

Detección y caracterización molecular del SARSCoV-2 en animales

Fuentealba, Nadia^{1,2}; Panei, Javier^{1,2,4}; Moré, Gastón^{1,2}; Bravi, María Emilia^{1,2}; Unzaga, Juan Manuel¹; Salina, Marcos^{1,3}; De Felice, Lorena¹; Pecoraro, Marcelo¹

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP, ² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), ³ Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, ⁴javierpanei@fcv.unlp.edu.ar; javipanei@gmail.com

Resumen. *El potencial origen zoonótico del SARS-CoV-2 ha planteado la necesidad de realizar el monitoreo y control de esta virosis en animales domésticos y silvestres para determinar el posible rol de los animales como portadores, reservorios y/o amplificadores del virus. Los estudios para comprender mejor la susceptibilidad de diferentes especies animales al SARS-CoV-2 y evaluar la dinámica de la infección en estas especies, así como también la identificación de posibles reservorios y/o transmisores, son una herramienta fundamental para la vigilancia de la pandemia. El diseño de protocolos específicos para el relevamiento epidemiológico y la toma de muestras de animales pertenecientes a pacientes positivos a COVID-19, dieron inicio al trabajo. Los objetivos del proyecto involucran el diagnóstico y la vigilancia epidemiológica del SARS-CoV-2 en animales que conviven con personas infectadas, para analizar la infectividad potencial del virus y el rol que cumplen los animales en la pandemia. Estos estudios son una herramienta que nos permitirá conocer el comportamiento del virus en diferentes hospedadores y sus implicancias en la transmisión y perpetuación de la infección.*

El proyecto comenzó con el diseño de protocolos para toma de muestras, definiendo caso sospechoso en animales, e indicando cómo debe proceder el Médico Veterinario particular al ser consultado por los propietarios. Dicho protocolo fue difundido por el Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires (Distrito II). Conjuntamente, se creó un consentimiento informado, aprobado por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) que es firmado por los responsables de los animales y del proyecto, acordando la toma de muestras. Por otro lado, el área de zoonosis dependiente del Ministerio de Salud de la Nación adoptó los protocolos y trabaja en la implementación de un sistema de vigilancia epidemiológica. Se realizó la difusión del proyecto en diversos medios de comunicación, permitiendo que aquellos

pacientes diagnosticados positivos a SARS-CoV-2 se comunicaran con el grupo de trabajo para consultas y coordinación de la toma de muestras a sus mascotas.

Hasta el 31 de agosto, se tomaron muestras de hisopados orofaríngeos y rectales de 15 caninos y 11 felinos, todos en estrecho contacto con personas diagnosticados positivos a SARS-CoV-2. Además, se colectaron muestras de un chimpancé del Ecoparque La Plata. Una vez en el laboratorio se realizó la extracción del ARN de las muestras utilizando un kit comercial, y el diagnóstico molecular por real-time RT-PCR adaptando kits comerciales. Las muestras analizadas fueron no reactivas a los targets específicos de SARS-CoV-2.

Palabras clave: coronavirus; SARS-CoV-2; animales; zoonosis; COVID-19

Recibido: 05/10/2020 Aceptado: 09/10/2020

DOI: <https://doi.org/10.24215/26838559e014>

Detection and molecular characterization of SARS-CoV-2 in animals

Abstract. *The zoonotic potential origin of the SARS-CoV-2 has raised the necessity to monitor and control the virus in domestic and wild animals to determine the possible role of the animals as carriers, reservoirs and / or virus amplifiers. Studies to understand the susceptibility of different animals to SARS-CoV-2 and to evaluate the dynamics of the infection, identification of the possible reservoirs and / or transmitters, are fundamental tools for the surveillance of the pandemic. The design of specific protocols for the epidemiological survey and for taking samples of pets belonging to positive COVID-19 owners began the work.*

The goals of the project involve the diagnosis and epidemiological control of SARS-CoV-2 in animals that live with infected people, the analysis of the potential infectivity of the virus and the role that animals play in the pandemic. These studies are an instrument that will allow us to know the infectivity of the virus in different hosts and its implications in the transmission and perpetuation of the infection.

