



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DE CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES E SONDAS
DE PCR PARA DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA
AGUDA GRAVE 2 E PROTOPARVOVÍRUS DE CARNÍVOROS**

Jéssica Gomes Maciel

CAXIAS DO SUL

2022

Jéssica Gomes Maciel

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES E SONDAS
DE PCR PARA DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA
AGUDA GRAVE 2 E PROTOPARVOVÍRUS DE CARNÍVOROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
como parte dos requisitos para a obtenção de grau de
Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Felipe Streck

CAXIAS DO SUL

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

M152a Maciel, Jéssica Gomes

Avaliação *in silico* de oligonucleotídeos iniciadores e sondas de PCR para detecção de coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 e protoparvovírus de carnívoros [recurso eletrônico] / Jéssica Gomes Maciel. – 2022.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2022.

Orientação: André Felipe Streck.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Reação em cadeia de polimerase. 2. Vírus da SARS. 3. Parvovírus canino. 4. Biologia molecular. I. Streck, André Felipe, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 577.2

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

Avaliação *in silico* de oligonucleotídeos iniciadores e sondas de PCR para detecção de coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 e protoparvovírus de carnívoros

Jéssica Gomes Maciel

Dissertação submetida a banca examinadora designada pela coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em _____ de _____ de 2022

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. André Felipe Streck
Universidade de Caxias do Sul – UCS

Profª. Dra. Camille Granada
Universidade do Vale do Taquari

Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
Universidade Feevale

Profª. Dra. Scheila de Avila e Silva
Universidade de Caxias do Sul

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à minha mãe, Solange, e aos meus avós, Cerlei e Carlos, que sempre acreditaram que a educação é o melhor caminho para alcançar os nossos objetivos. Agradecer ao meu namorado, Filipe, por todo apoio, desde o momento em que decidi me inscrever para o mestrado, quando deixei meu emprego e mergulhei de cabeça neste projeto e, principalmente, por sempre acreditar na minha capacidade de ir além, até quando eu mesma duvidei. Agradeço ao meu amigo Johnatan por todos os ensinamentos de biologia molecular desde a graduação, que só fizeram eu me apaixonar mais ainda pelo tema. Agradeço imensamente aos meus colegas e amigos de jornada científica: Diezza, Diéssy, Weslei, Muriel e Sabrina, sem a ajuda e contribuição de cada um de vocês, este trabalho não teria sido possível. Agradeço ao meu orientador, André, à CAPES, à Universidade de Caxias do Sul e ao Instituto de Biotecnologia pelo espaço e estrutura disponíveis para realização deste trabalho.

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores brasileiros que lutam diariamente contra o negacionismo científico e que não perderam a esperança diante dos momentos sombrios que vivemos.

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos."

Marie Curie

ÍNDICE

Resumo.....	10
Abstract	11
1. Introdução.....	12
2. Revisão de literatura	14
2.1. Reação em cadeia da polimerase convencional e em tempo real	14
2.2. Por que analisar <i>mismatches</i> em regiões de ligação do <i>primer</i> ?.....	17
2.3. Vírus emergentes: SARS-CoV-2	21
2.4. Parvovírus canino tipo 2 (CPV-2).....	27
3. Objetivo geral	31
3.1. Objetivos específicos.....	31
4. Resultados.....	32
CAPÍTULO I: Manuscrito enviado para a revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, sob título “ <i>In silico</i> analysis of the polymerase chain reaction primers and probes used to detect circulating variants of SARS-CoV-2 in Brazil”.	32
CAPÍTULO II: Manuscrito que será submetido à uma revista internacional sob título “ <i>In silico</i> analysis of the polymerase chain reaction primers and probes used for the detection of canine parvovirus type 2 (CPV-2)”	55
5. Discussão geral	67
6. Conclusão	70
7. Perspectivas	71
8. Referências	72
ANEXOS.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabelas da dissertação:

Tabela 1: Características gerais para desenho de primers e sondas.....	17
Tabela 2: Medicamentos autorizados pela FDA para tratamento de COVID-19.....	25

Tabelas do capítulo I:

Table 1: Detection methods used in the study.....	38
Table 2: Representative mismatches retrieved by SCREENED.	46

Tabelas do capítulo II:

Table 1: Primers/probes used in the analysis.	60
Table 2: Location, number of genomes and types of mismatches that were found in the CPV-2 sequences for the primer Decaro_1.....	62
Table 3: Percentage of CPV-2 sequences that had mismatches in the forward (0-5), reverse (0-2) and probe (0-3) Decaro_2, Kaur_3, and Sun_5 primers.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figuras da dissertação:

Figura 1: Esquema do funcionamento da PCR convencional (à esquerda) e em tempo real (à direita).	16
Figura 2: Representação da estrutura dos vírus..	19
Figura 3: Representação de tipos de mismatches.	20
Figura 4: Linha do tempo que resume o surgimento das variantes do SARS-CoV-2.	25
Figura 5: Processos evolutivos do CPV-2.....	30

Figuras do capítulo I:

Figure 1: Diversity in the SARS-CoV-2 Gamma genomes of the target sequences amplified by the evaluated primer and probe sets.	42
Figure 2: Diversity in the SARS-CoV-2 Delta genomes of the target sequences amplified by the evaluated primer and probe sets.....	43
Figure 3: Diversity in the SARS-CoV-2 Omicron genomes of the target sequences amplified by the evaluated primer and probe sets.....	44

Figuras do capítulo II:

Figure 1: Graphical representation of the parvovirus genome (around 5053bp).	59
---	----

Resumo

As incompatibilidades (*mismatches*) *primer*-alvo são uma problemática que vem sendo cada vez mais abordada por pesquisadores em biologia molecular, por se tratar de um interferente no anelamento do *primer* que pode impedir a extensão do DNA alvo pela DNA polymerase. Os vírus que serão abordados nesta dissertação apresentam frequências altas de SNP, que podem ocasionar *mismatches primer*-alvo. O SARS-CoV-2 é detectado rotineiramente por PCR em todo o mundo. As sequências de *primers* e sondas dos ensaios de detecção de SARS-CoV-2 foram projetadas de acordo com as primeiras sequências virais disponíveis no ano de 2020, ou seja, não incluindo as variantes atualmente circulantes. O parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) é uma das doenças gastroentéricas mais relevantes na medicina de pequenos animais e apresenta um número alto de SNP's, mesmo sendo um vírus de DNA. A detecção viral pode ser realizada por teste rápido, contudo, o padrão ouro de detecção do CPV-2 é a PCR. Por isso, diferentes ensaios têm sido descritos e amplamente utilizados para a detecção molecular de CPV-2 em amostras clínicas. Nesta dissertação, utilizamos o software SCREENED para analisar *in silico* 12 conjuntos de *primers* de detecção de SARS-CoV-2 em 3.123 genomas das variantes Gamma, Delta e Omicron, detectados no Brasil. De igual forma, utilizamos o SCREENED para analisar *in silico* 7 conjuntos de *primers* que detectam CPV-2, em 996 genomas, onde 28 eram cepas de vacinais amplamente utilizadas no mundo todo. Em geral, os resultados para ambos os vírus mostraram que, embora a maioria dos ensaios continue a detectar casos positivos e apresente alta cobertura e especificidade, algumas incompatibilidades já podem resultar em falsos negativos ou problemas de quantificação viral.

Palavras-chave: *Mismatch*, PCR, SARS-CoV-2, CPV-2, *primers*.

Abstract

Primer-target mismatches are a problem that has been approached by researchers in molecular biology, as it is an interference in primer annealing that can prevent the extension step by DNA polymerase. The viruses that will be discussed here have high SNP frequencies, which can cause primer-target mismatches. SARS-CoV-2 is routinely detected by PCR worldwide. The primers and probe sequences to SARS-CoV-2 detection assays were designed according to the first viral sequences available in early 2020, not including the variants that are currently circulating. Canine parvovirus type 2 (CPV-2) is one of the most relevant gastroenteric diseases in small animal medicine and has a high number of SNPs, even though it is a DNA virus. Viral detection can be performed by snap tests, however, the gold standard for CPV-2 detection is PCR. Therefore, different assays have been described and widely used for the molecular detection of CPV-2 in clinical samples. We used SCREENED software to analyze in silico 12 sets of SARS-CoV-2 detection primers in 3,123 genomes of the Gamma, Delta and Omicron variants detected in Brazil. Likewise, we used SCREENED to analyze in silico 7 sets of primers that detect CPV-2, in 996 genomes, of which 28 were vaccine strains widely used worldwide. Overall, the results for both viruses showed that, although most assays continue to detect positive cases and have high coverage and specificity, some mismatches may already result in false negatives or viral quantification problems.

Keywords: Mismatch, PCR, SARS-CoV-2, CPV-2, primers.

1. Introdução

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – sigla em inglês) permite a síntese de fragmentos de DNA em grande quantidade a partir de sequências alvo definidas, podendo ser realizada inteiramente *in vitro* sem o uso de células. Para permitir amplificação seletiva, é necessário projetar dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que sejam específicos para o alvo que se anelam, um em cada fita (Lypai and Bianco, 2015). A PCR realiza uma reação de repetição de 30 a 40 ciclos e as etapas são: a desnaturação, na qual ocorre aumento da temperatura para 95°C, o que é suficiente para desfazer as fitas-duplas, separando umas das outras. A segunda etapa é o anelamento, ocorrendo a redução da temperatura para 45 a 65°C, assim os *primers* têm como função reconhecer as regiões flanqueadoras da sequência de interesse e, ao se anelarem a estas, eles fornecem a extremidade 3'-OH livre necessária para a síntese de uma fita complementar pela polimerase. A última etapa é a extensão das fitas, na qual a temperatura é aumentada a cerca de 70°C, e a fita complementar à sequência de interesse poderá ser sintetizada pela enzima por meio da incorporação dos dNTPs (Green and Sambrook, 2019).

Ocorrendo os passos acima citados, teremos um resultado de PCR de sucesso. Do contrário, a PCR pode falhar. Os fatores típicos que influenciam a taxa de falha de uma PCR incluem a pureza do DNA genômico, o comprimento dos fragmentos de DNA, a precisão das medições de concentração de DNA, a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e a singularidade das sequências de *primers* de PCR (Andreson et al., 2008). Além disso, a posição do SNP dentro dos oligonucleotídeos influencia a probabilidade de amplificação, ou seja, um SNP localizado na extremidade 3' impacta a quantificação mais fortemente do que o mesmo SNP localizado na extremidade 5' do *primer* (Boyle et al., 2009). Um par de *primers* que apresente, por exemplo, 3 desemparelhamentos no *primer* direto e 2 no *primer* reverso, pode bloquear completamente uma reação (Lefever et al., 2013). Devido a estes fatores, é de grande importância que os *primers* sejam bem desenhados e continuamente revisados, com o objetivo de impedir possíveis falhas de amplificação (Gand et al., 2020).

Os vírus que serão abordados nesta dissertação apresentam frequências altas de SNP, que podem ocasionar incompatibilidades (*mismatches*) *primer*-alvo e atrasar ou até mesmo impedir a amplificação por PCR. São eles: o SARS-CoV-2, um vírus emergente que surgiu no final de 2019 na China e espalhou-se epidemicamente pelo mundo, instaurando a pandemia de

COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*) em janeiro de 2020 (Pachetti et al., 2020; Phan, 2020). Atualmente apresenta muitas variantes em circulação e, por ser um vírus de RNA, tem grande tendência a evoluir e mutar ainda mais, aumentando sua transmissibilidade e conseqüentemente, perdurando na população humana por vários anos (Choi and Smith, 2021; Giovanetti et al., 2021; Ong et al., 2021); e o parvovírus canino tipo 2 (CPV-2), que se originou do vírus da panleucopenia felina na década de 70 e foi completamente substituído por suas variantes antigênicas CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c, através da ocorrência de diversos SNPs que serão abordados com mais detalhes no decorrer deste trabalho (de Oliveira Santana et al., 2022; Giraldo-Ramirez et al., 2020). Devido a estas variações genômicas de ambos os vírus, este trabalho buscou avaliar *in silico* os ensaios de detecção de SARS-CoV-2 e os ensaios de detecção de CPV-2, buscando analisar se há ocorrências de *mismatch primer*-alvo. A análise de PCR *in silico* é um método complementar útil e eficiente para garantir a especificidade do *primer* para uma ampla gama de aplicações de PCR, desde descoberta de genes, diagnóstico molecular e detecção de patógenos até tipagem forense de DNA (Yu and Zhang, 2011).

2. Revisão de literatura

2.1. Reação em cadeia da polimerase convencional e em tempo real

A PCR vem sendo amplamente utilizada no mundo todo desde sua descoberta e, atualmente, possui uma gama de aplicações, como diagnóstico preciso de doenças, quantificação de DNA alvo, análises em multiplex, sequenciamentos de genoma, entre outras. Dentro de um termociclador, a PCR amplifica o DNA alvo de forma exponencial, utilizando a temperatura para atingir cada objetivo dos 35-45 ciclos: desnaturação da fita a mais de 90°C, anelamento dos *primers* (temperatura variável, dependente das características dos oligonucleotídeos) e extensão da fita entre 55°C e 72°C (Green and Sambrook, 2019). A última etapa é realizada por uma DNA polimerase termoestável como, por exemplo, a *Taq DNA polimerase*, isolada nos anos 90 a partir do microrganismo *Thermus aquaticus* (Brock, 1997; Saiki et al., 1988).

O produto de cada ciclo de PCR é o dobro do ciclo anterior, cujo tamanho é a quantidade de nucleotídeos entre os dois *primers*, o *amplicon*, medido em pares de bases (pb), e o resultado, no caso de uma PCR convencional, pode ser observado após uma eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. Além do DNA alvo, da DNA polimerase termoestável e um par de oligonucleotídeos, a reação exige alguns componentes essenciais para o bom funcionamento, como os desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), que serão incorporados pela DNA polimerase para formar a nova fita de DNA, complementar à fita mãe; os cátions divalentes, geralmente Mg^{2+} , que têm a função de reagir com os dNTP's e manter estável a ligação *primer-molde*; cátions monovalentes, como o KCl, que auxiliam no rendimento da amplificação; e uma solução tampão para manter o pH, geralmente o Tris-Cl (Green and Sambrook, 2019). Métodos derivados, como a RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*), que detecta moléculas de RNA, demandam na reação uma enzima que converte o RNA em cDNA (DNA complementar) (Rappolee et al., 1988b, 1988a).

A descoberta da atividade de exonuclease da *Taq polimerase* aprimorou a técnica de PCR, acrescentando sondas de hibridização à reação, dando início ao surgimento do que hoje conhecemos como a PCR quantitativa em tempo real (qPCR). As sondas foram projetadas para hibridizar dentro da sequência alvo entre os *primers* portanto, durante a ação da *Taq polimerase*, elas são degradadas pela atividade de exonuclease 5'-3' (Holland et al., 1991). A quantidade de

sonda degradada após 30 ou 40 ciclos sugeria que a PCR poderia avaliar as moléculas alvo de forma quantitativa. Em 1992, foi desenvolvido um ensaio homogêneo sem manipulação pós-PCR para detectar os produtos, a partir da adição de brometo de etídio à reação, ocasionando o aumento da fluorescência na presença do DNA alvo e a detecção contínua da fluorescência durante a termociclagem (Higuchi et al., 1992).

Mais tarde, estudos do mesmo grupo de pesquisadores demonstraram que a cinética de acúmulo de fluorescência durante a termociclagem estava relacionada ao número inicial de cópias de DNA, demonstrando claramente o processo exponencial da PCR e sua capacidade de quantificar o DNA alvo (Higuchi et al., 1993). Pesquisas de discriminação alélica foram realizados com a utilização de uma sonda com indicador fluorescente e um corante inibidor, que anulavam suas fluorescências, restaurando-as apenas após a atividade de exonuclease da *Taq polimerase* (Lee et al., 1993). Por fim, ocorreu o desenvolvimento das sondas TaqMan, duplamente marcadas, com o agente fluorescente e agente inibidor em extremidades opostas, mostrando um potencial ainda maior no sinal fluorescente (Livak et al., 1995). A qPCR é amplamente utilizada por não demandar manipulação de amostra após a amplificação, evitando contaminações e tornando a detecção muito mais rápida (Heid et al., 1996). Seu resultado é observado em formato gráfico em um computador ou na tela do próprio equipamento de termociclagem. A Figura 1 apresenta os dois tipos de PCR em esquema.

De todos os fatores envolvidos na PCR, um dos mais importantes para a obtenção de um resultado de sucesso é o projeto de *primers* e sondas que apresentem alto rendimento na amplificação do alvo desejado (Green and Sambrook, 2019). Na microbiologia, por exemplo, ao desenhar um *primer* em uma sequência gênica conservada em diversas espécies de bactérias, é possível obter uma detecção ampla, enquanto, ao desenhar um *primer* direcionado a uma sequência única, a detecção será de uma espécie de bactéria em particular, ou seja, altamente específica (Hanna et al., 2005). Os *primers* e sondas são pequenos fragmentos de DNA, desenhados para ter complementariedade com o DNA alvo. Algumas características devem ser levadas em consideração no desenho de *primers* e sondas PCR (Chuang et al., 2013; Lim et al., 2011; Rodríguez et al., 2015; Waters and Shapter, 2014) e elas são descritas na Tabela 1.

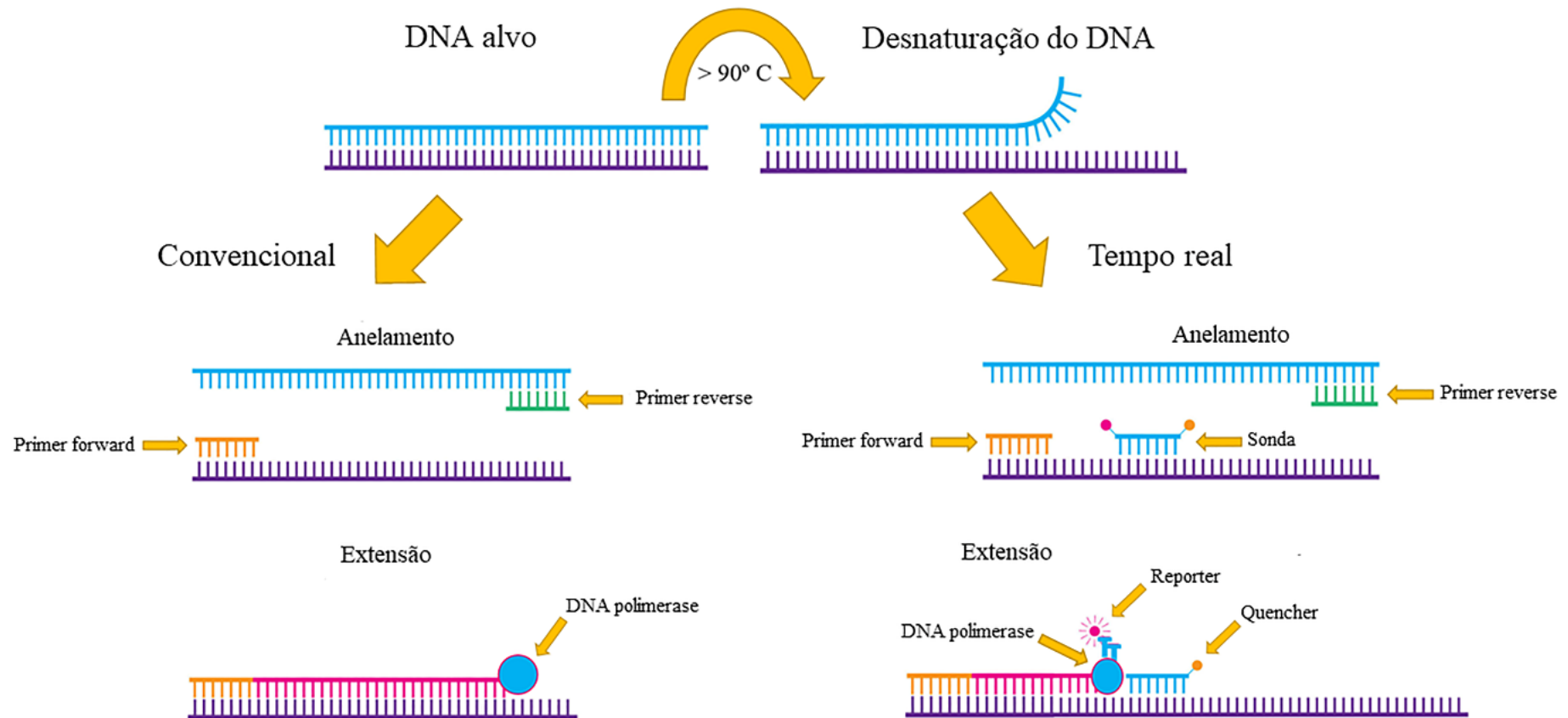


Figura 1: Esquema do funcionamento da PCR convencional (à esquerda) e em tempo real (à direita). Na PCR convencional a DNA polimerase inicia a síntese da nova fita a partir da terminação 3'OH livre. Na PCR em tempo real ocorre o mesmo, porém ao se deparar com a sonda hibridizada, a DNA polimerase realiza a atividade de exonuclease, retirando os nucleotídeos, um a um, para adicionar os novos. Nesse processo, o reporter começa a emitir fluorescência por se distanciar do inibidor (quencher).

