizadas por qPCR, detectando la presencia del genoma viral en 203 muestras y obteniendo el genoma completo en 144 muestras (Figura 3A y Tabla 1)*.

El diseño del panel de cebadores multiplex-PCR debió de ser ajustado mediante la corrección y/o adición de cebadores. Para ello fue preciso realizar el flujo completo de trabajo (Figura 2). Finalmente, el panel de cebadores multiplex-PCR quedó integrado por dos pools de 35 cebadores quiméricos capaces de amplificar el genoma completo de CPV-2 (Figura 1).

La metodología desarrollada mostró ser altamente robusta capaz de amplificar el genoma completo de todas las variantes de CPV-2, de huéspedes caninos y felinos e incluso fue eficaz en una especie estrechamente relacionada, Panleucopenia felina (FPV). Fue posible obtener el genoma completo de las tres variantes antigénicas (CPV-2a, 2b y 2c), así como variantes genéticas pertenecientes a casi todos los clados evolutivos identificados hasta la fecha (Grecco et al. 2018). Además, fue capaz de amplificar la variante original, CPV-2 contenida únicamente en las vacunas.

El análisis mediante mapeo de referencia mostró una elevada profundidad de cobertura promedio (veces que se lee una misma posición nucleotídica) superiores a un 2000X y 100% de cobertura genómica (Figura 4). En todos los casos se observa una disminución en el número de lecturas en la región del poliA, debido a la baja en la calidad de lectura cuando la región a secuenciar es un homopolímero. Tras el ensamblado de los genomas completos, se obtuvo una secuencia consenso por mayoría que fue anotada, identificando los repetidos de ambos extremos y las regiones codificantes (Tabla 1 y Figura 4). Los genomas se alinearon y se sometieron a diferentes análisis.

Se determinó la variante antigénica en función del aa 426 (Truyen et al., 1996; Parrish et al., 1991; Martella et al., 2006b). Se caracterizaron 55 genomas provenientes de cepas circulantes en Uruguay (variantes antigénicas CPV-2a y CPV-2c), confirmando la existencia de una población homogénea del tipo 2a (Grecco et al. 2018) que se extendiendo hasta el año 2023. Se caracterizaron 26 variantes argentinas (CPV-2c, CPV-2b y FPV), 11 brasileros (CPV-2c y CPV-2b), 6 ecuatorianos (CPV-2c), 27 peruanos (CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c) y 8 mexicanos (CPV-2c). Además, se obtuvieron dos genomas de cepas vacunales correspondientes a las cepas NL-35-D y C154 (CPV-2) (Tabla 1).

Hasta donde tenemos conocimiento no hay registro de genomas completos de FPV en Argentina, solo existen registros serológicos en felinos domésticos y silvestres (Uhart et al. 2012).

En Ecuador, la población de CPV-2 se caracteriza por una gran diversidad genética con las tres variantes circulantes con mayor prevalencia de 2c (Aldaz et al. 2013; De la Torre et al. 2018). Por tanto, no resulta sorprendente la detección de solo variantes del tipo 2c durante 2011-2012.

En Perú cuando comenzamos el proyecto no existían registro de la caracterización de las variantes circulantes de CPV. Recientemente se determinó la circulación de las tres variantes antigénicas (Quino Quispe et al. 2018; Espinosa et al. 2022).

Para el resto de los análisis (co-infectantes/recombinantes y filogenéticos/filodinámicos) nos basamos en la región codificante (4274 pb) de modo de poder incluir el mayor número de cepas submitidas a la base de datos. Se generó un dataset con los nuevos genomas y secuencias de la base de datos. Se analizó la posible existencia de co-infectantes y recombinantes mediante la búsqueda de marcadores nucleotídicos y aminoacídicos en las Ns y las VPs y el análisis de la frecuencia de cada uno de ellos. Detectamos la existencia de una cepa recombinante uruguaya y otra argentina y lo confirmamos con redes filogenéticas (Figura 5). En ambos casos, la recombinación fue entre cepas 2c (ns) y 2a (vp). La cepa recombinante de Uruguay fue 100 % idéntica a un recombinante informado previamente (Pérez et al. 2014). Dos cepas más provenientes de Ecuador resultaron recombinantes (Tabla 1 y 2). Una de ellas (CPV-2b) es producto de una recombinante entre cepas 2c europeas (ns/vp1) y 2b de Ecuador (vp1-vp2). Otra es una variante 2a por el cambio en el aa 426 de VP2 pero tiene algunos marcadores de cepa 2c europeas, con dos posibles breackpoints. También hemos detectado dos casos de co-infectantes (CPV-2c-2a) en Uruguay (Tabla 1 y 3).