The project began with the design of protocols for animal sampling, defining a suspected case and specifying how a particular veterinarian should proceed when asked by the positive SARS-CoV-2 owners. Said protocol was published by the Veterinary College of the Buenos Aires Province (District II). An informed agreement was created, approved by the Institutional Commission for the

Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL). The agreement is signed by those responsible for the animals and the project director, approving to take samples. On the other hand, the zoonosis area dependent on the National Ministry of Health adopted the protocols and is working on the implementation of an epidemiological surveillance system. The project contents and objectives was distributed in various media, allowing those SARS-CoV-2 owners diagnosed positive to communicate with members of the project for consultations and coordination for pets sampling. To August 31, rectal and oropharyngeal swabs were collected from 15 canines and 11 felines, all in close contact with people diagnosed positive for SARS-CoV-2. In addition, samples were collected from a chimpanzee from Ecopaque La Plata. Once in the laboratory, the RNA was extracted from the samples using a commercial kit, and the molecular diagnosis by real-time RT-PCR was carried out adapting commercial kits. The samples tested were non-reactive to the specific targets of SARS-CoV-2.

Keywords: coronavirus; SARS-CoV-2; animals; zoonosis; COVID-19

Novedad u originalidad local en el conocimiento

La difusión en diferentes medios de comunicación derivó en numerosas consultas por parte de propietarios diagnosticados como positivos a COVID-19 que estaban interesados en el testeo de sus mascotas, como también de organizaciones y profesionales, lo que nos permitió atender inquietudes sobre el rol del SARS-CoV-2 en animales.

Este proyecto constituye el inicio del proceso para identificar el rol epidemiológico del virus de los animales en la infección con SARS-CoV-2 en nuestro país. Teniendo en cuenta los reportes de animales detectados positivos al virus en otros países, consideramos que los estudios para comprender mejor la susceptibilidad de diferentes especies animales al SARS-CoV-2 y evaluar la dinámica de la infección con

potencial efecto en la salud, son una herramienta fundamental para la vigilancia y el control de la pandemia (Damas et al., 2020; McAloose et al., 2020; Shi et al., 2020b; Stout et al. 2020). El diseño de protocolos específicos para definir “caso-sospechoso” y muestreo en animales resultó indispensable para comenzar con el monitoreo epidemiológico. Por otro lado, dada la falta de tecnología específica para la detección molecular del virus en animales, hemos analizado y adaptado los métodos preexistentes para optimizar el diagnóstico y probablemente estas pruebas serán de gran ayuda para el diseño futuro de kit específicos para SARS-CoV-2 en animales. En caso de detectarse el virus en animales se procederá a estudios de secuenciación para comparar los genotipos con los circulantes en humanos de la misma región (Corman et al., 2020; Moore et al., 2020; Ramírez et al., 2020).

Grado de relevancia

El potencial origen zoonótico del SARS-CoV-2 ha planteado la necesidad de realizar el monitoreo y control de esta virosis en animales (Li et al., 2020; Xingguang et al., 2020; Zi-Wei et al., 2020). Tomando como referencia el enfoque multisectorial de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre el concepto de “Una Salud”, integramos una mesa multidisciplinaria convocada por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación con los Ministerios de Ambiente y Desarrollo Sostenible, y Salud de la Nación para abordar la situación de los animales en la actual pandemia de la COVID-19 y profundizar en una agenda común que le brinde un tratamiento

integral a la temática. Consideramos de gran importancia realizar estudios que nos permitan comprender la susceptibilidad de diferentes especies animales a la infección por SARS-CoV-2, así como también la identificación de posibles reservorios y/o transmisores virales. Estos estudios, son una herramienta fundamental para comprender el rol de los animales en esta pandemia. Dicha relevancia queda demostrada por el interés del Departamento de Zoonosis Urbanas de la Dirección de Vigilancia Epidemiológica y Control de Brotes del Ministerio de Salud de la provincia de Buenos Aires y del Ministerio de Salud de la Nación de implementar la vigilancia epidemiológica en animales como un programa permanente en todo el territorio argentino, en sintonía con lo recomendado por la OMS y la Organización Mundial por la Salud Animal (OIE) en otras partes del mundo.