Tabela 1: Características gerais para desenho de primers e sondas.

<i>Requisito</i>	<i>Primers</i>	<i>Sondas</i>
Conteúdo de GC	40-60%	
T _m *	50-62 °C	8-10 °C > <i>primer</i>
Dímero	Evitar	
<i>Hairpin</i>	Evitar	
Nucleotídeos idênticos lado a lado	Máximo 3 (evitar G)	
Tamanho	15-30 nucleotídeos	
Produto (bp)	PCRc (200 – 1000) qPCR (até 150)	
G como primeiro nucleotídeo	Não se aplica	Evitar
Regra da terminação 3'	Até dois C/G nos últimos 5 nucleotídeos	

Tabela 1: Os nucleotídeos guanina e citosina formam uma ligação tripla de Hidrogênio, sendo termodinamicamente mais estáveis do que adenosina e timina, por isso a proporção GC deve estar entre 40-60% em *primers* e sondas; a diferença de T_m entre um *primer* e outro não pode exceder 5 °C; Dímeros são anelamentos *primer-primer* e *hairpin* é o anelamento do *primer* consigo mesmo, formando uma estrutura semelhante a um “grampo de cabelo; a T_m da sonda deve estar entre 8-10 °C acima da T_m dos *primers*, evitando que ela deixe de hibridizar durante a extensão; o nucleotídeo guanina não deve estar ligado ao repórter na terminação 5', pois pode ocorrer redução de valores de fluorescência; Produtos de PCR com menos de 150 pb são recomendados para PCR em tempo real por apresentarem maior eficiência da reação. * T_m: Temperatura de *melting*: temperatura na qual metade dos fragmentos de DNA está na forma desnaturada, ou seja, não pareados, e a outra metade está pareada.

2.2. Por que analisar *mismatches* em regiões de ligação do *primer*?

As moléculas de DNA não são inertes, podendo sofrer mudanças em sua estrutura ou composição química, ocorrendo o que conhecemos como mutação, que acontece, em geral, de forma espontânea, com frequência variável para cada espécie (Zaha et al., 2014). Os vírus são estruturas subcelulares que contêm como material genético RNA ou DNA, e não possuem

potencial genético ou bioquímico para realizar processos biológicos, fazendo-os exclusivamente dentro da célula hospedeira (Santos et al., 2021). Na Figura 2 é possível observar a representação da estrutura geral dos vírus. Embora o genoma viral codifique uma quantidade pequena de genes, ocorre uma enorme diversidade de populações virais, o que possibilita a sua manutenção na natureza. Isto acontece por meio da evolução viral, definida a partir de fenômenos de mutações, recombinações, reagrupamentos e seleções diante das pressões seletivas. Quando tratamos de evolução viral, devemos procurar partir de que o principal objetivo do vírus é a perpetuação, não ocorrendo uma mudança meramente do simples para o complexo, mas para eliminar genótipos menos adaptados no momento e tornar possível sua permanência e propagação em uma população hospedeira (Santos et al., 2021). O surto do vírus Influenza H1N1 é um exemplo de recombinação viral da qual vários vírus circularam por anos nos suínos, ocasionando pelo menos dois eventos de rearranjo, carregando genes de três diferentes linhagens ancestrais, sendo, então, transmitido para humanos (Smith et al., 2009).

É importante salientar que a evolução viral é definida em termos de população e não de uma partícula individualmente, ou seja, compreende uma diversidade de mutantes que são produzidos em grandes quantidades (Santos et al., 2021). Um dos tipos mais frequentes de evolução viral são os polimorfismos de nucleotídeo único (*single-nucleotide polymorphisms* – SNP), que são trocas de um nucleotídeo ou par de bases (Kwok and Chen, 2003; Ramírez-Bello et al., 2013; Ramírez-Bello and Jiménez-Morales, 2017). Os SNPs podem ocorrer em diversas partes do genoma e são classificados conforme sua localização. Quando ocorrem em regiões codificantes, os SNPs podem ser sinônimos – que não alteram a sequência de aminoácidos –, não-sinônimos *missense* – quando a troca do nucleotídeo resulta também na troca do aminoácido, afetando a sequência da proteína e podendo levar à sua disfunção – e não-sinônimos *nonsense* – quando o nucleotídeo substituído leva a um códon de parada ou revogação, o que resulta em uma proteína encurtada ou alongada e, provavelmente, não funcional. Entretanto, a maior parte dos SNPs ocorre em regiões não codificantes e prever suas consequências é desafiador, mas podemos citar alguns exemplos como a variação no nível de expressão gênica, alteração na tradução de proteínas ou na produção de variantes de transcrição. É importante salientar que os SNPs precisam ter frequência igual ou superior a 1% da população para serem considerados polimorfismos (Nogales and L DeDiego, 2019).

As mutações virais podem interferir na sensibilidade e especificidade dos testes de PCR (Gand et al., 2020) e um bom exemplo pode ser dado pelas análises do vírus da Chikungunya, que mostram que diversos pontos de mutação adaptativa ocorrem no genoma do vírus e estão

associados a um aumento das espécies de mosquitos transmissores e, conseqüentemente, aumento da dispersão global da doença. Além disso, dificuldades podem ocorrer durante a detecção do vírus na PCR, devido a um acúmulo de incompatibilidades entre os *primers* que vem sendo utilizados e o DNA viral, diminuindo ou, até mesmo, não detectando a presença do patógeno, mesmo em altas concentrações (Fischer et al., 2019). Isto ocorre porque, para que uma PCR seja precisa e eficaz, é necessário que o *primer* desenhado seja complementar ao DNA alvo, caso contrário, o duplex formado pela ligação *primer*-alvo não se mantém estável e pode impedir que a DNA polimerase faça a extensão da fita a partir da extremidade 3'-OH livre, dependente dessa complementariedade (Bru et al., 2008). Quando um *primer* é 100% complementar à fita do DNA alvo, dizemos que ele apresenta *match* e quando não apresenta 100% de complementariedade, chamamos de *mismatch* (Figura 3). *Mismatches* podem resultar em problemas de amplificação e quantificação durante a PCR, inclusive quando ocorrem somente em um nucleotídeo (SNP), e, principalmente, quando próximos à região 3' (Bru et al., 2008; Ghedira et al., 2009; Kwok et al., 1990; Persson et al., 2019; Rejali et al., 2018; Stadhouders et al., 2010). Além disso, vários *mismatches* em um mesmo *primer* podem afetar a especificidade do teste em caracterizações genotípicas, apresentando como resultado um genótipo que pode não representar a população viral dominante (Martinez-Picado et al., 2005). O número de cópias de um gene pode ser subestimado em até mil vezes na presença de um único *mismatch* na segunda porção do *primer* (Bru et al., 2008).

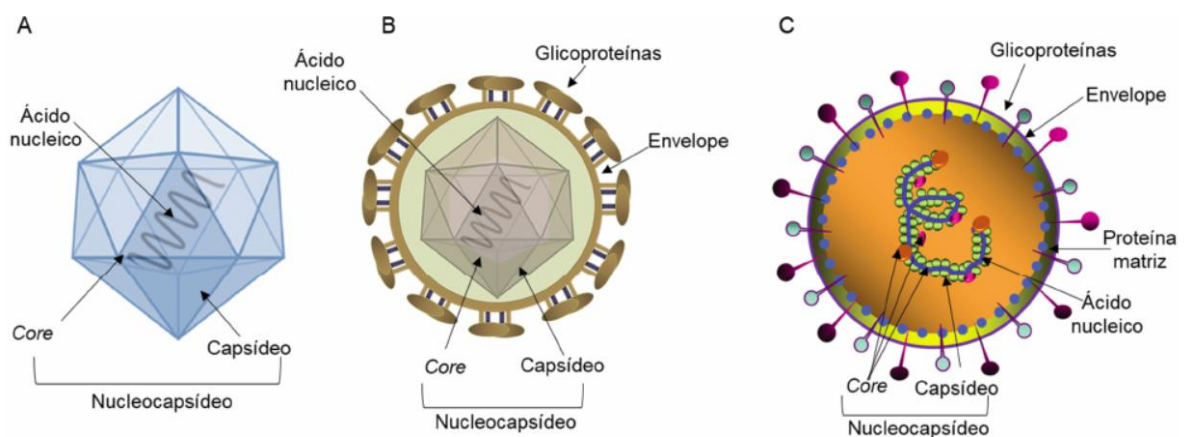


Figura 2: Representação da estrutura dos vírus. A: Vírus sem envelope com simetria icosaédrica. B: Vírus envelopado com simetria icosaédrica. C: Vírus envelopado com simetria helicoidal. O core é composto pelo ácido nucleico e proteínas associadas, enquanto o nucleocapsídeo é o conjunto de core e capsídeo. Adaptado de: Virologia humana – 4ª ed (Santos et al., 2021).

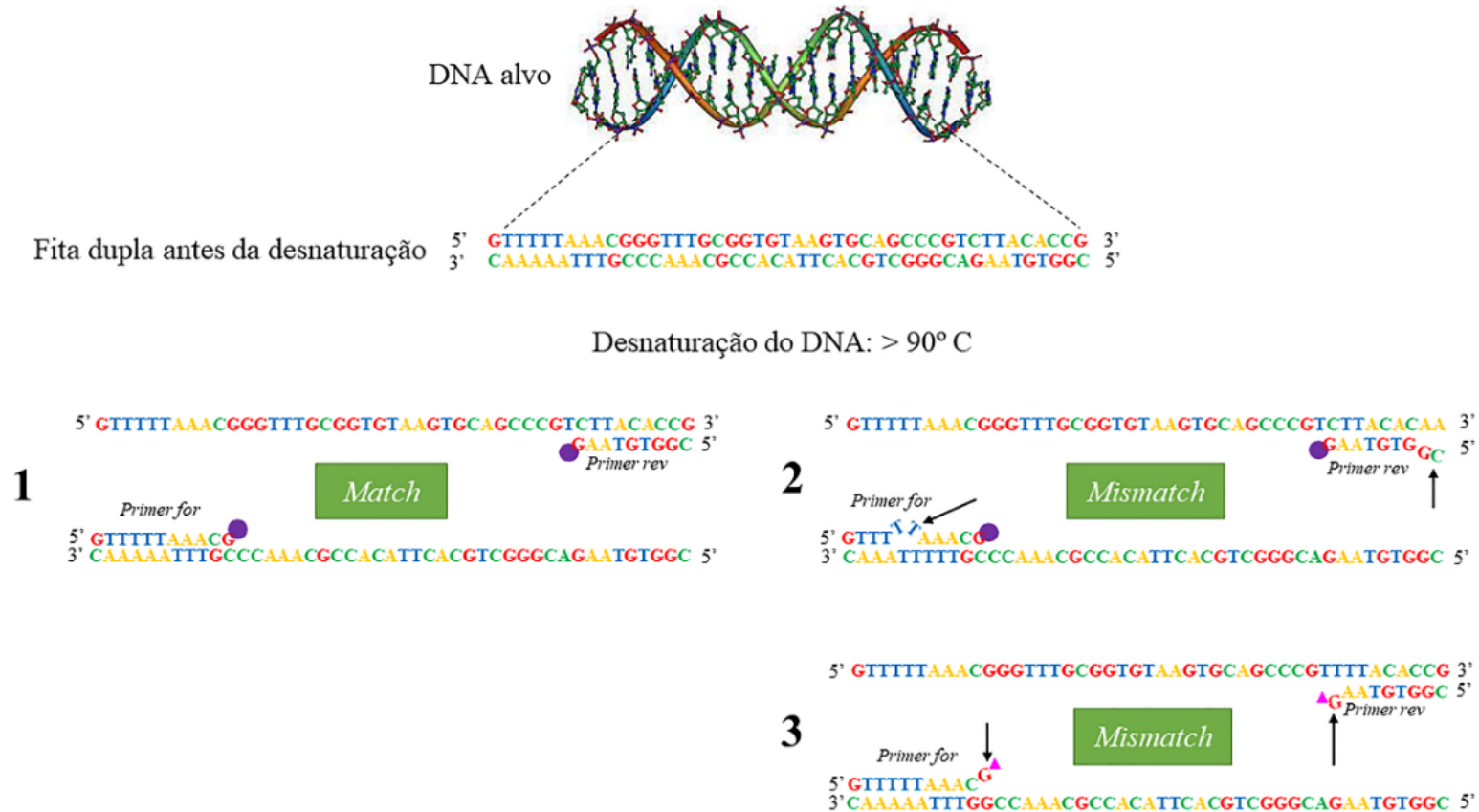


Figura 3: Representação de tipos de mismatches. As setas indicam um nucleotídeo do *primer* que não se ligou ao alvo (*mismatch*), os círculos roxos representam uma extremidade 3'OH livre em que a DNA polimerase poderá estender a fita, os triângulos rosas representam uma extremidade 3'OH livre, porém que a DNA polimerase não conseguirá se ligar para estender a fita. Na representação de *match* (exemplo número 1), o *primer* e o alvo são complementares e a extensão da PCR ocorrerá normalmente.

Os *primers* e sondas podem ser desenhados de forma manual, contudo, vários softwares baseados em dados de sequenciamento de genoma podem ser utilizados para este fim. Alguns exemplos são o Geneious, projetado para ser uma estrutura de aplicativo de software de desktop flexível e de fácil manuseio para a organização e análise de dados biológicos, com foco em sequências moleculares e tipos de dados relacionados; o GST-PRIME, que fornece uma plataforma amigável para o design automático de *primers*, com confiabilidade confirmada a partir de testes experimentais na espécie de planta modelo *Arabidopsis thaliana*; o software O OLIGO, que executa uma série de funções para pesquisas em PCR e tecnologias relacionadas, como seleção de *primers* para PCR e sequenciamento, design de sonda de hibridização, PCR em tempo real, análise de priming falso, *primers* para *nested* PCR, *primers* degenerados, tradução reversa e análise e predição de enzimas de restrição; o *Primer-BLAST*, um software que fornece *primers* e sondas a partir de um alvo específico, além de teste de *match*, *mismatch* e especificidade a partir de um *primer* existente; entre outros softwares (Kearse et al., 2012; Leister and Varotto, 2007; Rychlik, 2007; SantaLucia, 2007; Srivastava and Xu, 2007; Ye et al., 2012).

Além do desenho de *primers*, a avaliação da sua hibridização efetiva também deve ser realizada e um dos *softwares* que utiliza os bancos de dados de genoma e realiza testagem exhaustiva *in silico* é o SCREENED. Ele possui uma abordagem de avaliação de *primers* e sondas de métodos de PCR, através de dados de genoma completo dos quais extrai as regiões genômicas direcionadas e investiga a existência de incompatibilidades para cada genoma, gerando um sinal teórico positivo ou teórico negativo de PCR. Além disso, o software também aponta os *mismatches* existentes em cada *primer* e sonda e um resultado de diversidade do *amplicon* (Gand et al., 2021, 2020; Vanneste et al., 2018). O SCREENED foi desenvolvido especificamente para testes de *primers* contra genomas, e utilizado para esse fim com os vírus da dengue, zika e Chikungunya (Broeders et al., 2020; Vanneste et al., 2018).

2.3. Vírus emergentes: SARS-CoV-2

As populações hospedeiras estão em constante crescimento e adaptação, o que propicia que as populações virais capazes de as infectar sejam selecionadas. As infecções virais, portanto, podem ser uma força seletiva significativa na evolução das populações hospedeiras, e caso estas não consigam adaptar-se, podem ser exterminadas (Santos et al., 2021). Os vírus possuem uma capacidade ímpar de infectar novos tipos de hospedeiros que, muitas vezes, não

são relacionados, o que é chamado de emergência de vírus. O surgimento de um vírus emergente depende de três etapas: aquisição da capacidade de infectar novos hospedeiros; adaptação ao novo hospedeiro, de forma que seja fácil ser transmitido entre eles; capacidade de se espalhar epidemicamente pela população de novos hospedeiros. Enquanto as duas primeiras etapas envolvem mudanças genéticas virais, a última está relacionada totalmente ao comportamento dos hospedeiros ou dos vetores (Dennehy, 2017; Elena et al., 2011).

Estas foram as prováveis circunstâncias que originaram o SARS-CoV-2 e instauraram a pandemia de COVID-19 em dezembro de 2019 (WORDL HEALTH ORGANIZATION, 2020a). Acredita-se que o transbordamento direto de patógenos de animais silvestres para os humanos estão associadas à atividades de degradação ambiental, como a caça, o desmatamento, o avanço da agricultura e pecuária e o contato com animais silvestres em cativeiro, fornecendo oportunidades de propagação, diversificação genética e adaptação de patógenos (Jones et al., 2013). Os morcegos são considerados reservatórios de diversos tipos de vírus (Hayman, 2016) e são a provável origem do SARS-CoV-2 antes do transbordamento para os humanos ou outro hospedeiro intermediário que o antecedeu (Zhang and Holmes, 2020). Pertencente ao gênero *betacoronavírus*, o SARS-CoV-2 é um vírus RNA de fita simples, sentido positivo e envelopado e seus sintomas iniciam-se leves no trato respiratório, mas podem evoluir para patologia respiratória grave, com lesão pulmonar e risco de vida (V'kovski et al., 2021). Análises iniciais do genoma viral mostravam que ele possui uma longa poliproteína ORF1ab (*open reading frame* – região de leitura aberta) na extremidade 5' e outras quatro proteínas estruturais: nucleocapsídeo (N), membrana (M), envelope (E) e *spike* (S). O vírus apresenta uma gama de regiões com mutação *missense* e deleções (Phan, 2020). A proteína estrutural *spike* reconhece o receptor da célula hospedeira, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2), liga-se a ela e proporciona a penetração do vírus na célula hospedeira (Giovanetti et al., 2021).

Quando a OMS declarou a COVID-19 como uma pandemia, medidas mitigatórias foram tomadas para conter a disseminação viral, incluindo restrições de viagens, triagem e teste de viajantes, isolamento, quarentena e fechamento de escolas (Bourouiba, 2020). A esta altura, 118 mil pessoas já estavam infectadas e mais de 4 mil haviam morrido, devido a dispersão acelerada do vírus (World Health Organization, 2020c). No Brasil, entre fevereiro e março de 2020, 841.302 passageiros de voos internacionais aterrissaram em um total de 84 cidades do país, e estima-se que 54,8% de todos os casos de COVID-19 importados foram de viajantes infectados na Itália e 9,3% e 8,3% de viajantes infectados na China e na França,

respectivamente. A Itália foi provavelmente o local de origem para cinco das 10 principais rotas de importação de viajantes infectados para o Brasil, pelos dados do estudo à época (Candido et al., 2020). A partir daí, teve início a propagação viral pela malha rodoviária brasileira, partindo das cidades metropolitanas, e se tornando, então, o principal mecanismo pelo qual os casos iniciais chegaram a todas as cidades, através do eixo norte-sul do Brasil, uma distância de aproximadamente 5.313 km (Nicolelis et al., 2021). A volta à rotina de trabalho no país levou pessoas com menos de 50 anos – a maioria em situação de vulnerabilidade – aos hospitais que, conseqüentemente morreram, em taxas mais elevadas que nos EUA, Europa e China, comprovando que a desigualdade agravou a pandemia no país (Ponce, 2020).