En los análisis filogenéticos se distingue el grupo de secuencias FPV-like, el cual incluye otros protoparvovirus de carnívoros como FPV y MEV, y se separa ancestralmente de las secuencias de parvovirus canino y engloba los FPV obtenidos en el proyecto. Basales en el árbol, podemos encontrar secuencias pertenecientes al linaje CPV-2, el cual engloba a las secuencias vacunales obtenidas. De este, se origina el actual linaje CPV-2a, que dio origen al resto de las tres variantes. Dentro del linaje CPV-2a pueden distinguirse 7 grupos/clados con elevado soporte de bootstrap, en 6 de los cuales se encuentran secuencias obtenidas en este trabajo (Figura 6). Tres de estos grupos pueden homologarse a los descritos por Grecco et al. (2018). Asia I o clado 3 compuesto mayoritariamente por variantes del tipo 2a engloba secuencias asiáticas, de Italia y de Uruguay. Todas las secuencias uruguayas CPV-2a obtenidas en este trabajo agrupan en este clado en concordancia con lo reportado para nuestro país, población homogénea del tipo 2a que fue detectada en el 2010 y circula hasta la fecha (Pereza et al., 2012; Maya et al., 2013). Europa I o clado 7 compuesto por variante del tipo 2c, e incluye secuencias europeas asiáticas, sudamericanas (Argentina, Brasil, Chile, Ecuador, Paraguay, Perú y Uruguay), norteamericanas (Estados Unidos, México) y de Oceanía (Australia). Sudamérica I o clado 4 es exclusivamente sudamericano, agrupando cepas de Argentina, Brasil y Uruguay del tipo CPV-2a y 2b. La secuencia uruguaya incluida fue colectada en el año 2006, por lo cual se presume que este clado circulaba en Uruguay antes de la invasión de la variante 2c reportada en el año 2007 (Pérez et al., 2007). Una de las secuencias brasileras CPV-2b obtenidas en este trabajo circulante en 2013 se incluye en este grupo.

El clado 1 comprende exclusivamente secuencias de Brasil de tipo CPV-2b, 7 de las cuales fueron obtenidas en este trabajo y agrupa con secuencias recientemente reportadas por de Oliveira et al. (2022).

El clado 2 incluye mayormente secuencias provenientes de países asiáticos. Este clado agrupa exclusivamente la variante antigénica CPV-2c y no incluye ninguna secuencia obtenida en este trabajo. Coincide en secuencias con el clado asiático exclusivamente 2c descrito por Liu et al. (2021) que surgió en 2011-2013.

El clado 5 incluye secuencias de Estados Unidos y México (obtenidas en este trabajo) exclusivamente pertenecientes a la variante antigénica CPV-2c. Este grupo comparte secuencias con un clado observado por Alfonso-Morales et al. (2022) a partir de secuencias parciales de CPV, que incluye cepas norteamericanas y de Cuba.

El clado 6 está compuesto por secuencias de Perú y Ecuador pertenecientes a las 3 variantes antigénicas actualmente circulantes, y es similar a un clado reportado recientemente por Espinoza et al. (2022).

Virus distemper canino

Un total de 125 muestras colectadas entre los años 2005 y 2023 fueron sometidas a la prueba diagnóstica por qPCR, detectando la presencia del genoma viral en 74 muestras (Tabla 1 y Figura 3B).

Para CDV la obtención de genomas completos presentó mayores desafíos, tanto en el diseño del panel de cebadores multiplex-PCR (Figura 1B) como en los análisis de mapeo por referencia. Su genoma viral es extremadamente variable debido a su genoma de ARN, y es de un largo aproximadamente 3 veces mayor que CPV. Hemos ajustado el diseño de los cebadores varias veces realizando el flujo completo de trabajo (Figura 2) pero en algunos casos no hemos alcanzado la cobertura genómica de 100%. Actualmente el panel de cebadores está integrado por dos pools con 120 cebadores quiméricos cada uno. Se obtuvo el genoma en 16 muestras con coberturas genómicas muy elevadas que van desde el 92 hasta el 100% (Tabla 1 y Figura 7).