Grado de pertinencia

El proyecto planteado propone clarificar el rol que cumplen los animales en la epidemiología de la infección con el SARS-CoV-2. Luego de la amplia propagación de la infección en humanos, varias especies de animales han sido reportadas en la OIE como positivas a SARS-CoV-2 debido a un contacto cercano con humanos infectados ([ver reporte](#)). En consecuencia, la OIE sugiere llevar a cabo pruebas en animales con el fin de evaluar el posible riesgo que implica para la salud. Además, este organismo garantiza la difusión de la información aprobada oficialmente acerca de los eventos reportados en animales. Sumando a esto, todos los investigadores del grupo

cuentan con una amplia experiencia en la detección, estudio, prevención y control, conjuntamente con los organismos oficiales de nuestro país (SENASA, INTA), de diferentes enfermedades y zoonosis infecto-contagiosas. Asimismo, el grupo cuenta con las capacidades en el diseño y análisis de las diversas técnicas moleculares que se utilizarán en el proyecto planteado. Por lo tanto, consideramos que se podrán obtener resultados que permitirán conocer más sobre la COVID-19 en la interfaz humano-animal-ecosistema y desarrollar opiniones científicas sobre las implicaciones de la enfermedad para la sanidad animal y la salud pública, ofreciendo consejos prácticos a los servicios veterinarios y a la comunidad.

Grado de demanda

El proyecto fue seleccionado para su financiación en la convocatoria extraordinaria COVID-19, realizada por la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación. Además, se encuentra en proceso de presentación para su acreditación como Proyecto de Desarrollo Tecnológico y Social (PDTs), debido a que el Banco Nacional de PDTs propició la presentación de los proyectos aprobados y financiados en las convocatorias impulsadas por la Unidad Coronavirus, donde se considerará que el Estado Nacional es el demandante de estos desarrollos tecnológicos.

Por otro lado, el proyecto fue ampliamente difundido en medios gráficos y radiales de comunicación ([ver nota prensa escrita](#); [ver video](#); [ver nota sitio de noticias](#)) como

también en noticias referidas al abordaje de la situación de los animales en la actual pandemia por COVID-19 por parte del gobierno ([ver sitio gubernamental](#)).

Además, se creó la casilla de correo covidenmascotas@gmail.com en la cual se recibieron numerosas consultas y se utiliza para la coordinación de muestreos de mascotas de pacientes.

Desarrollo del producto

El diseño de protocolos específicos y el consentimiento informado, para realizar la toma de muestras y la remisión de las mismas al laboratorio, resulta fundamental para dar comienzo a la evaluación de la situación epidemiológica en animales a nivel regional, provincial y nacional. Por lo tanto, se comenzó a trabajar con diferentes áreas del Ministerio de Salud de la Nación en la conformación de un nuevo protocolo tratando los puntos antes mencionados. Por otro lado, y debido a que los métodos de detección molecular están diseñados para la detección de SARS-CoV-2 en humanos (Shi et al., 2020a), adaptamos métodos de extracción del ARN y de *real time* RT-PCR preexistentes para optimizar el diagnóstico en muestras de animales. Estas modificaciones serán de gran ayuda para el diseño futuro de métodos de diagnóstico específicos para SARS-CoV-2 en animales. Debido a estas dificultades el proyecto también propone la validación de estos métodos de diagnóstico para evidenciar la presencia del virus en diferentes especies.

Financiamiento

El proyecto es financiado por la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación, por la Convocatoria Extraordinaria a Ideas Proyecto IP-COVID-19. IP COVID 19 - 468 - Detección y caracterización molecular del SARS-CoV-2 en animales.