A baixa fidelidade replicativa dos vírus de RNA garante que as populações virais possam gerar e manter mutações, adaptando-se rapidamente às mudanças ambientais (Lauring et al., 2013). Embora os *Coronaviridae* possuam uma atividade de revisão de replicação na síntese de RNA, o SARS-CoV-2 apresentou uma diversidade de mutações pontuais e deleções no genoma (Giovanetti et al., 2021), o que possibilitou o surgimento de variantes de interesse (VOI), definidas como variantes que apresentam alterações genéticas previstas, que podem afetar a transmissibilidade, gravidade da doença, escape imunológico, escape diagnóstico ou terapêutico; e as variantes de preocupação (VOC), definidas como variantes que atendem à definição de uma VOI e possuem grau de significância para a saúde pública global por aumento na transmissibilidade, aumento da virulência ou mudança na apresentação clínica da doença, diminuição da eficácia das medidas de saúde pública ou dos métodos diagnósticos, vacinas e tratamentos disponíveis. Até agosto de 2021, quatro VOCs do SARS-CoV-2 (Alpha, Beta, Gamma e Delta) foram designados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), as quais estavam espalhadas por 193, 141, 91 e 170 países, respectivamente (Choi and Smith, 2021). No final de novembro de 2021, a OMS declarou mais uma VOC, a qual chamou de Omicron (World Health Organization, 2021a) (Figura 4).

A VOC Alfa, teve provável surgimento em setembro de 2020, no Reino Unido e, em poucos meses, foi exportada para todo o mundo, apresentando vantagens de aptidão em relação à cepa original. Alfa possui 17 mutações (14 mutações pontuais não sinônimas e três deleções) no genoma viral, às quais oito estão na proteína S e algumas dentro da região RBD, aumentando a afinidade de ligação do vírus ao receptor ACE-2 das células hospedeiras (Chaillon and Smith, 2021; Davies et al., 2021; Starr et al., 2020). Em dezembro de 2020, pesquisadores da África do Sul relataram a linhagem SARS-CoV-2 B.1.351 (também conhecida como 501Y.V2), que foi denominada variante beta pela OMS. Em pouco tempo, a VOC Beta também foi detectada

em outros países, com provável conexão com viajantes da África do Sul. Beta inclui nove mutações na proteína S, das quais três estão localizadas na região RBD, relacionadas ainda mais ao aumento da afinidade de ligação ao ACE-2 humano. Contudo, as mutações na variante beta têm pouco ou nenhum efeito sobre o desempenho dos ensaios de RT-PCR (Arena et al., 2021; Ramanathan et al., 2021; Tang et al., 2021; Tegally et al., 2021). A variante Gamma surgiu no Brasil, provavelmente em novembro de 2020, mas foi relatada pela primeira vez em janeiro de 2021, em viajantes japoneses que retornavam do estado do Amazonas. Segundo estudos sorológicos, no estado já ocorria uma possível imunidade de rebanho em meados de 2020, contudo, em dezembro os casos começaram a crescer exponencialmente, marcando a segunda onda da epidemia. Gamma apresenta 10 mutações na proteína S e 3 na região RBD, que propiciam o aumento de afinidade pelo receptor ACE-2, evasão de anticorpos, infecções com cargas virais dez vezes mais altas, chances aumentadas para hospitalização e admissão na UTI (Buss et al., 2021; Funk et al., 2021; Naveca et al., 2021).

As VOCs Delta e Omicron representam maior impacto sobre a pandemia de SARS-CoV-2, devido a presença de 8 e 32 mutações na proteína *spike* do coronavírus, respectivamente (Chen et al., 2022; Tian et al., 2021). A variante Delta foi relatada pela primeira vez em março de 2021, na Índia, e suas mutações contribuem para estabilização da interação entre a proteína S e o receptor ACE-2 da célula hospedeira, aumentando a infectividade e a transmissibilidade. Além disso, Delta apresenta menor período de incubação, maior carga viral, maior índice de hospitalizações, maiores chances de necessidade de uso de oxigênio e aumento da mortalidade (Chen et al., 2020; Deng et al., 2021; Ong et al., 2021; Teng et al., 2021; Tian et al., 2021). A variante Omicron foi relatada pela primeira vez em novembro de 2021. Das 32 mutações na proteína S, 15 estão na região RBD. Esse alto número de mudanças presentes na VOC Omicron cobrem todas as mutações-chave das VOCs anteriores, podendo levar ao escape da imunidade induzida por infecção prévia ou vacinação, e causar altos índices de infecção ou reinfeção com cepas virais mutantes (Zhang et al., 2022). Até o momento, aparenta causar uma infecção mais leve, focada no trato respiratório superior (Chen et al., 2022; World Health Organization, 2022).

Um tratamento para COVID-19 vem sendo investigado desde o início da pandemia e a FDA (*Food and Drug Administration*) já concedeu autorização para os que podem efetivamente reduzir as chances de uma pessoa ser hospitalizada ou morrer da doença (Tabela 2). Os medicamentos devem ser prescritos por um profissional de saúde e iniciados o mais rápido possível após o diagnóstico para serem eficazes.

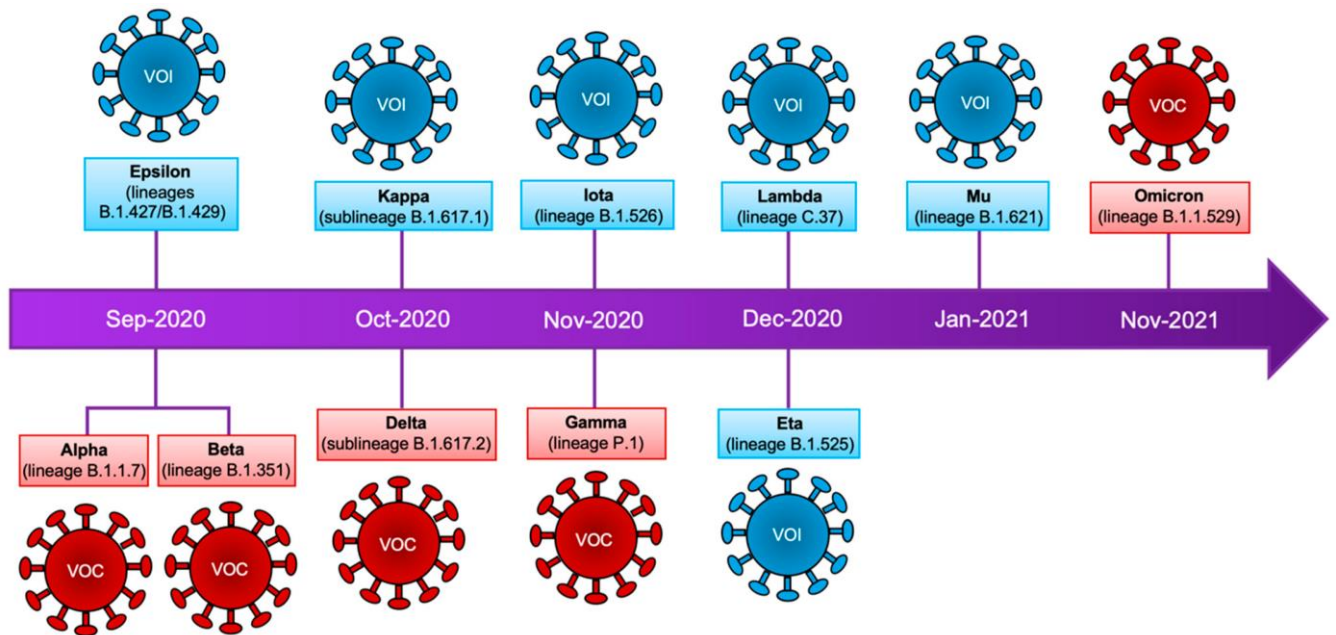


Figura 4: Linha do tempo que resume o surgimento das variantes do SARS-CoV-2. A classificação de acordo com a OMS é mostrada, assim como as linhagens do perfil mutagênico. Fonte: 10.3390/v14040653 (Flores-Vega et al., 2022).

Tabela 2: Medicamentos autorizados pela FDA para tratamento de COVID-19.

Medicamento	Grupo	Alvo	Administração
Nirmatrelvir com Ritonavi	Antiviral	Adultos; crianças com 12 anos ou mais.	Tomado em casa por via oral.
Remdesivir	Antiviral	Adultos e crianças.	Infusões intravenosas (IV) em uma unidade de saúde por 3 dias consecutivos.
Bebtelovimabe	Monoclonal	Adultos; crianças com 12 anos ou mais.	Injeção IV única.
Molnupiravir	Antiviral	Adultos.	Tomado em casa por via oral.

Tabela 2: Os medicamentos devem ser administrados o quanto antes, nos primeiros 5 dias de sintomas. O Molnupiravir também foi autorizado pela Anvisa para uso no Brasil. Fontes: *Centers for Disease Control and Prevention* (08/2022); Ministério da Saúde (gov.br) (05/2022).

Essa rápida dispersão, diversidade genética e evolução viral do SARS-CoV-2 ocasionou o surgimento de resultados falsos negativos nos testes de PCR (Kucirka et al., 2020). Isto começou a acontecer porque, com a necessidade de detectar rapidamente os casos positivos no

início da pandemia, foi necessário desenvolver urgentemente testes de PCR, visando isolamento dos infectados e fornecimento de vigilância e assistência médica (Gand et al., 2020). O genoma completo do vírus foi rapidamente sequenciado e, a partir dele, os *primers* de detecção por RT-qPCR foram projetados e recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em janeiro de 2020, nos genes da região de leitura aberta 1 (ORF1), RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), nucleocapsídeo (N) e na proteína spike (S) (World Health Organization, 2020b). Essa situação pandêmica emergencial e o baixo número de genomas completos sequenciados disponíveis àquela época, impediram uma análise exaustiva, que permitiria localizar as regiões mais conservadas e ideais para o projeto de *primers* e sondas (Gand et al., 2020). Conforme mais genomas completos de SARS-CoV-2 foram sendo depositados nas plataformas online NCBI¹ e GISAID² ao longo do ano de 2020, iniciou-se, então, um monitoramento ativo dos *primers* de PCR por pesquisadores.

O resultado das análises demonstrou que alguns *primers* e sondas já apresentavam *mismatches* ou regiões com alto risco de substituição de nucleotídeos. Dois estudos pontuaram *mismatches* em oligonucleotídeos direcionados aos genes RdRP e N (Álvarez-Díaz et al., 2020; Kuchinski et al., 2020). Outro estudo, realizado em larga escala, demonstrou *mismatches* em ensaios desenhados nos genes RdRp, N e E em 100% dos genomas analisados (Gand et al., 2020). Um estudo indiano observou que um dos oligonucleotídeos direcionados ao gene ORF1ab não apresentou nenhuma correspondência exata com os genomas SARS-CoV-2 indianos usados no estudo (Mani et al., 2021). Outro relato inclui um total de 11.627 genomas apresentando mutações únicas que afetam o emparelhamento de todos os ensaios de PCR públicos testados. Variações em 8.773 desses genomas foram consideradas de alto risco, enquanto 2.854 genomas apresentaram mutações simples de baixa frequência (Peñarrubia et al., 2020). Um estudo realizado no Nepal relatou mutações nos locais de ligação da sonda que podem afetar a eficiência da PCR, resultando em falsos negativos (Rana and Pokhrel, 2020). Um estudo realizado no Brasil mostrou que a maioria dos ensaios diagnósticos recomendados pela OMS possui incompatibilidade com as sequências brasileiras de SARS-CoV-2, principalmente os direcionados ao gene da proteína N (Santos et al., 2020). Alguns conjuntos de *primer* e sonda que apresentam *mismatches* com genomas SARS-CoV-2 possuem

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

² <https://www.gisaid.org/>.

reatividade cruzada, hibridizando em SARS-CoV-1 e também em vírus não-SARS (Miranda and Weber, 2021).

Muitas vacinas foram desenvolvidas para conter a pandemia de COVID-19 (World Health Organization, 2021b) e o Brasil apresenta 79,3% da população imunizada com duas doses. Com o surgimento da pandemia de COVID-19, são agora conhecidas seis cepas de coronavírus que infectam humanos e podem causar doenças respiratórias, dentre elas: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 e HKU1, coronavírus que, em geral, causam apenas doença respiratória superior leve com raras infecções graves; SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 que podem infectar o trato respiratório inferior e desencadear infecção grave em humanos (Hasöksüz et al., 2020). É de suma importância que o conhecimento sobre os vírus emergentes seja disseminado através da educação, assim como a importância de eliminar vetores, sustentar o habitat da vida selvagem e reduzir a mudança climática são medidas que podem ajudar na prevenção da introdução de vírus perigosos nas populações humanas (Dennehy, 2017).

2.4. Parvovírus canino tipo 2 (CPV-2)

Variantes do *Carnivore protoparvovirus 1* (CP1, anteriormente chamado de *Feline panleukopenia virus*), como o parvovírus canino (CPV-2) e o parvovírus felino (FPV) são patógenos multihospedeiros significativos e emergentes de carnívoros domésticos e selvagens (Shetty et al., 2020). A família *Parvoviridae* é composta de duas subfamílias, *Parvovirinae* e *Densovirinae*, que infectam vertebrados e insetos, respectivamente. Atualmente, o parvovírus canino tipo 2 está incluído na subfamília *Parvovirinae*, assim como os *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* e *Bocavirus*. O CPV-2 não se relaciona com vírus do minuto canino (CnMV), nem geneticamente e nem antigenicamente, visto que o CnMV é responsável pela morte neonatal em cães e agora está incluído no gênero *Bocavirus* (Decaro and Buonavoglia, 2012; Quinn et al., 2018).

O CPV-2 surgiu no final da década de 1970 como variante do vírus conhecido na época como panleucopenia felina (FPV), provavelmente pela adaptação a um novo hospedeiro através de carnívoros selvagens, alojados juntos em fazendas (Truyen, 2006). Há pelo menos seis mutações que distinguem o CPV-2 do FPV e todas estão relacionadas à alteração de aminoácidos (Decaro and Buonavoglia, 2012). O CPV-2 tem um genoma de DNA linear de

aproximadamente 25 nm, de fita simples e de sentido negativo, com cerca de 5200 nucleotídeos. Dois principais quadros de leitura aberta (ORFs) estão presentes no vírus, sendo um deles responsável pela codificação das proteínas não estruturais NS1 e NS2 e outras duas proteínas estruturais VP1 e VP2. A proteína VP2 pode ser clivada por proteases do hospedeiro, produzindo outra proteína estrutural chamada VP3 (Miranda and Thompson, 2016).

A emergência do CPV-2 deu-se provavelmente pela aquisição da capacidade de ligação ao receptor da transferrina canina, expresso em alta densidade em células em divisão, o que explica a necessidade do vírus por tecidos mitoticamente ativos (Truyen, 2006). A via de entrada do CPV-2 é oral-fecal, o período de incubação varia de 3 a 7 dias e os melhores alvos para replicação viral são as criptas intestinais e os órgãos linfoides, mas o CPV-2 pode se espalhar para todos os tecidos, inclusive o cérebro (Decaro et al., 2009a; Decaro and Buonavoglia, 2012; Elia et al., 2007). Após essa etapa, o vírus é disseminado por leucócitos infectados para o epitélio germinativo das criptas do intestino delgado, causando diarreia e linfopenia aguda (Pollock, 1982). Outros sintomas incluem anorexia, depressão, vômitos e diarreia mucoide ou sanguinolenta, frequentemente desidratação e febre. As taxas de mortalidade em filhotes podem ser de até 70% e estão comumente relacionadas a presença de lesões macroscópicas indicativas de enterite hemorrágica do intestino delgado (Decaro and Buonavoglia, 2012).

Na década de 70, o CPV-2 causou uma doença pandêmica, contudo, em um curto período de 2-3 anos, ele foi substituído pela primeira variante antigênica, CPV-2a, indicando uma forte vantagem epidemiológica sobre o vírus original (Parrish, 1999; Parrish et al., 1988), como por exemplo, a recuperação da capacidade de infectar gatos (Truyen et al., 1996). O CPV-2a passou por uma maior evolução, diferindo de CPV-2 em três substituições principais de aminoácidos no gene VP2 (M87L, A300G e D305Y) (Parrish et al., 1991), o que foi suficiente para que se tornasse a nova linhagem dominante, com mutações capazes de alterar as propriedades antigênicas do capsídeo e atingirem altas frequências em populações virais (Maya et al., 2013). Em 1984, nos EUA, foi detectada uma segunda variante antigênica, o CPV-2b, com duas alterações adicionais de aminoácidos N426D e I555V (Parrish et al., 1991), e nos anos 2000 um terceira, na Itália, o CPV-2c (Buonavoglia et al., 2001), que mostrou a substituição VP2 D426E (Decaro et al., 2009b; Vito et al., 2004). A variante CPV-2b difere de -2a em dois aminoácidos e de -2c em um (Figura 5). Embora nem todos os cientistas estejam de acordo com a nomenclatura do vírus, a referência ao CPV-2a, -2b e -2c é prevalente na literatura (Miranda and Thompson, 2016).

O tratamento da parvovirose canina se dá principalmente através do alívio dos sintomas, por infusão, antibióticos e antieméticos, e ainda é a base mais importante para a recuperação dos cães. Além disso, a nutrição enteral, realizada o mais cedo possível, favorece o processo de cura. Os antivirais são utilizados com baixa frequência (Gerlach et al., 2020). Já no caso da profilaxia, a medida mais eficaz para controlar a disseminação do CPV-2 é a vacinação, considerada essencial pelo Grupo de Diretrizes de Vacinação da Associação Mundial de Veterinária de Pequenos Animais (WSAVA – sigla em inglês) e a Associação Americana de Hospitais Animais (AAHA) (Decaro et al., 2020), devido a proteção sobre o agravamento da parvovirose canina e potencial óbito (Day et al., 2016). No entanto, a infecção por CPV continua representando uma das infecções mais frequentes e causa de morte em cães juvenis, inclusive em países desenvolvidos, apesar do incentivo e programação de vacinação adotados em todo o mundo (Decaro and Buonavoglia, 2012). Uma pesquisa em hospitais veterinários na Austrália estimou que a infecção por CPV entre cães de propriedade e alojados em abrigos é de 4,12 casos por 1.000 cães (Kelman et al., 2019).

O diagnóstico de CPV-2 apenas pelos sinais clínicos é difícil, já que muitas doenças podem resultar em diarreia em cães, como as causadas por coronavírus, adenovírus, rotavírus, norovírus (Decaro and Buonavoglia, 2012). Por isso, é importante diagnosticar com precisão a presença do CPV-2 como agente causador do sintoma. Os testes de antígeno são os mais utilizados a campo, pela rapidez e especificidade no resultado, embora a sensibilidade seja bem menor do que os testes moleculares (Schmitz et al., 2009). Muitos testes de diagnóstico por PCR são descritos na literatura, alguns detectam todos os tipos, outros diferenciam as variantes antigênicas e outros, ainda, diferem cepas vacinais de cepas de campo (Decaro et al., 2006, 2005; Kaur et al., 2016; Streck et al., 2013; Sun et al., 2018; Wang et al., 2020; Wilkes et al., 2015).

Não há estudos exclusivos de investigação de *mismatches primer*-alvo no diagnóstico molecular de CPV-2, por isso é importante que a vigilância genômica seja realizada rotineiramente, pois sua presença, principalmente quando na região de ligação da sonda, pode impedir a hibridização correta, como já relatado em alguns estudos (Decaro et al., 2009b; Martella et al., 2006; Pereira et al., 2000). Portanto, é imprescindível atualizar os métodos de tipagem de CPV baseados em SNPs, pois mutações adicionais podem dificultar a caracterização correta da cepa ou trazer resultados falso negativos. É importante que continuemos usando ferramentas moleculares de diagnóstico, porém é necessário visar regiões mais conservadas dos patógenos (Decaro and Buonavoglia, 2012).