La metodología desarrollada fue eficaz en la amplificación de genomas de variantes circulantes de diferentes linajes, Argentina (Sudamérica_2), México (norteamericano), Perú (Norteamérica_4/Sudamérica_4) y Uruguay (Europa_1/Sudamérica_1). Además, fue capaz de amplificar la variante contenida en la vacuna.

El análisis mediante mapeo de referencia mostró una profundidad de cobertura promedio (veces que se lee una misma posición nucleotídica) entre 500X-3000X, suficiente para ensamblar los genomas con robustez (Figura 7). Sin embargo, la misma no fue homogénea a lo largo de todo el genoma. Esto podría ser debido a diferencias en la eficiencia de los cebadores y/o dependiente

de la carga viral, que estamos optimizando. La cepa vacunal que tiene una elevada carga viral, mostró una mayor homogeneidad en la cobertura.

Cada una de las secuencias consensos obtenidas fueron anotadas identificando los UTRs y las regiones codificantes. Los datos obtenidos significan un gran avance para el estudio de este modelo viral. A la fecha para Latinoamérica publicado en la base de datos solo hay un genoma uruguayo (Sarute et al. 2014), uno argentino (Romanutti et al. 2020), dos colombianos (Duque-Valencia et al. 2020) y uno brasilero (Unpublished). Debido a la escasa información genómica de este virus (a nivel de Sudamérica y mundialmente), los estudios evolutivos se han realizados con regiones parciales principalmente el gen de la hemaglutinina (H).. Previo al desarrollo de esta metodología de multiplex-PCR, en el marco del proyecto obtuvimos secuencias de H de Ecuador y Perú (por primera vez) y nuevas de Uruguay con la vieja metodología y realizamos estudios filodinámicos (Fuques et al. 2022). Los cuatro linajes que circulan en América del Sur (EU1/SA1, SA2, SA3, NA4/SA4) surgieron de eventos migratorios independientes de América del Norte y Europa. Las cepas de América del Norte colonizaron la mayoría de los países del norte de América del Sur a través de Ecuador y luego Colombia y Perú, originando los linajes SA3 y NA4/SA4 durante su propagación. La entrada y expansión en la parte sur de América del Sur (Argentina, Brasil, Chile y Uruguay) se dio a través de tres eventos migratorios independientes y dieron origen a los linajes EU1/SA1 y SA2. Los linajes sudamericanos tienen combinaciones específicas de aminoácidos bajo selección positiva que constituyen firmas de relevancia taxonómica y evolutiva.

Generamos un nuevo set de datos, ahora con datos genómicos que consta de 207 secuencias y una secuencia de phocine morbillivirus como grupo externo. El análisis filogenético preliminar revela relaciones evolutivas similares a las identificadas con el genoma parcial (Fuques et al. 2022) (Figura 8). La variante de Argentina se agrupa con el linaje SA2, las de Perú con NA4/SA4. Las de México con un linaje norteamericano reportado por Weckworth et al. 2020, que agrupa de variantes de CDV de canes y felinos grandes. La mayoría de las variantes de Uruguay se agrupan con el linaje ya conocido EU1/SA1, excepto una variante que se agrupa con la cepa vacunal. Continuamos analizando los datos de CDV para la realización de análisis filodinámicos con datos genómicos y el análisis de la muestra uruguaya que cae fuera del linaje EU1/SA1.

*Las tablas y figuras se encuentran en documentos adjuntos

Conclusiones y recomendaciones

El presente proyecto nos permitió desarrollar una metodología de enriquecimiento viral basada en multiplex-PCR acoplada a NGS para la obtención de genomas completos de los principales agentes virales en canes, el parvovirus canino y el virus distemper canino.

La metodología desarrollada es robusta, rápida y económica y permite obtener mediante dos rondas de PCR 240 genomas de CPV o 80 de CDV en una única corrida de secuenciación (output-16 millones de reads). Permitirá llevar adelante un sistema de vigilancia genómica en tiempo real que puede ser transferida a otros laboratorios contribuyendo significativamente al análisis evolutivo de ambos virus.

Con esta metodología obtuvimos 144 genomas de CPV, casi un 30% de la cantidad total de genomas submitidos. Para CDV obtuvimos 16 genomas que corresponden al 8% de los submitidos hasta la fecha. Es de destacar, además, que en muchos casos es la primera caracterización genómica de variantes circulantes de varios países Latinoamericanos.