Referencias bibliográficas

Corman, V.M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D.K.W., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M.L., Mulders, D.G.J.C., Haagmans, B.L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.L., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., Goossens, H., Reusken, C., Koopmans, M.P.G. y Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 25(3), 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

Damas, J., Hughes, G. M., Keough, K. C., Painter, C. A., Persky, N. S., Corbo, M., Hiller, M., Koepfli, K. P., Pfenning, A. R., Zhao, H., Genereux, D. P., Swofford, R., Pollard, K. S., Ryder, O. A., Nweeia, M. T., Lindblad-Toh, K., Teeling, E. C., Karlsson, E. K., & Lewin, H. A. (2020). Broad Host Range of SARS-CoV-2 Predicted by Comparative and Structural Analysis of ACE2 in Vertebrates. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2020.04.16.045302. <https://doi.org/10.1101/2020.04.16.045302>

Li, X., Zai, J., Zhao, Q., Nie, Q., Li, Y., Foley, B.T. y Chaillon, A. (2020). Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross- species analyses of SARS-CoV- 2. *Journal of Medical Virology*, 92(6): 602–11. <https://doi.org/10.1002/jmv.25731>

McAloose, D., Laverack, M., Wang, L., Killian, M.L., Caserta, L.C., Yuan, F., Mitchell, P.K., Queen, K., Mauldin, M.R., Cronk, B.D., Bartlett, S.L., Syke,s J.M., Zec, S., Stokol, T., Ingerman, K., Delaney, M.A., Fredrickson, R., Ivančić, M., Jenkins-Moore, M., Mozingo, K., Franzen, K., Hines Bergeson, N., Goodman, L., Wang, H., Fang, Y., Olmstead, C., McCann, C., Thomas, P., Goodrich, E., Elvinger, F., Smith, D.C., Tong, S., Slavinski, S., Calle, P.P., Terio, K., Torchetti, M.K. y Diel, D.G. (2020). From people to Panthera: natural SARS-CoV-2 infection in tigers and lions at the Bronx Zoo. *mBio* 11:e02220-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02220-20>

Moore, NM., Li H., Schejbal, D., Lindsley, J. y Hayden MK. (2020). Comparison of Two Commercial Molecular Tests and a Laboratory-Developed Modification of the CDC 2019-nCoV Reverse Transcriptase PCR Assay for the Detection of SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(8), e00938-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00938-20>

Ramirez, J.D., Muñoz, M., Hernandez, C., Flórez, C., Gomez, S., Rico, A., Pardo, L., Barros, E.C. y Paniz-Mondolfi, A.E. (2020). Genetic Diversity Among SARS-CoV2 Strains in South America may Impact Performance of Molecular Detection. *Pathogens*, 9(7), E580.<https://doi.org/10.3390/pathogens9070580>

Shi, J., Han, D., Zhang, R., Li, J. y Zhang, R. (2020a). Molecular and serological assays for SARS-CoV-2: insights from genome and clinical characteristics. *Clinical Chemistry*, 66 (8), 1030-46. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa122>

Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., Chen, H. y Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*, 368 (6494), 1016–1020. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>

Stout, A.E., André, N.M., Jaimes, J.A., Millet, J.K., Whittaker, G.R. (2020). Coronaviruses in cats and other companion animals: Where does SARS-CoV-2/COVID-19 fit?. *Vet Microbiol*, 247, 108777. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108777

Xingguang, L., Junjie, Z., Qiang, Z., Qing, N., Yi, L., Brian, F. y Antoine, C. (2020). Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. *Journal of Medical Virology*, 92, 602-611. <https://doi.org/10.1002/jmv.25731>

Ye, Z. W., Yuan, S., Yuen, K. S., Fung, S. Y., Chan, C. P. y Jin, D. Y. (2020). Zoonotic origins of human coronaviruses. *International journal of biological sciences*, 16(10), 1686–1697. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45472>