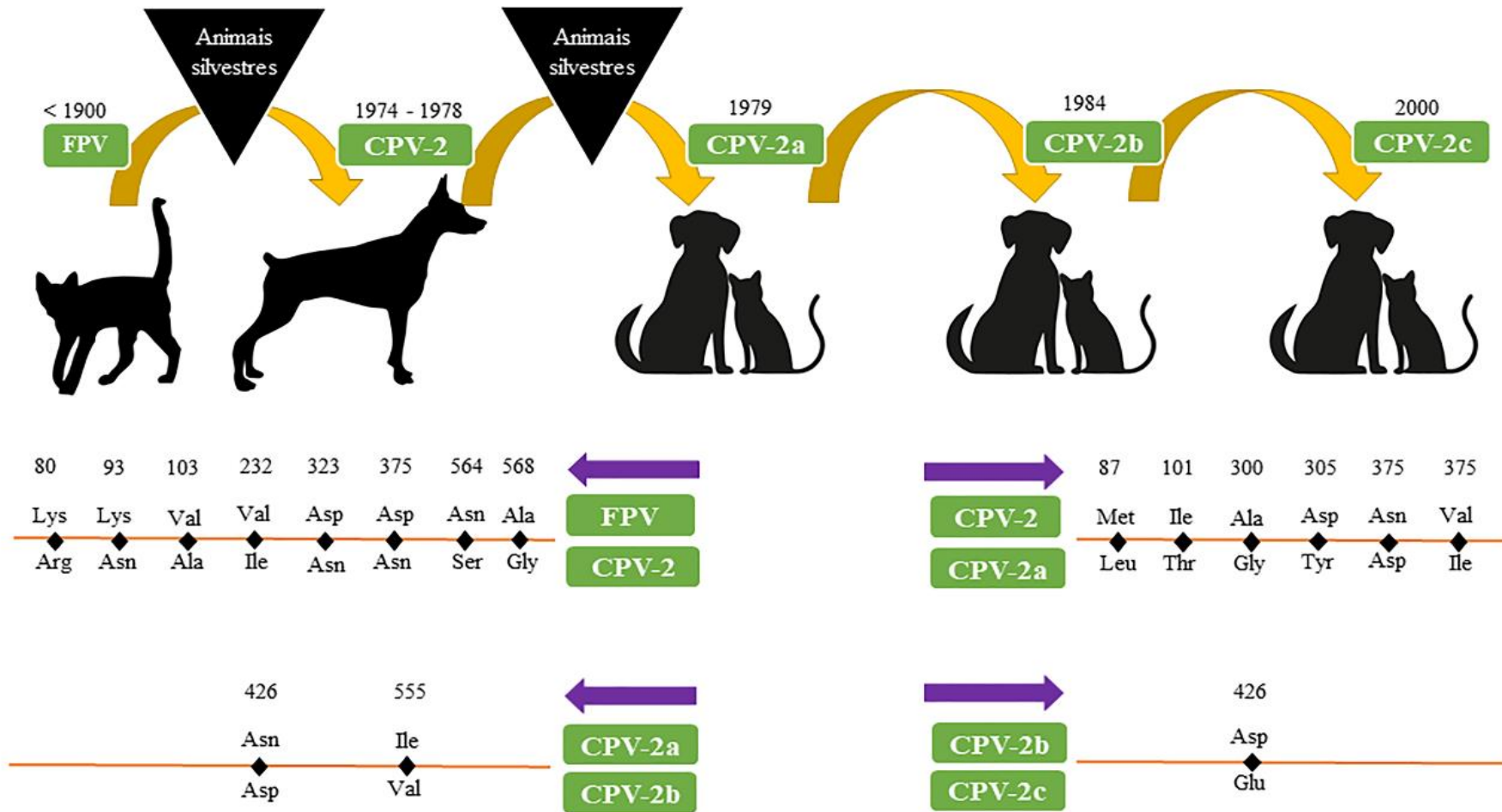


Figura 5: Processos evolutivos do CPV-2. As setas em roxo indicam a posição da substituição do aminoácido na proteína VP2. Adaptado de DOI: 10.1099/jgv.0.000540.

3. Objetivo geral

Avaliar *in silico* os *primers* e sondas utilizados na detecção de SARS-CoV-2 e os utilizados na detecção de CPV-2.

3.1. Objetivos específicos

- Analisar, separadamente, se os *primers* e sondas apresentam *mismatches* com o genoma dos vírus e onde eles estão posicionados.
- Considerar possíveis correções nos *primers* de SARS-CoV-2 que apresentem *mismatches*.
- Estimar a diversidade das mutações de SARS-CoV-2 na região de *amplicon*.
- Avaliar *in silico* os *primers* de diferenciação de cepas vacinais e de campo para CPV-2.

4. Resultados

CAPÍTULO I: Manuscrito enviado para a revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, sob título “*In silico* analysis of the polymerase chain reaction primers and probes used to detect circulating variants of SARS-CoV-2 in Brazil”.

***In silico* analysis of the polymerase chain reaction primers and probes to detect circulating variants of SARS-CoV-2 in Brazil**

Jéssica Gomes Maciel¹, Diezza Biondo¹, Diéssy Kipper¹, Vagner Ricardo Lunge¹, André Felipe Streck¹

¹ Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

*Author for correspondence: Vagner Ricardo Lunge

Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária - UCS

Caxias do Sul – RS – Brazil

E-mail:

Abstract

SARS-CoV-2 are routinely detected by different molecular biology assays, highlighting the polymerase chain reaction (PCR), worldwide. Primers and probes sequences of the PCR assays have been designed according to genome sequences of some specific SARS-CoV-2 lineages, many times not including the currently circulating variants. The present study aimed to perform an *in silico* analysis of these PCR primers/probes and their specificities to detect SARS-CoV-2 Gamma, Delta, and Omicron variants of concern (VOCs) in Brazil. Thirty primers and probes sets included in twelve recommended PCR assays were evaluated in this study. SCREENED v1.0 software was used for the *in silico* analysis of the specific target regions in a total of 3123 SARS-CoV-2 genomes, including the main circulating VOCs (Gamma, Delta and Omicron) detected in Brazil. All these genome sequences were downloaded from the GISAID. Results showed that although most assays continue to detect positive cases, some mismatches can already result in false negatives or viral quantification problems. In conclusion, viral mutations in the most disseminating variants can be reducing the performance of the PCR assays for SARS-CoV-2 detection. Continuous viral genomic surveillance is essential to revise and update the used PCR assays.

Keywords: SARS-CoV-2, Gamma, Delta, Omicron, *in silico* analysis, mismatches.

Introduction

The coronavirus disease-2019 (COVID-19) pandemic is caused by SARS-CoV-2 and it is hugely impacting public health, the economy and the entire society worldwide (V'kovski et al., 2021; Zhu et al., 2020). In Brazil, COVID-19 was declared a national public health emergency on February 3, 2020. SARS-CoV-2 is a small positive-sense enveloped RNA virus that belongs to the genus *Betacoronavirus*, family *Coronaviridae* (Phan, 2020; V'kovski et al., 2021). The complete genome has 12 open reading frames (ORFs) encoding 27 proteins. ORF1ab codes for 12 non-structural proteins, including the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), the helicase (Hel) and one exonuclease (nsp14, non-structural protein 14). The remaining ORFs code for the four structural proteins: Envelope (E), Membrane (M), Nucleocapsid (N) and Spike (S) (Chan et al., 2020a; Rahimi et al., 2021; Wu et al., 2020).

In mid-March, measures of travel restrictions and social distancing reduced SARS-CoV-2 dissemination and prevented the origin of new lineages/variants in the different regions for some months (Wolf et al., 2021). However, it has not prevent a second dissemination wave in the end of 2020 and beginning of 2021, initially in Manaus city, one of the most populated cities of the North region and located in the Brazilian Amazon (Buss et al., 2021; de Souza et al., 2021). This resulted in the emergence of the variant of concern (VOC) P.1 or Gamma (McCormick et al., 2021). A few months later, all Brazilian states and neighboring countries experienced a problem situation in health services because of the wide spread of SARS-CoV-2 VOC Gamma (Ranzani et al., 2021).

In December 2020, in India, the variant B.1.617.2 was identified for the first time, later classified as Delta (ECDC- European Center for Disease Prevention and Control., 2021). The VOC Delta was detected in Brazil in June 2021 and became dominant in the country months later (Lamarca et al., 2022; Ministério da Saúde, 2021a). On 24 November 2021, South Africa

notified the WHO of the first detection of the Omicron variant (B.1.1.529) in Botswana (WHO, 2021b). In Brazil, the first cases were confirmed in December 2021. From 01/2021 to 01/2022, 56,076 COVID-19 cases by variants of concern (VOC) were observed in the 27 Brazilian states: 30,626 (62.74%) cases of VOC Delta in 26 states; 24,447 (50.08%) of the VOC Gamma distributed in all states; 547 (1.12%) from VOC Omicron in 11 states (Ministério da Saúde, 2022).

SARS-CoV-2 VOC Gamma has several nucleotide mutations that resulted in approximately 17 main amino acids alterations in important structural proteins and enzymes, including 10 in S (three in the receptor binding domain – RBD) (Faria et al., 2021; Naveca et al., 2021; Wolf et al., 2021). Delta has six mutations and two deletions in S, some of these on RBD (Shiehzadegan et al., 2021) and is twice as transmissible as the original alpha strain (B.1.1.7), which means a 40-60% increase in transmissibility (Callaway, 2021; CDC, 2022; Hagen, 2021). Omicron has 30 mutations in S, in addition to several other amino acid substitutions in structural and non-structural proteins. More than 60 substitutions/deletions/insertions have been identified (GISAID, 2021), which makes it a variant that contains the highest number of mutation sites of all SARS-CoV-2 variants defined so far (He et al., 2021).

Polymerase chain reaction (PCR) assay have been largely used to detect and quantify SARS-CoV-2 since the first spreading in December 2019. Most primers and probes of the currently used PCR assays were designed based on the original SARS-CoV-2 genomes sequenced in the beginning of the pandemic and they have been recommended by the World Health Organization (WHO) (Gand et al., 2020; Kucirka et al., 2020; World Health Organization, 2020b). However, the high and fast SARS-CoV-2 spreading worldwide resulted in many lineages and variants (highlighting the VOCs Gamma, Delta and Omicron) which have

important modifications in the genomic nucleotide sequences, including in the target regions of the PCR assays. The present study aimed to perform a large-scale *in silico* analysis of the PCR primers and probes currently used to detect SARS-CoV-2 VOCs Gamma, Delta and Omicron in Brazil.

Methods

1.1 Primers/probes sets and WGS Data

Twelve PCR sets including a total of 30 separate PCR assays with different primers and probes were selected for analysis (Table 1). These methodologies have been used worldwide in the detection of SARS-CoV-2, some of them are recommended by the WHO (China CDC, Charité Hospital, Institut Pasteur, US CDC, National Institut of Infectious Disease, Faculty of Medicine Hong Kong, National Institut of Health) and others were developed by different research groups and companies (Aldrich, 2020; Chan et al., 2020b; Huang et al., 2020; Lu et al., 2020; Won et al., 2020; World Health Organization, 2020b). Importantly, some PCR assays (such as CoremCharite_E and Pasteur_E_Sarbeco) use the same primers and probe sets for the detection of the E gene (Gand et al., 2020).

A total of 3123 genomes SARS-CoV-2 (1714 VOC Gamma, 1298 VOC Delta and 111 VOC Omicron) (Supplementary file S1-S3) detected in Brazil were downloaded from the Global Initiative on Sharing All Influenza Data-EpiCoV (GISAID) database (<https://www.epicov.org>, GISAID, Munich, Germany) using the settings “complete genomes”, “high coverage genomes” and “only entries with complete collection date”.

Table 1: Detection methods used in the study.

Assay / Target	Technology	Developer	Clusters (n)		
			γ	δ	\mathbf{o}
ChinaCDC_ORF1ab	TaqMan	China CDC, China	10	11	1
ChinaCDC_N			16	9	1
CoremCharite_RdRp_P2 ²		Charité, Germany	3	3	1
CoremCharite_RdRp_P1 ²	TaqMan		3	3	1
CoremCharite_E ¹			8	5	1
CoremCharite_N			20	17	1
Pasteur_RdRp_IP2		Institut Pasteur, Paris, France	15	12	1
Pasteur_RdRp_IP4	TaqMan		11	6	2
Pasteur_E_Sarbeco ¹			8	5	1
USCDC_N1		US CDC, USA	12	17	1
USCDC_N2	TaqMan		11	12	1
USCDC_N3			11	14	1
Japan_N	TaqMan	National Institute of Infectious Diseases, Japan	18	19	1
HKFacMed_ORF1b_nsp14	TaqMan	Faculty of Medicine Hong Kong	11	6	1
HKFacMed_N			14	18	1
Thai_N	TaqMan	National Institute of Health, Thailand	4	4	2
HKUniv_RdRp_Hel		HKU, Hong Kong SAR	10	8	1
HKUniv_S	TaqMan		8	15	1
HKUniv_N			11	9	3
RoujianLu_ORF1a	TaqMan	(Lu et al., 2020)	10	12	2
Won_RdRP		(Won et al., 2020)	7	5	1
Won_S			6	6	2
Won_E	SYBR green		9	3	1
Won_N			19	12	1
SigmAldr_N1	SYBR green	Sigma-Aldrich	19	7	2
SigmAldr_N2			17	7	2
SigmAldr_ORF1ab3 ³		Sigma-Aldrich	18	16	5
SigmAldr_ORF1ab4 ³			19	18	5
SigmAldr_S5 ⁴	TaqMan		21	24	2
SigmAldr_S6 ⁴			28	30	5
Huang_E9	TaqMan	(Huang et al., 2020)	6	5	1

Table 1: The target genes for each method are described in the second column. ¹: Both assays CoremCharite_E and Pasteur_E_Sarbeco use the same primers and probe sets for the detection of the E gene, therefore, they are counted as a single test in results. ²: CoremCharite_RdRp_P2 and CoremCharite_RdRp_P1 present the same primers and different probes. ³: Both assays use the same probe and different primers. ⁴: Both assays use the same probe and different primers.

1.2 Settings and Input Files Used in SCREENED

SCREENED (polymerase Chain Reaction Evaluation through large-scale miNing of gEnomic Data: <https://github.com/BioinformaticsPlatformWIV-ISP/SCREENED>) v1.0 was carried out to analyze all PCR primers and probes of the 30 PCR assays comparing them with the SARS-CoV-2 VOCs genomes (Vanneste et al., 2018). A fasta document previously published with main SARS-CoV-2 PCR primers and probes as well as amplicons sequences was used in the analysis (Gand et al., 2020) (Supplementary file S4). Each VOC was analyzed individually, which means that SCREENED first evaluated the 1714 genomes from Gamma, then the 1298 from Delta and, finally, the 111 from Omicron. Due to this, the results will be reported by each VOC.

Briefly, all searched primers and probe sets from each PCR assay were considered as resulting in a theoretical positive PCR signal when (i) a maximum 10% mismatches were present in the annealing site of the screened genome for the primers and probe (irrespective of the alignment length); (ii) a minimum alignment length of 90% was observed in the annealing site of the screened genome for the primers and probe (irrespective of the total number of mismatches); and (iii) no single mismatch was present in the last five nucleotides at the 3' end for the forward and reverse primer (Gand et al., 2020; Kwok et al., 1990; Whiley and Sloots, 2005). For all PCR assays using SYBR Green technology, the above procedure was adapted using a 20 polynucleotide with Adenines (A) sequence as the probe sequence in SCREENED for each method and therefore were disregarded in the analysis of the results. The software was also used to perform clustering of the genomic sequences that are amplified during the PCR test. We used the method “exhaustive” for this analysis. This is useful to understand the diversity among amplicons for each PCR assay. Basically, the software compares the amplicons of each test in the analyzed genomes, grouping those that are identical in clusters. In other words, if three genomes have the same amplicon from the first assay analyzed, they will be in

cluster 0. If another five genomes have the same nucleotide change in the amplicon, also for the first assay analyzed, then they will be in cluster 1, and so on.

Results

1.1 PCRs amplicons diversity in the SARS-CoV-2 VOCs genomes

All SARS-CoV-2 VOCs genomes presented a high identity in the whole genomic sequences. For all PCR primers and probes sets evaluated, more than 88% had identical nucleotide sequences to each other in the corresponding regions. For VOC Gamma, VOC Delta and VOC Omicron, 25, 24 and 25 assays, respectively, presented more than 97% identical sequences in the same cluster.

Furthermore, of the five remaining procedures in VOC Gamma, the CoremCharite_N, Pasteur_RdRp_IP2, and Won_N presented $\pm 96\%$ of the amplicons in one cluster and $\pm 4\%$ in another 19, 14, and 18 clusters sets, respectively; SigmAldr_N1 presented 95.6% of the amplicons clustered and 4.4% divided into 18 other clusters; HKUniv_S presented 89.3% of the amplicons in one cluster, 9.8% in a second cluster and 0.9% in another six clusters (Table 1).

For VOC Delta, Pasteur_RdRp_IP4 presented 96.3% of the amplicons in one cluster and 3.7% in the other five clusters; USCDC_N1 presented 88% of the amplicons in one cluster and 12% in another 16 clusters; SigmAldr_ORF1ab3 presented 95.3% in one cluster and 4.7% in another 15 clusters; SigmAldr_ORF1ab4 presented 94.9% of the amplicons in one cluster and 5.1% in another 17 clusters; SigmAldr_S5 presented 3.9% in a cluster, 92.6% in a second cluster and 3.4% in another 22 clusters; SigmAldr_S6 presented 91% of the amplicons in one cluster and 9% in another 29 clusters (Table 1). In VOC Omicron, the procedures Thai_N presented 60.3% of the amplicons in one cluster and 39.7% in another cluster; HKUniv_N

presented 90.9% of the amplicons in one cluster and 9.1% in another two clusters; SigmAldr_ORF1ab3 and SigmAldr_ORF1ab4 presented 94.5% of the amplicons in one cluster and 5.5% in another four clusters; SigmAldr_S6 presented 93.6% of the amplicons in one cluster and 5.5% in another four clusters (Table 1) (Figure 1-3).

1.2 PCR primers and probes identity in the SARS-CoV-2 VOCs genomes

The inspection of the alignment of all oligonucleotide sequences with all SARS-CoV-2 VOCs genomes demonstrated most PCR assays (24: 80% in VOC Gamma; 19: 63.3% in VOC Delta; 18: 60% in VOC Omicron) do not show important mismatches in the predominant genome sequences. However, for VOC Gamma there were mismatches in primers/probes from six different PCRs: five sets (20%) presenting one mismatch and one set (3.4%) with three mismatches. The primer forward ChinaCDC_N presented a change of three nucleotides (replacement of GGG by AAC) in 1711 (99.8%; 1711/1714) genomes.

Three reverse primers showed mismatches in a large number of genomes: Japan_N showed the change G by C in 1710 (99.7%; 1710/1714); HKUniv_RdRp_Hel and Won_E showed the change G by A and T by A, respectively, in all 1714 genomes (100%; 1714/1714) (Table 2). The probes with mismatches were CoremCharite_RdRp_P1, which showed the change A/G by C and T by A in all 1714 genomes (100%; 1714/1714) and HKUni_S showed the change A by C - near the 3' region - in 1546 genomes (90.2%; 1546/1714) (Table 2).