Los datos obtenidos nos están ayudando a comprender las fuerzas evolutivas que rigen la evolución de ambos virus, los posibles centros de origen y rutas de dispersión. Estos datos son fundamentales para el desarrollo de un correcto control epidemiológico de ambos virus.

Referencias bibliográficas

- Aldaz et al.2013. "High Local Genetic Diversity of Canine Parvovirus from Ecuador." *Veterinary Microbiology* 166(1-2):214–19.
- Alfonso-Morales et al. 2022. Primer reporte de parvovirus canino subtipo 2c (CPV-2c) en Cuba. *Revista de Salud Animal*, 44, e11. Epub 01 de noviembre de 2022.
- Anis et al.2018. Antigenic analysis of genetic variants of Canine distemper virus. *Vet Microbiol.*219:154-160.
- Appel et al.1979. Isolation and immunisation studies of a canine parvo- like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* 105,156-159.
- Appel MJG and Summers BA.1999. Recent Advances in Canine Infectious Disease. International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
- Berns KI. 1990. Parvovirus replication. *Microbiol Rev.* 1990 Sep;54(3):316-29.
- Calderón et al.2011. Evolution of Canine Parvovirus in Argentina between Years 2003 and 2010: CPV2c Has Become the Predominant Variant Affecting the Domestic Dog Population. *Virus Research* 157(1):106–10.
- Carré.1905. Sur la maladie des jeunes chiens. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 140(689–690),1489–1491.
- Cotmore et al. 2014. The family Parvoviridae. *Arch Virol.* 159(5):1239-47.
- De la Torre et al. 2018. Molecular characterization of canine parvovirus variants (CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c) based on the VP2 gene in affected domestic dogs in Ecuador. *Vet World*;11(4):480-487.
- Desario et al.2005. Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *Viral Methods.* 126(1-2):179-85.
- Drummond and Rambaut, 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7:214.
- Duque-Valencia et al. 2019. Phylogenetic evidence of the intercontinental circulation of a canine distemper virus lineage in the Americas. *Sci Rep.*9(1):15747.
- Espinal et al. 2014. Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. *Vet Microbiol.* 6;172(1-2):168-76.
- Espinosa et al. 2022. Carnivore protoparvovirus 1 in Peruvian dogs: Temporal/geographical and evolutionary dynamics of virus. *Infect Genet Evol* 99:105255.
- Faz et al.2019. Origin and genetic diversity of canine parvovirus 2c circulating in Mexico. *Arch Virol.* 164(2):371-379.
- Fischer et al.2016. Phylogenetic analysis of canine distemper virus in South America clade 1 reveals unique molecular signatures of the local epidemic. *Infection Genetics and Evolution*, 41:135-41.
- Fontana et al.2013. A Phylogenetic Study of Canine Parvovirus Type 2c in Midwestern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(2). Colégio Brasileiro de Patologia Animal:214–18.
- Fuques et al. 2022. Origin and spreading of canine morbillivirus in South America. *Virus Res* 319:198858.
- Grecco et al.2018. Inter- and intracontinental migrations and local differentiation have shaped the contemporary epidemiological landscape of canine parvovirus in South America. *Virus Evol.* 9;4(1):vey011.
- Hoelzer and Parrish 2010. The Emergence of Parvoviruses of Carnivores. *Veterinary Research* 41(6):39.
- Huson and Bryant. 2006 Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, *Mol Biol Evol* 23(2):254–267.
- Katoh and Standley. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013 Apr;30(4):772-80.
- Ke et al. 2015. Phylodynamic analysis of the canine distemper virus hemagglutinin gene. *BMC Veterinary Research*, 11(1);164.
- Lamb and Parks.2007. *Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication en Fields Virology.* Lippincott Williams & Wilkins, 5thEd.
- Liu et al. 2021. Phylogenetic Characteristics of Canine Parvovirus Type 2c Variant Endemic in Shanghai, China. *Viruses*, 13(11), 2257.
- Ludlow et al.2014. Using the ferret model to study morbillivirus entry, spread, transmission and cross-species infection. *Current opinion in virology* 4:15-23.
- Martella et al.2006a. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus strains detected in Italy. *Vet. Microbiol.*116,301-309.
- Martella et al.2006b. Evolution of CPV-2 and Implication for Antigenic/genetic Characterization. *Virus Genes* 33(1):11–13.
- Martella et al.2010. Canine Distemper Epizootic among Red Foxes, Italy. *Emerging infectious disease es*, 16(12).
- Martin et al. 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26: 2462–2463
- Martínez-Gutiérrez and Ruiz-Saenz.2016. Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. *BMC Veterinary Research*,12(1):78.