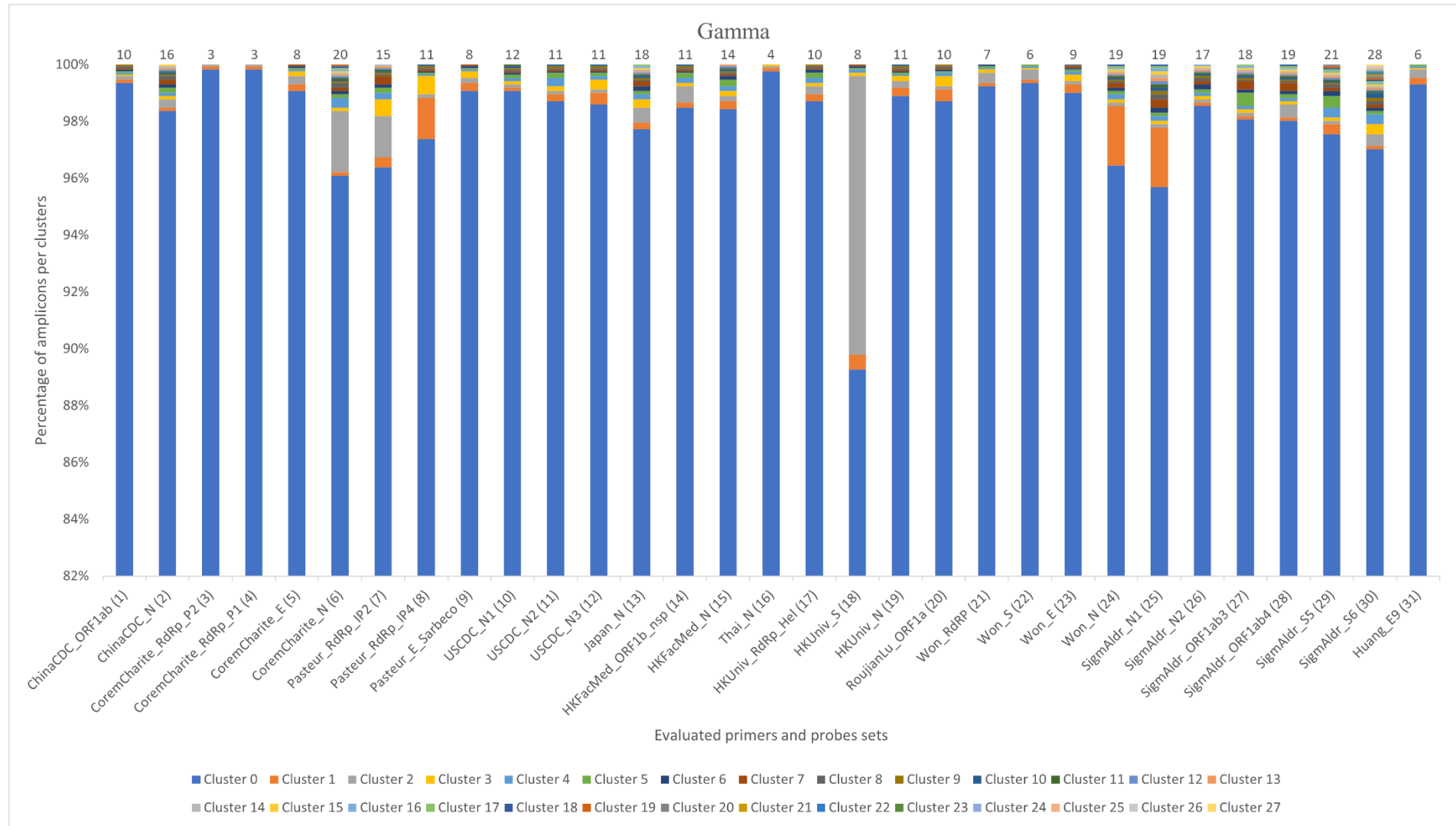


Figure 1: Diversity in the SARS-CoV-2 Gamma genomes of the target sequences amplified by the evaluated primer and probe sets. The numbers above the graph represent the number of clusters formed by each primer or probe and the colors represent the cluster number. CoremCharite_E and Pasteur_E_Sarbeco use the same primers and probe sets for the detection of the E gene.

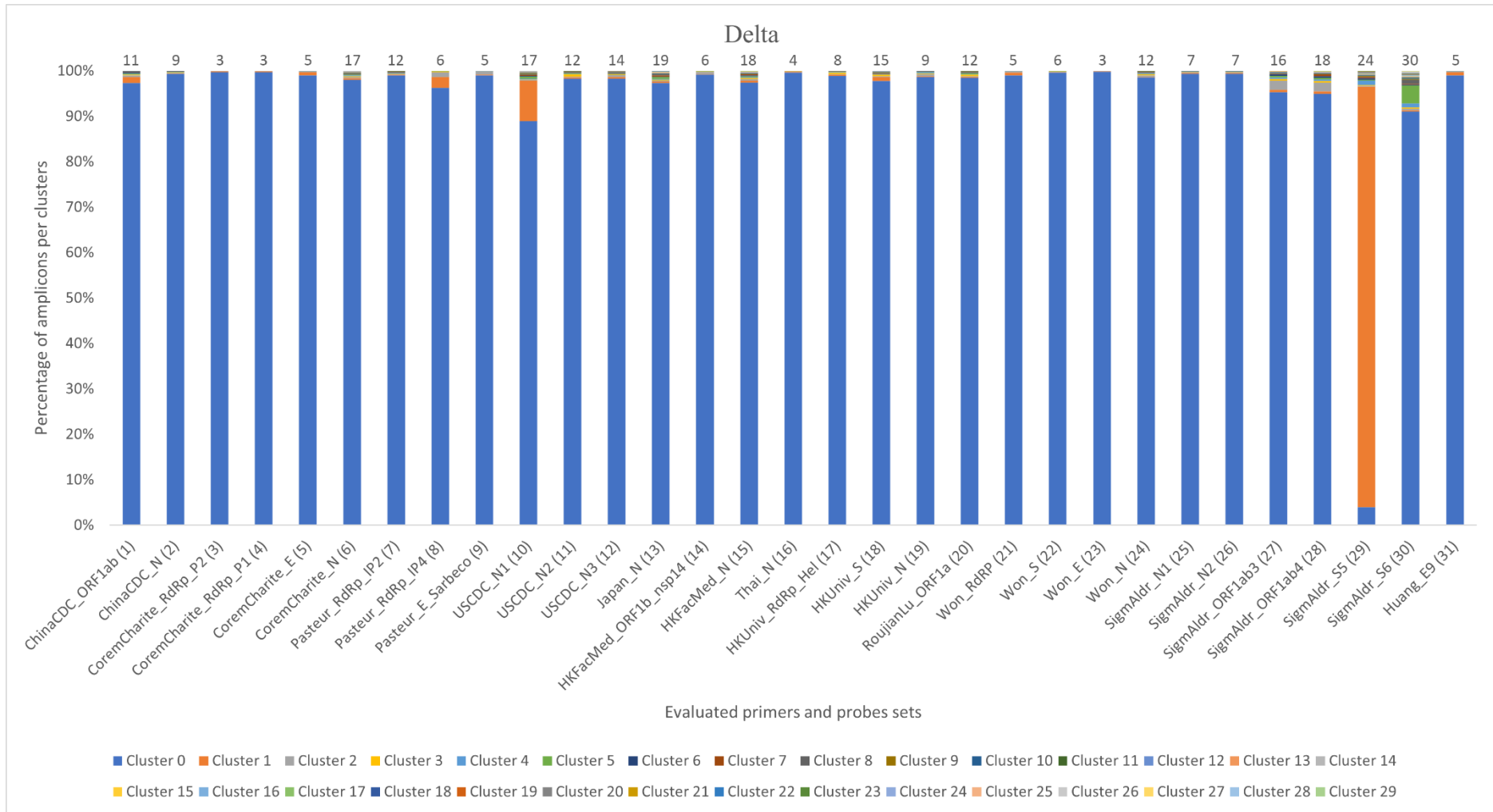


Figure 2: Diversity in the SARS-CoV-2 Delta genomes of the target sequences amplified by the evaluated primer and probe sets.

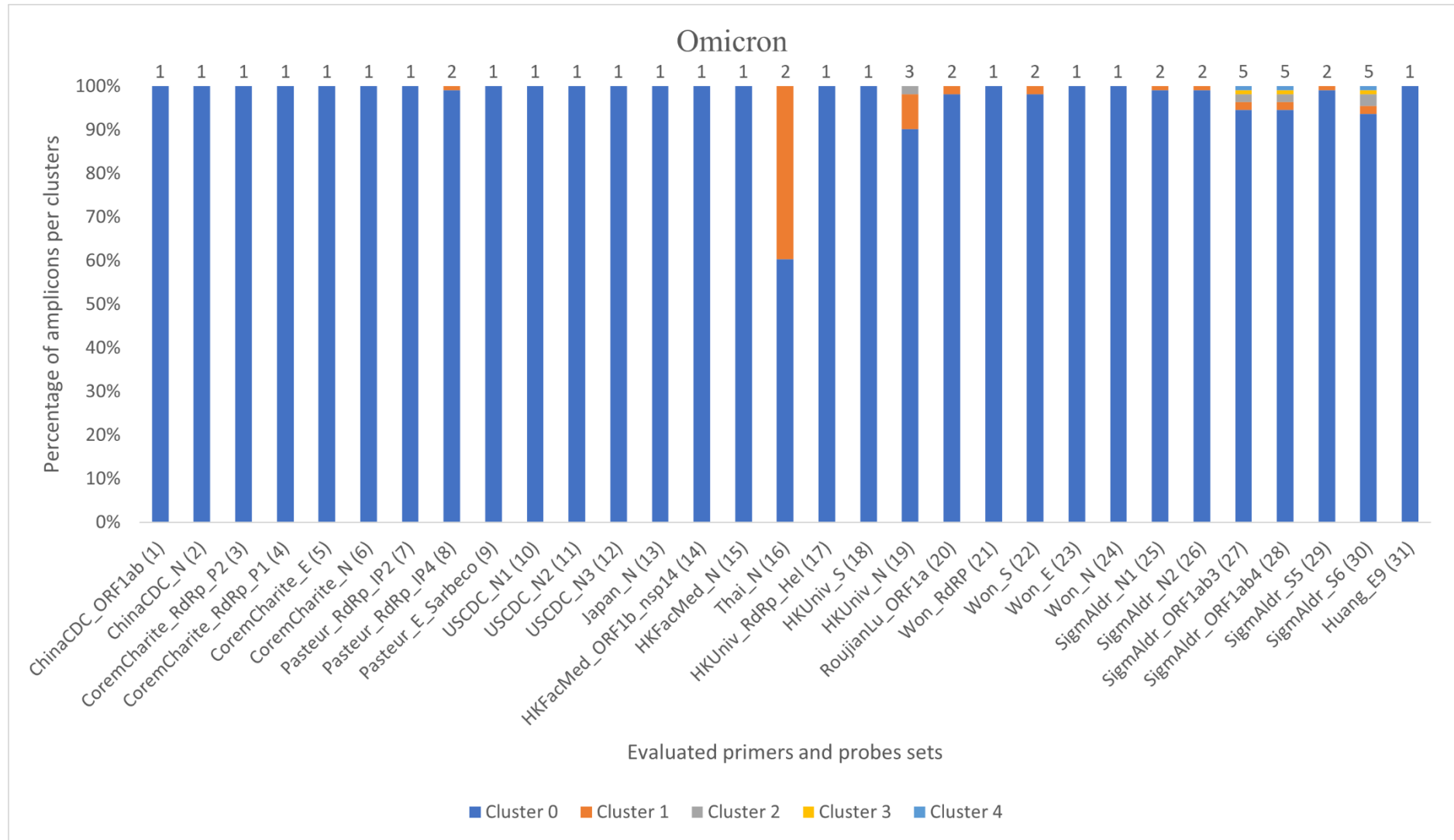


Figure 3: Diversity in the SARS-CoV-2 Omicron genomes of the target sequences amplified by the evaluated primer and probe sets.

Nine primers and three probes showed mismatches in 11 different PCR assays for SARS-CoV-2 VOC Delta: primer forward ChinaCDC_N presented a change of G by T in 1289 (99.3%; 1289/1298) genomes; CoremCharite_RdRp_P1 and CoremCharite_RdRp_P2 forward primers presented one mismatch (replacement of G by A) in all genome sequences (100%; 1298/1298) and forward primer Won_RdRp presented the change G by A in 1295 genomes (99.7%; 1295/1298). The reverse primers: Japan_N and HKUniv_RdRp_Hel showed the change G by C in 1293 genomes (99.6%; 1293/1298) and G by A in 1294 genomes (99.6%; 1294/1298), respectively; Won_E reverse primer showed the replacement of T by A in 1298 genomes (100%; 1298/1298); SigmAldr_N1 and SigmAldr_N2 showed the change C by A in 1263 (97.3%; 1263/1298) and 1259 (96.9%; 1259/1298) genomes, respectively. The probes that showed changes are: CoremCharite_RdRp_P1 presented the replacement of A/G by C and T by A in all 1298 genomes (100%; 1298/1298); the probes SigmAldr_S5 and SigmAldr_S6 are the same and presented the change C by G in 1217 genomes (93.7%; 1217/1298) (Table 2).

In SARS-CoV-2 VOC Omicron it was possible to observe four forward primers with mismatches: the primer forward ChinaCDC_N presented a change of three nucleotides (replacement of GGG by AAC) in 111 (100%; 111/111) genomes; CoremCharite_E, Pasteur_E_Sarbeco, and Won_E forward primers presented a change of one nucleotide (replacement of C by T in both primers) in also 111 (100%; 111/111) genomes. Five reverse primers showed important mismatches: Japan_N, HKUniv_RdRp_Hel, and Won_E presented a change of one nucleotide (replacement of G by C, G by A, and T by A, respectively) in 111 (100%; 111/111) genomes; reverse primer Won_S presented one change (replacement of G by T) in 109 (98.1%; 109/111) genomes; reverse primer Thai_N presented ten nucleotide changes (replacement in table 2) in 44 (39.6%/44/111) genomes. Also, five probes showed mismatches: CoremCharite_RdRp_P1, which showed the change A/G by C and T by A in all 111 genomes (100%; 111/111); USCDC_N1 and HKUniv_S probes presented only one change: C by T in

110 genomes (99%; 110/111) and G by T in 81 genomes (72.9%; 81/111), respectively; the probes SigmAldr_S5 and SigmAldr_S6 are the same and presented two nucleotide changes, T by G and C by A in 111 genomes (100%; 111/111) (Table 2).

Table 2: Representative mismatches retrieved by SCREENED.

Assay	Genomes	VOC	Mismatches / Suggestion (5' - 3')
ChinaCDC_N		Forward Original	GGG GAACTTCTCCTGCTAGAAT
	1711	SARS-CoV-2 Gamma Seq	AAC GAACTTCTCCTGCTAGAAT
	1289	SARS-CoV-2 Delta Seq	TGGG AACCTTCTCCTGCTAGAAT
	111	SARS-CoV-2 Omicron Seq	AAC GAACTTCTCCTGCTAGAAT
		Forward Reviewed	DVV GAACTTCTCCTGCTAGAAT
Japan_N		Reverse Original	TGGCA G CTGTGTAGGTCAAC
	1710	SARS-CoV-2 Gamma Seq	TGGCA C CTGTGTAGGTCAAC
	1293	SARS-CoV-2 Delta Seq	TGGCA C CTGTGTAGGTCAAC
	111	SARS-CoV-2 Omicron Seq	TGGCA C CTGTGTAGGTCAAC
		Reverse Reviewed	TGGCA S CTGTGTAGGTCAAC
HKUniv_RdRp_Hel		Reverse Original	G TGTGATGTTGAWATGACATGGTC
	1714	SARS-CoV-2 Gamma Seq	A TGTGATGTTGAWATGACATGGTC
	1294	SARS-CoV-2 Delta Seq	A TGTGATGTTGAWATGACATGGTC
	111	SARS-CoV-2 Omicron Seq	A TGTGATGTTGAWATGACATGGTC
		Reverse Reviewed	R TGTGATGTTGAWATGACATGGTC
Won_E		Reverse Original	CACACAATCGA T GCGCAGTA
	1714	SARS-CoV-2 Gamma Seq	CACACAATCGA A GCGCAGTA
	1298	SARS-CoV-2 Delta Seq	CACACAATCGA A GCGCAGTA
	111	SARS-CoV-2 Omicron Seq	CACACAATCGA A GCGCAGTA
		Reverse Reviewed	CACACAATCGA W GCGCAGTA

		Probe Original	CCAGGTGGWAC RTC ATCMGG T GATGC
	1714	SARS-CoV-2 Gamma Seq	CCAGGTGGWAC CTC ATCMGG A GATGC
CoremCharite_RdRp_P1	1298	SARS-CoV-2 Delta Seq	CCAGGTGGWAC CTC ATCMGG A GATGC
	111	SARS-CoV-2 Omicron Seq	CCAGGTGGWAC CTC ATCMGG A GATGC
		Probe Reviewed	CCAGGTGGWAC VT CATCMGG W GATGC
		Probe Original	CGCTCCAGGGCAA ACTGGAAAG
HKUniv_S	1546	SARS-CoV-2 Gamma Seq	CGCTCCAGGGCAA ACTGGAACG
	81	SARS-CoV-2 Omicron Seq	CGCTCCAGGGCAA ACTGGAAAT
		Probe Reviewed	CGCTCCAGGGCAA ACTGGAAMK
		Probe Original	AGACTAATTCTC CT CGGCGGGC ACG
	1217	SARS-CoV-2 Delta Seq	AGACTAATTCTC GT CGGCGGGC ACG
SigmAldr_S5 SigmAldr_S6	and 111	SARS-CoV-2 Omicron Seq	AGACTAA GT TCTC A TCGGCGGGC ACG
		Probe Reviewed	AGACTAA KT TCTC V TCGGCGGGC ACG
CoremCharite_RdRp_P1 and CoremCharite_RdRp_P2	1298	SARS-CoV-2 Delta Seq	GTGARATGGTCATGTGTGGC GG
		Forward Reviewed	GTGARATGGTCATGTGTGGC AG
		Forward Reviewed	GTGARATGGTCATGTGTGGC RG
Won_RdRP	1295	SARS-CoV-2 Delta Seq	CATGTGTGGC G GTTC ACTAT
		Forward Reviewed	CATGTGTGGC A GTTC ACTAT
		Forward Reviewed	CATGTGTGGC R GTTC ACTAT
SigmAldr_N1	1263	SARS-CoV-2 Delta Seq	AGCAGCATCAC C GCC ATTG
		Reverse Reviewed	AGCAGCATCAC A GCC ATTG
		Reverse Reviewed	AGCAGCATCAC M GCC ATTG
SigmAldr_N2	1259	SARS-CoV-2 Delta Seq	C GCCATTGCCAGCC ATTC
		Reverse Reviewed	C A G CCATTGCCAGCC ATTC
		Reverse Reviewed	C M GCCATTGCCAGCC ATTC

CoremCharite_E Pasteur_E_Sarbeco	and 111	Forward Original	A C AGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
		SARS-CoV-2 Omicron Seq	ATAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
		Forward Reviewed	A Y AGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
Won_E	111	Forward Original	TTCGGAAGAGACAGGTACGTT
		SARS-CoV-2 Omicron Seq	TTCGGAAGAGATAGGTACGTT
		Forward Reviewed	TTCGGAAGAGAYAGGTACGTT
Thai_N	44	Reverse Original	CCCCACT GC GTTCTCCATT
		SARS-CoV-2 Omicron Seq	CCCCACCATTCTGGT ACT
		Reverse Reviewed	NA
Won_S	109	Reverse Original	CACCTGTGCCT G TTAAACCA
		SARS-CoV-2 Omicron Seq	CACCTGTGCCT T TTAAACCA
		Reverse Reviewed	CACCTGTGCCT K TTAAACCA
USCDC_N1	110	Probe Original	AC C CCGCATTACGTTTGGTGGACC
		SARS-CoV-2 Omicron Seq	ACTCCGCATTACGTTTGGTGGACC
		Probe Reviewed	AC Y CCGCATTACGTTTGGTGGACC

Table 2: Number of mismatches investigated from a total of 1714 VOC Gamma genomes, 1298 VOC Delta genomes and 111 VOC Omicron genomes. Detected mismatches and the correction suggestion for these are indicated in bold in the sequence of forward primers, reverse primers, and probes. NA: Not applicable.

Noteworthy, the evaluation of the cluster of each assay versus the mismatches present in more than 88% of the three VOCs genomes demonstrated that the clustering in ChinaCDC_N, CoremCharite_RdRp_P1, Japan_N, HKUniv_RdRp_Hel, and Won_E occurred due to identical mismatches. For VOC Delta, privately, CoremCharite_P2, Won_RdRp, and SigmAldr_S6 are included in a clustering that occurred due to identical mismatches. For

Omicron VOC, specially, CoremCharite_E, Pasteur_E_Sarbeco, Won_S, USCDC_N1, SigmAldr_S5, and SigmAldr_S6 also are clustering due to identical mismatches. The worst clustering is in the assays HKUniv_S (Gamma), SigmAldr_S5 (Delta), and Thai_N (Omicron), which have a highly variable amplicon region. Thai_N showed 44 genomes with mismatches in Omicron VOC, which represents 39.6% of the genomes. However, in these 44 genomes, several nucleotides were substituted, so we consider it is important to highlight. Further, PCR assays with few mismatches in the annealing region were ChinaCDC_ORF1ab, CoremCharite_N, Pasteur_RdRp_IP2, USCDC_N2, USCDC_N3, HKFacMed_ORF1b_nsp14, HKFacMed_N, HKUniv_N, RoujianLu_ORF1a, Won_N, SigmAldr_ORF1ab3, SigmAldr_ORF1ab4, and Huang_E9.

1.3 Revision of the PCR assays to detect all three SARS-CoV-2 VOCs genomes

To improve the PCR assay to detect SARS-CoV-2 VOCs, all primers and probes with mismatches were reviewed and novel oligonucleotide sequences were suggested. We observed that primer Thai_N could not be corrected to detect all VOCs in this study, due to the presence of a high number of mismatches. In this case, we suggest reviewing the region for the primer target and, consequently, replacing it with a more conserved region. For the remaining primers, we suggested some corrections, replacing for degenerate nucleotides (Table 2).

Discussion

PCR is considered the gold standard assay for SARS-CoV-2 detection due to high sensitivity and specificity, and this method also enables viral detection and quantification (Corman et al., 2020; Dramé et al., 2020; D. Li et al., 2020; Simoska and Stevenson, 2019). However, a significant rate of false negative results has been reported with the assays currently performed worldwide (Gand et al., 2020; Kucirka et al., 2020). Nucleotide mismatches in the annealing region of the oligonucleotides (primers and probes) can prevent and/or delay PCR

amplification. In addition, they also can impair PCR quantification (Lefever et al., 2013; Whiley and Sloots, 2005). Thus, it is necessary that the target genomic regions are frequently reviewed as SARS-CoV-2 mutate in the worldwide spreading (Gand et al., 2020; Holland et al., 2020; Khan and Cheung, 2020; Phelan et al., 2020; Toms et al., 2020; Vogels et al., 2020).

SARS-CoV-2 VOC Gamma has been actively circulating in Brazil since November 2020 (Naveca et al., 2021). This specific VOC was identified in Brazil with active genomic surveillance (Faria et al., 2021; Lamarca et al., 2021; Martins et al., 2021; Wolf et al., 2021). Important phylogenetic differences of the original SARS-CoV-2 sequences have been observed, including from the lineage B.1.1.28 from which it originated. Some mutations of the SARS-CoV-2 VOC Gamma were generated continuously over the months until mid-2020, making it possible to accurately delineate the evolutionary phases (Gräf et al., 2021). Three important mutations are present in the RBD region, increasing the affinity for human ACE2 and also the transmissibility. This viral feature can also explain the high viral load in patients (approximately 10 times greater than other previously circulating lineages) (Faria et al., 2021; Naveca et al., 2021; Wolf et al., 2021). More than 95% of the SARS-CoV-2 infections were caused by VOC Gamma in June 2021 (Ministério da Saúde, 2021b).

SARS-CoV-2 VOC Delta has the following spike protein mutations: T19R, L452R, T478K, D614G, P681R, and D950N, with deletions at positions 157 and 158 (Shiehzegegan et al., 2021). Some of these mutations affect immune responses targeting the RBD region (452 and 478) and deletion of part of the N-terminal domain (Q. Li et al., 2020). The most significant are the spike protein mutations L452R and P681R. The spike protein RBD is mainly involved in the interaction with ACE2 in the host cell, therefore mutations at this site play a relevant role in the infectivity and transmissibility of the virus (Baral et al., 2021; Starr et al., 2021). A study suggest that the L452R mutation prevents the virus from being destroyed by CD8 T cells (Shiehzegegan et al., 2021). The P681R mutation is found in the S1-S2 region and may have

increased replication allowing greater fusion and integration of the virus into the host cell, resulting in higher viral loads and increased transmission (Johnson et al., 2020; Liu et al., 2021; Shiehzadegan et al., 2021).

SARS-CoV-2 VOC Omicron mutations consist of six substitutions and two deletions in four amino acids in ORF1a. In ORF1b are two substitutions. There is one substitution in envelope protein (E), three in membrane (M), three substitutions and three-residue deletion in nucleocapsid protein (N). More than half of the total identified Omicron mutations are accumulated in the spike protein and corresponding a total of 30 substitutions, three deletions and three amino acid insertions in N-terminal domain, 15 changes in RBD, one in spike fusion peptide and three in the hept 1 repeat of the spike (GISAID, n.d.; Gu et al., 2022; He et al., 2021).

Advances in genetic sequencing combined with bioinformatics have introduced the possibility to perform *in silico* analysis of PCR primers and probes (Holland et al., 2020; Vanneste et al., 2018). In this study, SARS-CoV-2 genomes were downloaded from the GISAID database and analyzed with the SCREENED software making it possible to quickly review and correct oligonucleotide sequences with mismatches. Other tools have already been developed to evaluate *in silico* PCR tests (Kalendar et al., 2017; Ye et al., 2012), but they are not able to assess a large number of genomes against the set of primers and probes. The method of the software used here was successful for the evaluation of the primers and probes, as previously demonstrated with Dengue, Zika, Chikungunya and SARS-CoV-2 (Broeders et al., 2020; Gand et al., 2021, 2020; Vanneste et al., 2018).

Importantly, the inclusivity results demonstrated that ChinaCDC_N forward primer presented mismatches in the first three nucleotides in Gamma and Omicron VOCs. This result agrees with other studies that performed this analysis of specificity and mismatches of

primer/probe sets with other SARS-CoV-2 lineages in Brazil and around the world (Gand et al., 2020; Khan and Cheung, 2020; Santos et al., 2020). Other previous studies evaluated the WHO recommended primers / probes demonstrating the same result for the ChinaCDC_N forward primer (Davi et al., 2021). The reverse primers Japan_N, HKUniv_RdRp_Hel, Won_E and the probe CoremCharite_RdRp_P1 also presented mismatches in SARS-CoV-2 genomes downloaded from GISAID until 2020 June, and in NCBI reference genome (accession number NC_045512), in agreement with a previous report (Gand et al., 2020). In contrast, HKUniv_S probe presented mismatches in Gamma and Omicron genomes; HKUniv_RdRp_Hel reverse primer presented mismatches in the three VOCs; the probes SigmAldr_S5 and SigmAldr_S6 presented mismatches in Delta and Omicron VOCs. It is possible to observe that the mismatches are increasing as the SARS-CoV-2 evolves, from six trials with mismatches in Gamma to 10 in Delta and 12 in Omicron. In front of that, it is necessary to correct the primers/probes to avoid PCR assays failing to detect the novel VOCs. Noteworthy, most mismatches are not in the 3' primer end and they could have a moderate effect on PCR amplification (Khan and Cheung, 2020; Lefever et al., 2013).

Thirteen assays showed the best results and the smallest number of mismatches in the annealing region (ChinaCDC_ORF1ab, CoremCharite_N, Pasteur_RdRp_IP2, USCDC_N2, USCDC_N3, HKFacMed_ORF1b_nsp14, HKFacMed_N, HKUniv_N, RoujianLu_ORF1a, Won_N, SigmAldr_ORF1ab3, SigmAldr_ORF1ab4, and Huang_E9) six are of the ORF region and six are of the N region, suggesting that these are the most appropriate regions for designing detection primers for SARS-CoV-2 because they have a low rate of change. The S region, different from previous studies (Gand et al., 2020), maybe become poor for the design of diagnostic tests, as it presented two of the three worst clusters and a high number of genomes with mismatches, which can be explained by mutations present in the spike protein of VOCs (Faria et al., 2021).

The correction of primers suggested in this study is not definitive due to the continuous dissemination of the SARS-CoV-2 and appearance of new VOCs with a high number of mutations worldwide. In this sense, this study shows the need for a regular assessment of the impact of SARS-CoV-2 evolution on the performance of PCR assays (Gand et al., 2021). Many Brazilian kits have been developed and approved by ANVISA for use in the diagnosis of SARS-CoV-2, but the sets of primers and probes used in these tests are not available, although they are likely based on already published protocols (<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/covid-19-painel-de-produtos-para-diagnostico>).

Conclusion

The high mutation rates of SARS-CoV-2 can interfere with the diagnosis and result in false negative results, so it is necessary to continuously review the methods, mainly due to the emergence of new VOCs. The world is overcoming the SARS-CoV-2 pandemic, but new mutations may occur due to the high transmissibility. It is necessary to evaluate the effectiveness of the PCR assays continuously.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES, Brazil) for their financial support. The authors are also grateful to the originating laboratories responsible for obtaining the specimens and the submitting laboratories where the genetic sequence was generated and shared via the GISAID Initiative, on which this research is based.

Support / supplementary material

Supplementary file S1 - The dataset of 1714 SARS-CoV-2 Gamma genomes downloaded from the GISAID database.

Supplementary file S2 - The dataset of 1298 SARS-CoV-2 Delta genomes downloaded from the GISAID database.

Supplementary file S3 - The dataset of 111 SARS-CoV-2 Omicron genomes downloaded from the GISAID database.

Supplementary file S5 - The primers / probes set used in the study.

CAPÍTULO II: Manuscrito que será submetido à uma revista internacional sob título “*In silico* analysis of the polymerase chain reaction primers and probes used for the detection of canine parvovirus type 2 (CPV-2)”

***In silico* analysis of the polymerase chain reaction primers and probes used for the detection of canine parvovirus type 2 (CPV-2)**

Abstract

Canine parvovirus type 2 (CPV-2) is one of the most relevant gastroenteric diseases in small animal medicine, being an extremely contagious viral disease with high mortality. Different polymerase chain reaction (PCR) assays have been described and largely used for the detection of CPV-2 in clinical samples. The present study aimed to perform an *in silico* analysis of the PCR primers/probes currently used to detect all CPV-2 strains. Seven Real-time PCR assays (Decaro_1, Decaro_2, Kaur_3, Streck_4, Sun_5, Wang_6, Wilkes_7) were selected and evaluated in this study. The program SCREENED v1.0 was used for *in silico* analysis of specific target regions in a total of 298 whole genomes (WGS) and 698 CPV-2 VP2 sequences. The results showed that most PCR assays presented a high specificity (>90% of primers with zero mismatches) to detect CPV-2 of all types, but some of them presented mismatches. The primer Decaro_2 was the only one specific for CPV-2 old type.

Key-words: *In silico* analysis, CPV-2, VP2, mismatches, primers, probes.

Introduction

Canine parvovirus type 2 (CPV-2) belongs to *Protoparvovirus* genus, *Parvoviridae* family, and is a single-stranded DNA virus that encodes two capsid proteins (VP1 and VP2) and two non-structural proteins (NS1 and NS2) (Cotmore et al., 2019; Lamm and Rezabek, 2008). CPV-2 was identified in 1978 and spread around the world (Appel et al., 1979), but evolved fast and was replaced by new antigenic variants in a few years, CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c (Buonavoglia et al., 2001; Parrish et al., 1988; Streck et al., 2013; Truyen, 2006). It is one of the most relevant gastroenteric diseases in small animal medicine, and is an extremely contagious viral disease, with high mortality. Complications, such as electrolyte disturbances and secondary infections caused by sepsis, are mainly characterized by episodes of hematochezia, vomiting, and dehydration, which can lead to death (Goddard and Leisewitz, 2010; Santana et al., 2020). Disease caused by CPV-2 occurs with high frequency and the virus remains for long periods in the environment, being considered a threat to the health of the dog population (Pinto et al., 2012; Zhao et al., 2011).

The vaccination schemes and the active virus circulation, allowed to reduce its mortality and spread due to the development of herd immunity in canines. However, the pressure of host immunity may have favored the gradual emergence of antigenic variants (Decaro and Buonavoglia, 2012; Truyen, 2006). These variants replaced the original strain of CPV-2, which no longer circulates in canid populations and is found only in the vaccine (Decaro et al., 2020, 2014; Freisl et al., 2017). The CPV-2a variant was reported in 1982 and diverged from the old type (CPV-2) virus genetically and antigenically, with distinctions in six amino acids located at residues 87, 101, 300, 305, 375, 555 of the major capsid protein (VP2) (Decaro et al., 2020; Decaro and Buonavoglia, 2012; Giraldo-Ramirez et al., 2020; Parrish, 1999). Both distinct

types, using monoclonal antibodies (MAbs), have been detected worldwide, mainly in the United States, Belgium, France, Australia, and Japan (De la Torre et al., 2018; Parrish et al., 1991, 1988). In 1984, CPV-2b was detected and showed a complementary mutation in the VP2 protein (mutation of asparagine to aspartic acid at residue aa 426) (Decaro et al., 2020; Parrish et al., 1991, 1985). A third variant, CPV-2c, was identified in Italy, in 2000, and changed an asparagine/aspartic acid to glutamic acid at residue 426 in VP2 protein (Buonavoglia et al., 2001; De la Torre et al., 2018).

As a result of the severity caused by the parvovirus, many methods have been developed to identify CPV-2 in infected dogs. A decisive diagnosis requires viral detection in feces or oropharyngeal smears (Decaro et al., 2013; Markovich et al., 2012; Mazzaferro, 2020). Generally, techniques such as ELISA or hemagglutination (HA) are the most used in clinical routine, for the fast result and easy application, but are hampered by their low sensitivity (Decaro et al., 2005; Mazzaferro, 2020; Mochizuki et al., 1993). On the other hand, molecular methods have significantly improved in recent years, allowing their application to result in faster and more accurate detection of infectious pathogens (Dowgier et al., 2016; Sun et al., 2018). Furthermore, PCR-based methods for detecting viral DNA have proven to be more sensitive and specific (Decaro et al., 2013; Mazzaferro, 2020). Therefore, the present study carry out a large-scale *in silico* analysis of the PCR primers and probes currently used to detect all CPV-2 variants.

Materials and methods

1. Dataset, Primers and probes

A total of 298 complete genomes (WGS) (Supplementary file 1) and 400 VP2 genomes of CPV-2 were downloaded from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). From the 298 WGS, the VP2 region was extracted, and added to the VP2 dataset, totaling 698

VP2 genomes (Supplementary file 2) (de Oliveira Santana et al., 2022). Accession number and country of origin for each genome can be found in Supplementary file 3. Of the 298 WGS, 14 were CPV-2 (old type) and 284 were CPV-2 variants; in VP2 genomes, 28 were CPV-2 (old type) and 670 were CPV-2 variants.

Seven primer sets (Decaro_1, Decaro_2, Kaur_3, Streck_4, Sun_5, Wang_6, Wilkes_7) available for the detection of parvovirus (all types and old type CPV-2) with Real-time PCR, in the literature, were selected (Figure 1 and Table 1), developed by different authors (Decaro et al., 2006, 2005; Kaur et al., 2016; Streck et al., 2013; Sun et al., 2018; Wang et al., 2020; Wilkes et al., 2015).

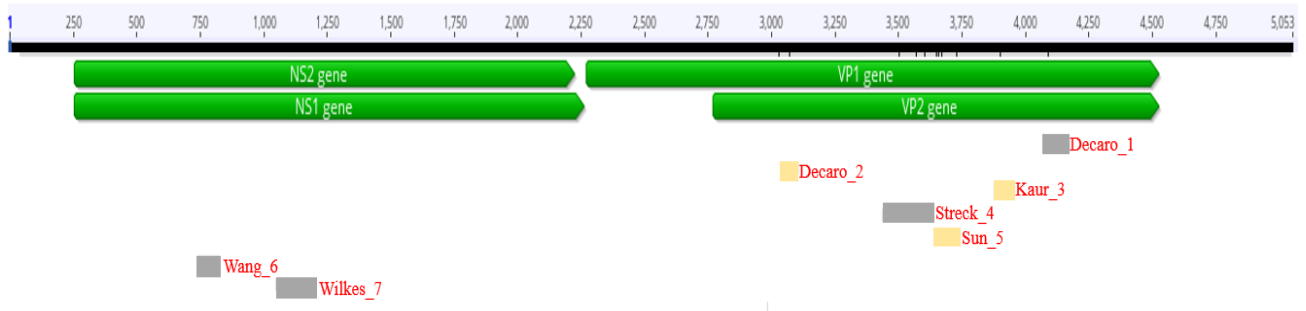


Figure 1: Graphical representation of the parvovirus genome (around 5053bp). The location of viral and non-structural proteins (green), and genomic loci of the primer amplicons investigated in this study (grey to identify old and variants CPV-2 strains and orange just to old CPV-2 strains).

Table 1: Primers/probes used in the analysis.

ID	Author	Gene target	Specificity	Primer/probe set (5'-3')
Decaro_1	Decaro et al., 2005	VP2	All types CPV-2	F – AACAGGAATTAAGTATACTAATATATTTA R – AAATTTGACCATTTGGATAAACT P – FAM-TGGTCCTTTAACTGCATTAATAATGTACC – TAMRA
Decaro_2	Decaro et al., 2006	VP2	Old type CPV-2	F – GCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAG R – TCAACCAATGACCAAGGTGTTACAA P2 – FAM – TGTGCATGAATATCAT – MGB
Kaur_3	Kaur et al., 2016	VP2	Old type CPV-2	F – AGCAGCAGATGGTGATCCAA R – AGGTGTTTCTCTCTGTTGTGGT P – FAM – GATATGCAT/ZEN/TTGGTA – Iowa Black
Streck_4	Streck et al., 2013	VP2	All types CPV-2	F – TGGAAGTACTAGTGGCACACCAA R – AAATGGTGGTAAGCCCAATG P – FAM – CATTGGGCTTACCACCATT – BBQ
Sun_5	Sun et al., 2018	VP2	Old type CPV-2	F – CGTTGCCTCAATCTGAAGGAGCTA R – TTGCCCATTTGAGTTACACCACGT P2 – FAM – ACTCCTATATAACCAAAGTTAGTA – MGB
Wang_6	Wang et al., 2020	NS1	All types CPV-2	F – TTCGGTAACTTAACACCAAC R – CTGTATGTTAATATAGTCACCCA P – FAM – CTGCAATTTCTCTGAGCTTA – MGB
Wilkes_7	Wilkes et al., 2015	NS1	All types CPV-2	F – GACGACAGCACAGGAAACAA R – CTGGTTGTGCCATCATTCA P – FAM – TCACCTGAAGACTGGATGATGTTACAACCA – BHQ1

2. Settings and Input Files in SCREENED

SCREENED (polymerase Chain Reaction Evaluation through large-scale miNing of gEnomic Data: <https://github.com/BioinformaticsPlatformWIV-ISP/SCREENED>) v1.0 (Vanneste et al., 2018) was run to analyze the primers in two stages: firstly, the primers and

probes designed in the NS1 region comparing them to the complete CPV-2 genomes and, secondly, the primers designed in the VP2 region with the CPV-2 VP2 genomes. One fasta document with PCR primers, probes, and amplicons sequences was used in the analysis (Supplementary file 4). We considered showing the mismatches of primers and probes that did not obtain 90% coverage of the genomes, in the two analyzes separately, where: for the 298 complete genomes, the mismatches were present in 29 or more genomes, and for the 698 VP2 genomes, the mismatches present in 69 or more genomes.

The configurations used in SCREENED were (i) a maximum of 10% of mismatches present in the genome anneal site being screened for the primers and probe (regardless of the length alignment); (ii) a minimum alignment length of 90% at the genome's annealing site screened for the primers and probe (regardless of the total number of mismatches); and (iii) no single mismatch was present in the last five nucleotides at the 3' end for the forward and reverse primer (Gand et al., 2020; Kwok et al., 1990; Whiley and Sloots, 2005). An assay that meets these requirements results in a theoretical positive PCR signal.

Results

1. PCR primer and probes that identify old and variants types CPV-2 strains

The assays Decaro_2, Kaur_3 and Sun_5 are specific for CPV-2 old types, and are not expected to show mismatches in 28 CPV-2 old type genomes. The assays Decaro_1, Streck_4, Wang_6, Wilkes_7 detect all CPV-2 strains, old type and antigenic variants, which means that the fewer mismatches they have, the more efficient they are at detection. Our results showed that all assays resulted in a theoretical positive PCR signal by the combination of primers and probes. The inspection of the alignment of Decaro_1, Streck_4, Wang_6 and Wilkes_7 demonstrated that most PCR assays (3/4; Streck_4, Wang_6 and Wilkes_7) present 90% coverage of the predominant genome sequences. However, there were mismatches in the

Decaro_1 forward primer; 172 (24.6%) genomes had one mismatch at the position of the third nucleotide, and four (0.5%) genomes had two mismatches, these were in different positions of the primer. These mismatches totalized eleven different sequence types, with both transition (8) and transversion (3) mismatches (Table 2).

Table 2: Location, number of genomes and types of mismatches that were found in the CPV-2 sequences for the primer Decaro_1.