- Maya et al.2013. Phylodynamics Analysis of Canine Parvovirus in Uruguay: Evidence of Two Successive Invasions by Different Variants. *Archives of Virology* 158(6):1133–41.
- de Oliveira et al. 2022. New variants of canine parvovirus in dogs in southern Brazil. *Arch Virol.* 164-5: 1361-1369.
- Origgi et al.2013. Fatal combined infection with canine distemper virus and orthopoxvirus in a group of Asian marmots (*Marmota caudata*). *Veterinary Pathology* 50(5):914-20.
- Panzera et al.2012. Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus Res.*163,401-412.
- Panzera et al.2015. Molecular phylogeography of canine distemper virus: Geographic origin and global spreading. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 92:147–154.
- Parrish et al.1991. Rapid Antigenic-Type Replacement and DNA Sequence Evolution of Canine Parvovirus. *Journal of Virology* 65(12):6544–52.
- Pérez et al.2007. First Detection of Canine Parvovirus Type 2c in South America. *Veterinary Microbiology* 124(1-2):147–52.
- Pérez et al.2012. "Recent Spreading of a Divergent Canine Parvovirus Type 2a Strain in a CPV-2c Homogenous Population." *Veterinary Microbiology* 155(2-4):214–19.
- Pérez et al.2014. Phylogenetic and Genome-Wide Deep-Sequencing Analyses of Canine Parvovirus Reveal Co-Infection with Field Variants and Emergence of a Recent Recombinant Strain. *PLoS ONE* 9(11):e111779.
- Pinto et al.2012. Typing of Canine Parvovirus Strains Circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Research* 165(1):29–33.
- Quick et al. 2017. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc* 12(6):1261-1276.
- Quino Quispe et al. 2018. Canine parvovirus types 2a and 2c detection from dogs with suspected parvoviral enteritis in Peru. *Virusdisease* 29(1):109-112.
- Reed and Miller.1988. Nucleotide Sequence and Genome Organization of Canine Parvovirus. *Journal of Virology* 62(1):266–76.
- Riley and Wilkes.2015. Sequencing of emerging canine distemper virus strain reveals new distinct genetic lineage in the United States associated with disease in wildlife and domestic canine populations. *Viol J.* 18(12):219.
- Romanutti et al. 2020. Virus isolation and full-length genome sequencing of a representative canine distemper virus wild type strain of the South America 2 clade. *J Virol Methods* 279:113857.
- Sacristán et al. 2021. Epidemiology and molecular characterization of Carnivore protoparvovirus-1 infection in the wild felid *Leopardus guigna* in Chile. *Transbound Emerg Dis* 68(6):3335-3348.
- Sarute et al.2011. Primer diagnóstico molecular y caracterización parcial del gen de la nucleoproteína del virus Distemper Canino en Uruguay. *Veterinaria*, 47(182),7–13.
- Sarute et al.2013. The fusion protein signal-peptide-coding region of canine distemper virus: a useful tool for phylogenetic reconstruction and lineage identification. *PLoS ONE*, 8(5),e63595.
- Sarute et al.2014. First Genome Sequence of a Canine Distemper Virus Strain from South America. *Genome Announcements*, 2(5):e01009-14.
- Shackelton et al.2005. High Rate of Viral Evolution Associated with the Emergence of Carnivore Parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(2):379–84.
- Truyen et al.1996. Evolution of Canine Parvovirus Involved Loss and Gain of Feline Host Range. *Virology* 215(0021):186–89.
- Uhart et al. 2012. Exposure to selected Pathogens in to selected pathogens in Geoffroy's cats and domestic carnivores from central Argentina. *J Wildl Dis* 48(4):899-909.
- Véliz-Ahumada et al. 2021. Molecular Analysis of Full-Length VP2 of Canine Parvovirus Reveals Antigenic Drift in CPV-2b and CPV-2c Variants in Central Chile. *Animals (Basel)* 11(8):2387.
- Weckworth et al. 2020. Identifying Candidate Genetic Markers of CDV Cross-Species Pathogenicity in African Lions. *Pathogens* 9, 872.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)