Primer Decaro_1	Number mismatch	Number genomes	Mismatch type
AAACAGGAATTA ACTATACTAATATATTTA	0	522	-
AA T CAGGAATTA ACTATACTAATATATTTA	1	8	Transversion
AA G CAGGAATTA ACTATACTAATATATTTA	1	159	Transition
AAACAGGAATTA ACTATACTAATATATTT C A	1	1	Transition
AAACAGGAATTA ACTATACTAATAT G TTTA	1	1	Transition
AAACAGGAATTA ACTATACTAATAT T TTTA	1	1	Transversion
AAACAGGAATTA A T TATACTAATATATTTA	1	1	Transition
AAACAGG G ATTA ACTATACTAATATATTTA	1	1	Transition
AA G CAGGAATTA ACTATA C CAATATATTTA	2	1	Transition
A T ACAGGAATTA ACTATACTAATAT T TTTA	2	1	Transversion
AA G CAGGAATTA ACTATACTAA C ATATTTA	2	1	Transition
AA G CAGGAATTA ACTA C ACTAATATATTTA	2	1	Transition

2. PCR primer and probes that identify old type CPV-2 strains

Among the three (Decaro_2, Kaur_3, Sun_5) specific primers that identify old type CPV-2 strains, primer Decaro_2 was specific for this target; the probe had no mismatches only in the 28 sequences that were classified as the old type. The other sets (Kaur_3, Sun_5) were not specific to the old CPV-2 strains (Table 3).

Table 3: Percentage of CPV-2 sequences that had mismatches in the forward (0-5), reverse (0-2) and probe (0-3) Decaro_2, Kaur_3, and Sun_5 primers.

		N ⁰ MISMATCHES FORWARD					
		0	1	2	3	4	5
Decaro, 2006	Decaro_2	690	8				
Kaur, 2016	Kaur_3	663	34	1			
Sun, 2018	Sun_5		26	28	615	26	3
		N ⁰ MISMATCHES REVERSE					
		0	1	2	3	4	5
Decaro, 2006	Decaro_2	684	14				
Kaur, 2016	Kaur_3	690	8				
Sun, 2018	Sun_5		678	20			
		N ⁰ MISMATCHES PROBE					
		0	1	2	3	4	5
Decaro, 2006	Decaro_2	28	399	269	2		
Kaur, 2016	Kaur_3		696	2			
Sun, 2018	Sun_5	648	43	7			

In addition, primer Sun_5 had mismatches in the forward and reverse. Sun_5 forward primer showed 26 (3.7%) genomes with one mismatch, 28 (4%) genomes with two mismatches, 615 (88.1%) genomes with three mismatches, 26 (3.7%) genomes with four mismatch, and three (0.5%) genomes with five mismatches. Sun_5 reverse primer showed 678 (97.1%) genomes with one mismatch, and 20 (2.9%) genomes with two mismatches. The mismatches

are generally found at different positions in the primer. Kaur_3 probe showed 696 (99.7%) genomes with one mismatch, and two (0.3%) genomes with two mismatches; Sun_5 probe showed 696 (99.7%) genomes with one mismatch, and two (0.3%) genomes with two mismatches. For these probes to be specific they should have had zero mismatches in 28 genomes that had already been classified as CPV type 2, this was not found.

Discussion

The high morbidity, mortality and worldwide prevalence of CPV-2, faster and more accurate diagnostic methods are needed for prevention and correct treatment (Wang et al., 2020). Real-time PCR is considered the gold standard test and a fundamental instrument in molecular biology, usually applied for detection, quantification and differentiation of nucleic acids in research and diagnostic (Espy et al., 2006; Hoffmann et al., 2009; Mackay et al., 2002; Walter-Weingärtner et al., 2021). However, the efficiency of this method has been restricted by primer mismatches, which are hard to predict, inducing detection failures and false-negative results (Howson et al., 2020; Ledeker and De Long, 2013). Furthermore, these variations in primer targets have a negative impact on the viral quantification accuracy (Howson et al., 2020; Ledeker and De Long, 2013; Whiley and Sloots, 2005).

In Brazil, a phylogenetic study showed a high genetic diversity of CPV-2 (de Oliveira Santana et al., 2022). In the southern region of the country, have been the co-circulation of different variants and subtypes of CPV-2 in the canine population, including those that had not yet been reported in Brazil, such as the new CPV-2a/2b and CPV-2-like (de Oliveira et al., 2019). These variations in CPV-2 can cause primer-target mismatches and, consequently, increase false-negative PCR results. In our study, CPV-2 genomes were analyzed by SCREENED to review oligonucleotide sequences with mismatches. The presence of up to 5

mismatches in some of the PCR primers and probes used to detect CPV-2 shows the importance of constantly evaluating assays that are used to detect non-emergent diseases that do not infect humans. Studies related that a single mismatch located before last five bp from the 3' end have a moderate effect on qPCR amplification and can be tolerated. However, the complete blocking of the PCR reaction can occur when four or more mismatches are present (Lefever et al., 2013). This information can increase the rate of successful primer design for sequences with a high SNP density, like CPV-2.

The *in silico* tools have already been developed to evaluate PCR tests (Kalendar et al., 2017; Ye et al., 2012), but SCREENED are capable to evaluating a large number of genomes against the set of primers and probes. The software method used here was successful for the evaluation of primers and probes for viruses such as SARS-CoV-2, Dengue, Zika and Chikungunya (Broeders et al., 2020; Gand et al., 2021, 2020; Vanneste et al., 2018). The *in silico* approaches is helpfull in the selection of newly designed primers, identify potential mismatches and avoid amplification of unwanted amplicons, avoiding potential problems prior to any in vitro experiments (Yu and Zhang, 2011).

A PCR that differentiates between antigenic variants strains and vaccine strains (CPV-2 old type) is very relevant because testing fecal samples from dogs with diarrhea a few days after vaccination can result in a false positive (Decaro et al., 2006). Vaccinated dogs can be infected with CPV-2, as shown in a study carried out in China, in which 48.4% of 95 positive dogs were vaccinated (Geng et al., 2015). However, the prevalence of unvaccinated dogs being infected is between 32.63% and 84.98%. Therefore, the monitoring of virus mutations, the development of more effective vaccines, the improvement of quarantine measures for infected dogs will provide effective measures in preventing and controlling CPV-2 infections in the future (Qi et al., 2020).

Conclusion

Three assays analyzed in this work, used for detecting all CPV-2 strains, present excellent results *in silico*, and one of them presents mismatches in different regions of the genome, requiring monitoring and attention. Of the variant and original strain differentiation assays, only one of the assays performs the exact detection of the original strain. The other two assays show probe hybridization to all antigenic variants. Our study was the first to evaluate primer-target mismatches for CPV-2 detection and further analyzes must continue to be performed.

5. Discussão geral

A PCR é um método que amplifica o DNA de interesse, utilizada em muitos campos, como pesquisa biomédica, testes de diagnóstico e testes forenses. Embora o seu resultado possa ser influenciado por muitas condições, como a preparação do DNA modelo e as condições de reação, projetar um bom par de *primers* é um fator crítico (Ye et al., 2012). Quando os *primers* apresentam *mismatches* próximos à região 3' podem diminuir a eficiência de amplificação e quando ocorrem no meio do *primer* ou próximo à região 5', podem reduzir os valores de CT (Ghedira et al., 2009). Frente a isso, o objetivo geral desse trabalho foi avaliar *in silico* as sequências de *primers* e sondas utilizados na detecção de SARS-CoV-2 e CPV-2 frente às novas variantes. Os resultados das análises do SCREENED enfatizam que *mismatches primer-alvo* estão acontecendo e podem afetar os resultados da PCR, tanto em vírus que estão em circulação há anos, quanto em emergentes.

Para o diagnóstico de SARS-CoV-2, a proteína S é bastante utilizada por ser altamente imunogênica e conter sequências exclusivas (Jaimes et al., 2020), minimizando as chances de ocorrer reatividade cruzada com outros coronavírus humanos conhecidos (McIntosh and Perlman, 2015). No entanto, a proteína S possui maior probabilidade de sofrer mutação, e, à medida com que elas ocorrem, os imunoenaios se tornam mais suscetíveis a resultados falso-negativos, assim como testes de diagnóstico baseados em anticorpos que utilizam biofluidos, e ensaios RT-PCR quando a mutação ocorre em uma área crítica para ligação de *primer* (Ascoli, 2021). É possível observar isso nas sondas dos ensaios HKUniv_S, SigmAldr_S5, SigmAldr_S6 e no *primer* reverso Won_S, nos resultados do capítulo I, onde ocorreram *mismatches* para as variantes de SARS-CoV-2. Entretanto, o *primer* forward ChinaCDC_N, os *primers* reverse Japan_N, SigmAldr_N1, SigmAldr_N2, Thai_N e a sonda USCDC_N1 não estão localizados na proteína S e sim na proteína do nucleocapsídeo, e de igual forma apresentam *mismatches* com os genomas das variantes do SARS-CoV-2, em concordância com outros estudos (Davi et al., 2021; Gand et al., 2020; Khan and Cheung, 2021; Santos et al., 2020).

No início de 2020, foi relatado que os genomas de SARS-CoV-2 já apresentavam alta variabilidade genética, principalmente de mutações de nucleotídeo único, e que estas afetavam o anelamento de todos os painéis de RT-PCR avaliados neste estudo. Além disso, é esperado que a variabilidade genética aumente, portanto, a recomendação é de combinação de mais de

um alvo de ensaio em painéis RT-PCR SARS-CoV-2 em tempo real e realizar monitoramento contínuo das variações genômicas, para fornecer uma resposta rápida caso seja necessário reprojeter o ensaio (Peñarrubia et al., 2020). No entanto, a combinação de mais de um alvo em uma PCR não é uma realidade factível para todos, já que, em países subdesenvolvidos, os recursos de saúde são baixos e os testes de RT-PCR são realizados em escala limitada (Aziz et al., 2020). Informações sobre a eficiência *in silico* dos testes estão sendo gratuitamente disponibilizadas na plataforma GISAID. Ensaios de detecção das diferentes variantes de SARS-CoV-2 vêm sendo desenvolvidos, com o intuito de acelerar a disponibilidade dos dados de pessoas infectadas com essas variantes, já que a PCR é mais rápida que o sequenciamento de genoma (Brito-Mutunayagam et al., 2022; Hale et al., 2021). Nossos resultados enfatizam a importância de manter uma avaliação contínua dos ensaios de detecção, porque mesmo que os *mismatches* encontrados não estejam na terminação 3', há indicação de variação na região de anelamento.

No caso de CPV-2, alguns estudos vem investigando uma PCR que possa diferenciar entre cepas infecciosas e cepa vacinal devido à testagem de amostras fecais de cães com diarreia poucos dias após a administração de uma vacina, quando é crucial ser capaz de diferenciar o vírus do imunizante das cepas de campo do CPV-2 (Decaro et al., 2006). Estudos filogenéticos demonstram ampla diversidade genética de CPV-2, e co-circulação de diferentes variantes e subtipos de CPV-2 na população canina (de Oliveira et al., 2019; de Oliveira Santana et al., 2022). Além disso, algumas das novas variantes foram obtidas de cães vacinados, o que enfatiza a necessidade de atualização das cepas vacinais (de Oliveira et al., 2019).

Como demonstrado nos resultados do capítulo II, na análise do SCREENED, alguns dos ensaios apresentam diversos *mismatches* que podem atrapalhar na identificação do CPV-2, resultando em baixos CTs ou falso-negativos. A presença de até 5 *mismatches* em alguns dos *primers* e sondas de PCR utilizados para detectar CPV-2, deixa claro a necessidade de avaliar os ensaios que são utilizados para detecção de doenças não emergentes e que não infectam os seres humanos. Dos ensaios específicos para a cepa vacinal de CPV-2 (Decaro_2, Kaur_3, Sun_5), apenas o ensaio Decaro_2 apresenta diferenciação das cepas vacinais para as de campo (Decaro et al., 2006), os outros dois ensaios não são específicos para o tipo antigo de CPV-2, apresentando muitos *mismatches*. Dos ensaios que detectam todos os tipos de CPV-2 (Decaro_1, Streck_4, Wang_6 e Wilkes_7), o ensaio Decaro_1 apresentou *mismatches* em várias regiões do anelamento de *primer*, tanto do tipo transição quanto transversão. Este foi o primeiro estudo feito sobre *mismatches* para detecção de CPV-2 e é importante que novas

análises continuem sendo realizadas. Um exemplo da abrangência do problema de incompatibilidade *primer*-alvo pode ser dado por um estudo realizado com bactérias, que mostrou que grupos taxonômicos que apresentam *mismatches* nos *primers* universais de rRNA 16S provavelmente estão sub-representados em bancos de dados (D. et al., 2008).

Algumas limitações do estudo podem ser consideradas, como a inviabilidade de testar todos os genomas de SARS-CoV-2 disponíveis no GISAID, devido ao software não suportar a demanda da análise. Outra limitação, coincidentemente, foi a baixa quantidade de genomas completos ou da proteína VP2 disponíveis, visto que o parvovírus canino está em circulação há muitos anos. Além disso, poucas cepas vacinais de CPV-2 estão disponíveis nos bancos de dados, em nosso estudo apenas 2% dos genomas eram de CPV-2, enquanto 98% eram cepas de campo (CPV-2a, -2b e -2c).

A análise de PCR *in silico* é um método computacional que pode auxiliar na seleção de *primers* recém-projetados, identificar possíveis *mismatches* devido a SNPs conhecidos e prever a amplificação de alvos indesejados, evitando possíveis problemas antes da realização do experimento em bancada. É uma abordagem complementar útil e eficiente para garantir a especificidade do *primer* para uma ampla gama de aplicações de PCR (Yu and Zhang, 2011). Portanto, é importante que haja um esforço global em sequenciar os genomas dos patógenos humanos, animais, emergentes e não emergentes, e disponibilizá-los em bancos de dados de sequência o quanto antes (Allard et al., 2019). Essa é uma realidade que a pandemia de SARS-CoV-2 trouxe à tona, mostrando a necessidade do monitoramento regular dos *primers* utilizados para detecção de doenças e a importância dos sequenciamentos de genoma para a realização desse trabalho, já que não é viável, num primeiro momento, fazê-lo em laboratório, mas sim *in silico*, com uma gama de genomas representativos provenientes da técnica de sequenciamento (Gand et al., 2021).

6. Conclusão

Através desse estudo foi possível avaliar que os *primers* e sondas utilizados na detecção de SARS-CoV-2 e CPV-2 continuam resultando em sinal teórico positivo, contudo, vários *mismatches* foram detectados e exigem atenção em ambos os vírus. Em SARS-CoV-2 é possível observar que o *amplicon* dos testes vem apresentando alta variabilidade e mutações, portanto os ensaios devem continuar sendo constantemente monitorados. Além disso, o surgimento de novas variantes tem aumentado o número de *mismatches primer-alvo*, embora a combinação de métodos permaneça resultando em sinal teórico positivo. Já em CPV-2, alguns testes de diferenciação de vacina e cepa de campo podem resultar em falso-positivos ou falso-negativos devido a *mismatches* na região da sonda, utilizada para fazer a diferenciação através de SNP's, o que enfatiza a necessidade de avaliação em ensaios de detecção molecular de doenças animais. As análises *in silico* aqui apresentadas fazem jus a necessidade de testes de bioinformática antes do desenho de *primers*, principalmente ao desenhar testes com detecção de SNP, e para investigar se *primers* já utilizados ainda apresentam os resultados desejados na PCR.

7. Perspectivas

Realizamos este estudo através de dados e softwares disponíveis gratuitamente, com o propósito de mostrar que as análises *in silico* podem e devem estar, cada vez mais, incluídas em rotinas de padronização de ensaios de PCR. Também incentivamos que mais dados de sequenciamento sejam disponibilizados, principalmente relacionados às doenças animais, para que seja possível realizar futuras avaliações como essa em diversas outras doenças. As análises *in silico* são formas baratas e rápidas em biologia molecular, agilizando os processos de teste em bancada, os quais despendem de mais tempo e maiores gastos financeiros.

Os testes *in silico* deste estudo agilizam os estudos de sensibilidade, reprodutibilidade e especificidade que serão realizados *in vitro* com os *primers* sugeridos para SARS-CoV-2 e novos *primers* que serão desenhados para diferenciação de cepa vacinal e variantes antigênicas de CPV-2.

8. Referências

- Aldrich, S., 2020. Coronavirus qPCR Design Case Study & Related Products to Support SARS-CoV-2 Research [WWW Document]. URL <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/research-and-disease-areas/immunology-research/ncov-coronavirus> (accessed 5.5.21).
- Allard, M.W., Stevens, E.L., Brown, E.W., 2019. All for one and one for all: the true potential of whole-genome sequencing. *Lancet. Infect. Dis.* 19, 683–684. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30172-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30172-0)
- Álvarez-Díaz, D.A., Franco-Muñoz, C., Laiton-Donato, K., Usme-Ciro, J.A., Franco-Sierra, N.D., Flórez-Sánchez, A.C., Gómez-Rangel, S., Rodríguez-Calderon, L.D., Barbosa-Ramirez, J., Ospitia-Baez, E., Walteros, D.M., Ospina-Martinez, M.L., Mercado-Reyes, M., 2020. Molecular analysis of several in-house rRT-PCR protocols for SARS-CoV-2 detection in the context of genetic variability of the virus in Colombia. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 84, 104390. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104390>
- Andreson, R., Möls, T., Remm, M., 2008. Predicting failure rate of PCR in large genomes. *Nucleic Acids Res.* 36, e66. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn290>
- Appel, M.J., Scott, F.W., Carmichael, L.E., 1979. Isolation and immunisation studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* 105, 156–159. <https://doi.org/10.1136/vr.105.8.156>
- Arena, F., Pollini, S., Rossolini, G.M., Margaglione, M., 2021. Summary of the Available Molecular Methods for Detection of SARS-CoV-2 during the Ongoing Pandemic. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22031298>
- Ascoli, C.A., 2021. Could mutations of SARS-CoV-2 suppress diagnostic detection? *Nat. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00845-3>
- Aziz, A.B., Raqib, R., Khan, W.A., Rahman, M., Haque, R., Alam, M., Zaman, K., Ross, A.G., 2020. Integrated control of COVID-19 in resource-poor countries. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.009>
- Baral, P., Bhattarai, N., Hossen, M.L., Stebliankin, V., Gerstman, B.S., Narasimhan, G., Chapagain, P.P., 2021. Mutation-induced changes in the receptor-binding interface of the SARS-CoV-2 Delta variant B.1.617.2 and implications for immune evasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 574, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.08.036>
- Bourouiba, L., 2020. Turbulent Gas Clouds and Respiratory Pathogen Emissions: Potential Implications for Reducing Transmission of COVID-19. *JAMA* 323, 1837–1838. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.4756>
- Boyle, B., Dallaire, N., MacKay, J., 2009. Evaluation of the impact of single nucleotide polymorphisms and primer mismatches on quantitative PCR. *BMC Biotechnol.* 9, 75. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-75>
- Brito-Mutunayagam, S., Maloney, D., McAllister, G., Dewar, R., McHugh, M., Templeton, K., 2022. Rapid

- detection of SARS-CoV-2 variants using allele-specific PCR. *J. Virol. Methods* 114497. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114497>
- Brock, T.D., 1997. The value of basic research: discovery of *Thermus aquaticus* and other extreme thermophiles. *Genetics* 146, 1207–1210. <https://doi.org/10.1093/genetics/146.4.1207>
- Broeders, S., Garlant, L., Fraiture, M.-A., Vandermassen, E., Suin, V., Vanhomwegen, J., Dupont-Rouzeyrol, M., Rousset, D., Van Gucht, S., Roosens, N., 2020. A new multiplex RT-qPCR method for the simultaneous detection and discrimination of Zika and chikungunya viruses. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 92, 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.12.028>
- Bru, D., Martin-Laurent, F., Philippot, L., 2008. Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA gene as an example. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1660–1663. <https://doi.org/10.1128/AEM.02403-07>
- Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N., Carmichael, L., 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82, 3021–3025. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-12-3021>
- Buss, L.F., Prete, C.A.J., Abraham, C.M.M., Mendrone, A.J., Salomon, T., de Almeida-Neto, C., França, R.F.O., Belotti, M.C., Carvalho, M.P.S.S., Costa, A.G., Crispim, M.A.E., Ferreira, S.C., Fraiji, N.A., Gurzenda, S., Whittaker, C., Kamaura, L.T., Takecian, P.L., da Silva Peixoto, P., Oikawa, M.K., Nishiya, A.S., Rocha, V., Salles, N.A., de Souza Santos, A.A., da Silva, M.A., Custer, B., Parag, K. V, Barral-Netto, M., Kraemer, M.U.G., Pereira, R.H.M., Pybus, O.G., Busch, M.P., Castro, M.C., Dye, C., Nascimento, V.H., Faria, N.R., Sabino, E.C., 2021. Three-quarters attack rate of SARS-CoV-2 in the Brazilian Amazon during a largely unmitigated epidemic. *Science* 371, 288–292. <https://doi.org/10.1126/science.abe9728>
- Callaway, E., 2021. Delta coronavirus variant: scientists brace for impact. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01696-3>
- Candido, D.D.S., Watts, A., Abade, L., Kraemer, M.U.G., Pybus, O.G., Croda, J., de Oliveira, W., Khan, K., Sabino, E.C., Faria, N.R., 2020. Routes for COVID-19 importation in Brazil. *J. Travel Med.* 27. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa042>
- CDC, 2022. What You Need to Know About Variants [WWW Document]. URL <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/about-variants.html> (accessed 3.18.22).
- Chaillon, A., Smith, D.M., 2021. Phylogenetic Analyses of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) B.1.1.7 Lineage Suggest a Single Origin Followed by Multiple Exportation Events Versus Convergent Evolution. *Clin. Infect. Dis. an Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 73, 2314–2317. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab265>
- Chan, J.F.-W., Kok, K.-H., Zhu, Z., Chu, H., To, K.K.-W., Yuan, S., Yuen, K.-Y., 2020a. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 221–236. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>

- Chan, J.F.-W., Yip, C.C.-Y., To, K.K.-W., Tang, T.H.-C., Wong, S.C.-Y., Leung, K.-H., Fung, A.Y.-F., Ng, A.C.-K., Zou, Z., Tsoi, H.-W., Choi, G.K.-Y., Tam, A.R., Cheng, V.C.-C., Chan, K.-H., Tsang, O.T.-Y., Yuen, K.-Y., 2020b. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 58. <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>
- Chen, J., Wang, R., Gilby, N.B., Wei, G.-W., 2022. Omicron Variant (B.1.1.529): Infectivity, Vaccine Breakthrough, and Antibody Resistance. *J. Chem. Inf. Model.* <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c01451>
- Chen, J., Wang, R., Wang, M., Wei, G.-W., 2020. Mutations Strengthened SARS-CoV-2 Infectivity. *J. Mol. Biol.* 432, 5212–5226. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.07.009>
- Choi, J.Y., Smith, D.M., 2021. SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei Med. J.* 62, 961–968. <https://doi.org/10.3349/ymj.2021.62.11.961>
- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., Yang, C.-H., 2013. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol. Lett.* 35, 1541–1549. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>
- Corman, V.M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D.K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M.L., Mulders, D.G., 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., Drosten, C., 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* 25. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Canuti, M., Chiorini, J.A., Eis-Hubinger, A.-M., Hughes, J., Mietzsch, M., Modha, S., Ogliaastro, M., Pénczes, J.J., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Consortium, I.R., 2019. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *J. Gen. Virol.* 100, 367–368. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001212>
- D., B., F., M.-L., L., P., 2008. Quantification of the Detrimental Effect of a Single Primer-Template Mismatch by Real-Time PCR Using the 16S rRNA Gene as an Example. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1660–1663. <https://doi.org/10.1128/AEM.02403-07>
- Davi, M.J.P., Jeronimo, S.M.B., Lima, J.P.M.S., Lanza, D.C.F., 2021. Design and in silico validation of polymerase chain reaction primers to detect severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Sci. Rep.* 11, 12565. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91817-9>
- Davies, N.G., Abbott, S., Barnard, R.C., Jarvis, C.I., Kucharski, A.J., Munday, J.D., Pearson, C.A.B., Russell, T.W., Tully, D.C., Washburne, A.D., Wenseleers, T., Gimma, A., Waites, W., Wong, K.L.M., van Zandvoort, K., Silverman, J.D., Diaz-Ordaz, K., Keogh, R., Eggo, R.M., Funk, S., Jit, M., Atkins, K.E., Edmunds, W.J., 2021. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science* 372. <https://doi.org/10.1126/science.abg3055>
- Day, M.J., Horzinek, M.C., Schultz, R.D., Squires, R.A., 2016. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *J. Small Anim. Pract.* 57, 4–8. <https://doi.org/10.1111/jsap.12431>

- De la Torre, D., Mafla, E., Puga, B., Erazo, L., Astolfi-Ferreira, C., Ferreira, A.P., 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, 480–487. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.480-487>
- de Oliveira, P.S.B., Cargnelutti, J.F., Masuda, E.K., Weiblen, R., Flores, E.F., 2019. New variants of canine parvovirus in dogs in southern Brazil. *Arch. Virol.* 164, 1361–1369. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04198-w>
- de Oliveira Santana, W., Silveira, V.P., Wolf, J.M., Kipper, D., Echeverrigaray, S., Canal, C.W., Truyen, U., Lunge, V.R., Streck, A.F., 2022. Molecular phylogenetic assessment of the canine parvovirus 2 worldwide and analysis of the genetic diversity and temporal spreading in Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 98, 105225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105225>
- de Souza, F.S.H., Hojo-Souza, N.S., da Silva, C.M., Guidoni, D.L., 2021. Second wave of COVID-19 in Brazil: younger at higher risk. *Eur. J. Epidemiol.* 36, 441–443. <https://doi.org/10.1007/s10654-021-00750-8>
- Decaro, N., Buonavoglia, C., 2012. Canine parvovirus--a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet. Microbiol.* 155, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.007>
- Decaro, N., Buonavoglia, C., Barrs, V.R., 2020. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication? *Vet. Microbiol.* 247, 108760. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108760>
- Decaro, N., Cirone, F., Desario, C., Elia, G., Lorusso, E., Colaianni, M.L., Martella, V., Buonavoglia, C., 2009a. Severe parvovirus in a 12-year-old dog that had been repeatedly vaccinated. *Vet. Rec.* 164, 593–595. <https://doi.org/10.1136/vr.164.19.593>
- Decaro, N., Crescenzo, G., Desario, C., Cavalli, A., Losurdo, M., Colaianni, M.L., Ventrella, G., Rizzi, S., Aulicino, S., Lucente, M.S., Buonavoglia, C., 2014. Long-term viremia and fecal shedding in pups after modified-live canine parvovirus vaccination. *Vaccine* 32, 3850–3853. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.050>
- Decaro, N., Desario, C., Billi, M., Lorusso, E., Colaianni, M.L., Colao, V., Elia, G., Ventrella, G., Kusi, I., Bo, S., Buonavoglia, C., 2013. Evaluation of an in-clinic assay for the diagnosis of canine parvovirus. *Vet. J.* 198, 504–507. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.032>
- Decaro, N., Desario, C., Parisi, A., Martella, V., Lorusso, A., Miccolupo, A., Mari, V., Colaianni, M.L., Cavalli, A., Di Trani, L., Buonavoglia, C., 2009b. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology* 385, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.016>
- Decaro, N., Elia, G., Desario, C., Roperto, S., Martella, V., Campolo, M., Lorusso, A., Cavalli, A., Buonavoglia, C., 2006. A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. *J. Virol. Methods* 136, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.03.030>
- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Desario, C., Campolo, M., Trani, L. Di, Tarsitano, E., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2005. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type

- 2 in the feces of dogs. *Vet. Microbiol.* 105, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.018>
- Deng, X., Garcia-Knight, M.A., Khalid, M.M., Servellita, V., Wang, C., Morris, M.K., Sotomayor-González, A., Glasner, D.R., Reyes, K.R., Gliwa, A.S., Reddy, N.P., Sanchez San Martin, C., Federman, S., Cheng, J., Balcerak, J., Taylor, J., Streithorst, J.A., Miller, S., Sreekumar, B., Chen, P.-Y., Schulze-Gahmen, U., Taha, T.Y., Hayashi, J.M., Simoneau, C.R., Kumar, G.R., McMahon, S., Lidsky, P. V, Xiao, Y., Hemarajata, P., Green, N.M., Espinosa, A., Kath, C., Haw, M., Bell, J., Hacker, J.K., Hanson, C., Wadford, D.A., Anaya, C., Ferguson, D., Frankino, P.A., Shivram, H., Lareau, L.F., Wyman, S.K., Ott, M., Andino, R., Chiu, C.Y., 2021. Transmission, infectivity, and neutralization of a spike L452R SARS-CoV-2 variant. *Cell* 184, 3426–3437.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.025>
- Dennehy, J.J., 2017. Evolutionary ecology of virus emergence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1389, 124–146. <https://doi.org/10.1111/nyas.13304>
- Dowgier, G., Mari, V., Losurdo, M., Larocca, V., Colaianni, M.L., Cirone, F., Lucente, M.S., Martella, V., Buonavoglia, C., Decaro, N., 2016. A duplex real-time PCR assay based on TaqMan technology for simultaneous detection and differentiation of canine adenovirus types 1 and 2. *J. Virol. Methods* 234, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.03.011>
- Dramé, M., Tabue Teguio, M., Proye, E., Hequet, F., Hentzien, M., Kanagaratnam, L., Godaert, L., 2020. Should RT-PCR be considered a gold standard in the diagnosis of COVID-19? *J. Med. Virol.* 92, 2312–2313. <https://doi.org/10.1002/jmv.25996>
- ECDC- European Center for Disease Prevention and Control., 2021. Threat assessment brief: emergence of SARS-CoV-2 B.1.617 variants in India and situation in the EU/EEA. [WWW Document]. URL <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-emergence-sars-cov-2-b1617-variants> (accessed 3.20.22).
- Elena, S.F., Bedhomme, S., Carrasco, P., Cuevas, J.M., de la Iglesia, F., Lafforgue, G., Lalić, J., Pròsper, A., Tromas, N., Zwart, M.P., 2011. The evolutionary genetics of emerging plant RNA viruses. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 24, 287–293. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-10-0214>
- Elia, G., Cavalli, A., Desario, C., Lorusso, E., Lucente, M.S., Decaro, N., Martella, V., Buonavoglia, C., 2007. Detection of infectious canine parvovirus type 2 by mRNA real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 146, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.06.017>
- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R. 3rd, Smith, T.F., 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 165–256. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006>
- Faria, N.R., Mellan, T.A., Whittaker, C., Claro, I.M., Candido, D. da S., Mishra, S., Crispim, M.A.E., Sales, F.C., Hawryluk, I., McCrone, J.T., Hulswit, R.J.G., Franco, L.A.M., Ramundo, M.S., de Jesus, J.G., Andrade, P.S., Coletti, T.M., Ferreira, G.M., Silva, C.A.M., Manuli, E.R., Pereira, R.H.M., Peixoto, P.S., Kraemer, M.U., Gaburo, N., Camilo, C. da C., Hoeltgebaum, H., Souza, W.M., Rocha, E.C., de Souza, L.M., de Pinho,

- M.C., Araujo, L.J.T., Malta, F.S. V, de Lima, A.B., Silva, J. do P., Zauli, D.A.G., Ferreira, A.C. de S., Schnekenberg, R.P., Laydon, D.J., Walker, P.G.T., Schlüter, H.M., dos Santos, A.L.P., Vidal, M.S., Del Caro, V.S., Filho, R.M.F., dos Santos, H.M., Aguiar, R.S., Modena, J.L.P., Nelson, B., Hay, J.A., Monod, M., Miscouridou, X., Coupland, H., Sonabend, R., Vollmer, M., Gandy, A., Suchard, M.A., Bowden, T.A., Pond, S.L.K., Wu, C.-H., Ratmann, O., Ferguson, N.M., Dye, C., Loman, N.J., Lemey, P., Rambaut, A., Fraiji, N.A., Carvalho, M. do P.S.S., Pybus, O.G., Flaxman, S., Bhatt, S., Sabino, E.C., 2021. Genomics and epidemiology of a novel SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* (80-.). 2021.02.26.21252554. <https://doi.org/10.1101/2021.02.26.21252554>
- Fischer, C., de Lamballerie, X., Drexler, J.F., 2019. Enhanced Molecular Surveillance of Chikungunya Virus. *mSphere* 4. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00295-19>
- Freisl, M., Speck, S., Truyen, U., Reese, S., Proksch, A.-L., Hartmann, K., 2017. Faecal shedding of canine parvovirus after modified-live vaccination in healthy adult dogs. *Vet. J.* 219, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.11.011>
- Funk, T., Pharris, A., Spiteri, G., Bundle, N., Melidou, A., Carr, M., Gonzalez, G., Garcia-Leon, A., Crispie, F., O'Connor, L., Murphy, N., Mossong, J., Vergison, A., Wienecke-Baldacchino, A.K., Abdelrahman, T., Riccardo, F., Stefanelli, P., Di Martino, A., Bella, A., Lo Presti, A., Casaca, P., Moreno, J., Borges, V., Isidro, J., Ferreira, R., Gomes, J.P., Dotsenko, L., Suija, H., Epstein, J., Sadikova, O., Sepp, H., Ikonen, N., Savolainen-Kopra, C., Blomqvist, S., Möttönen, T., Helve, O., Gomes-Dias, J., Adlhoch, C., 2021. Characteristics of SARS-CoV-2 variants of concern B.1.1.7, B.1.351 or P.1: data from seven EU/EEA countries, weeks 38/2020 to 10/2021. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* 26. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.16.2100348>
- Gand, M., Vanneste, K., Thomas, I., Van Gucht, S., Capron, A., Herman, P., Roosens, N.H.C., De Keersmaecker, S.C.J., 2021. Deepening of In Silico Evaluation of SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Assays in the Context of New Variants. *Genes (Basel)*. 12. <https://doi.org/10.3390/genes12040565>
- Gand, M., Vanneste, K., Thomas, I., Van Gucht, S., Capron, A., Herman, P., Roosens, N.H.C., De Keersmaecker, S.C.J., 2020. Use of Whole Genome Sequencing Data for a First in Silico Specificity Evaluation of the RT-qPCR Assays Used for SARS-CoV-2 Detection. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5585. <https://doi.org/10.3390/ijms21155585>
- Geng, Y., Guo, D., Li, C., Wang, E., Wei, S., Wang, Z., Yao, S., Zhao, X., Su, M., Wang, X., Wang, J., Wu, R., Feng, L., Sun, D., 2015. Co-Circulation of the Rare CPV-2c with Unique Gln370Arg Substitution, New CPV-2b with Unique Thr440Ala Substitution, and New CPV-2a with High Prevalence and Variation in Heilongjiang Province, Northeast China. *PLoS One* 10, e0137288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137288>
- Gerlach, M., Proksch, A.-L., Dörfelt, R., Unterer, S., Hartmann, K., 2020. [Therapy of canine parvovirus infection - review and current insights]. *Tierarztl. Prax. Ausg. K. Kleintiere. Heimtiere.* 48, 26–37. <https://doi.org/10.1055/a-1020-3341>

- Ghedira, R., Papazova, N., Vuylsteke, M., Ruttink, T., Taverniers, I., De Loose, M., 2009. Assessment of primer/template mismatch effects on real-time PCR amplification of target taxa for GMO quantification. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9370–9377. <https://doi.org/10.1021/jf901976a>
- Giovanetti, M., Benedetti, F., Campisi, G., Ciccozzi, A., Fabris, S., Ceccarelli, G., Tambone, V., Caruso, A., Angeletti, S., Zella, D., Ciccozzi, M., 2021. Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 538, 88–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.102>
- Giraldo-Ramirez, S., Rendon-Marin, S., Ruiz-Saenz, J., 2020. Phylogenetic, Evolutionary and Structural Analysis of Canine Parvovirus (CPV-2) Antigenic Variants Circulating in Colombia. *Viruses* 12. <https://doi.org/10.3390/v12050500>
- GISAID, n.d. GISAID Initiative [WWW Document]. URL <https://www.gisaid.org/> (accessed 4.1.22).
- Goddard, A., Leisewitz, A.L., 2010. Canine parvovirus. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 40, 1041–1053. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.007>
- Gräf, T., Bello, G., Venas, T., Pereira, E., Paixão, A., Appolinario, L., Lopes, R., Mendonça, A., Rocha, A., Motta, F., Gregianini, T., Salvato, R., Fernandes, S., Rovaris, D., Cavalcanti, A., Leite, A., Riediger, I., Debur, M., Bernardes, A., Resende, P., 2021. Identification of SARS-CoV-2 P.1-related lineages in Brazil provides new insights about the mechanisms of emergence of Variants of Concern. *Res. Sq.* <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-580195/v1>
- Green, M.R., Sambrook, J., 2019. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2019. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>
- Gu, H., Krishnan, P., Ng, D.Y.M., Chang, L.D.J., Liu, G.Y.Z., Cheng, S.S.M., Hui, M.M.Y., Fan, M.C.Y., Wan, J.H.L., Lau, L.H.K., Cowling, B.J., Peiris, M., Poon, L.L.M., 2022. Probable Transmission of SARS-CoV-2 Omicron Variant in Quarantine Hotel, Hong Kong, China, November 2021. *Emerg. Infect. Dis.* 28, 460–462. <https://doi.org/10.3201/eid2802.212422>
- Hagen, A., 2021. How Dangerous Is the Delta Variant (B.1.617.2)? *Am. Soc. Microbiol.*
- Hale, R., Crowley, P., Dervisevic, S., Coupland, L., Cliff, P.R., Ebie, S., Snell, L.B., Paul, J., Williams, C., Randell, P., Pond, M., Stanley, K., 2021. Development of a Multiplex Tandem PCR (MT-PCR) Assay for the Detection of Emerging SARS-CoV-2 Variants. *Viruses* 13. <https://doi.org/10.3390/v13102028>
- Hanna, S.E., Connor, C.J., Wang, H.H., 2005. Real-time Polymerase Chain Reaction for the Food Microbiologist: Technologies, Applications, and Limitations. *J. Food Sci.* 70, R49–R53.
- Hasöksüz, M., Kiliç, S., Saraç, F., 2020. Coronaviruses and SARS-COV-2. *Turkish J. Med. Sci.* 50, 549–556. <https://doi.org/10.3906/sag-2004-127>
- Hayman, D.T.S., 2016. Bats as Viral Reservoirs. *Annu. Rev. Virol.* 3, 77–99. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042203>
- He, X., Hong, W., Pan, X., Lu, G., Wei, X., 2021. SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention.

- MedComm 2, 838–845. <https://doi.org/10.1002/mco2.110>
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Bio/Technology* 10, 413–417. <https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. (N. Y.) 11, 1026–1030. <https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026>
- Hoffmann, B., Beer, M., Reid, S.M., Mertens, P., Oura, C.A.L., van Rijn, P.A., Slomka, M.J., Banks, J., Brown, I.H., Alexander, D.J., King, D.P., 2009. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet. Microbiol.* 139, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.034>
- Holland, M., Negrón, D., Mitchell, S., Dellinger, N., Ivancich, M., Barrus, T., Thomas, S., Jennings, K.W., Goodwin, B., Sozhamannan, S., 2020. BioLaboro: A bioinformatics system for detecting molecular assay signature erosion and designing new assays in response to emerging and reemerging pathogens. *bioRxiv* 2020.04.08.031963. <https://doi.org/10.1101/2020.04.08.031963>
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7276–7280. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7276>
- Howson, E.L.A., Orton, R.J., Mioulet, V., Lembo, T., King, D.P., Fowler, V.L., 2020. GoPrime: Development of an In Silico Framework to Predict the Performance of Real-Time PCR Primers and Probes Using Foot-and-Mouth Disease Virus as a Model. *Pathog. (Basel, Switzerland)* 9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040303>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., Gao, H., Guo, L., Xie, J., Wang, G., Jiang, R., Gao, Z., Jin, Q., Wang, J., Cao, B., 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)* 395, 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Jaimes, J.A., André, N.M., Chappie, J.S., Millet, J.K., Whittaker, G.R., 2020. Phylogenetic Analysis and Structural Modeling of SARS-CoV-2 Spike Protein Reveals an Evolutionary Distinct and Proteolytically Sensitive Activation Loop. *J. Mol. Biol.* 432, 3309–3325. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.04.009>
- Johnson, B.A., Xie, X., Kalveram, B., Lokugamage, K.G., Muruato, A., Zou, J., Zhang, X., Juelich, T., Smith, J.K., Zhang, L., Bopp, N., Schindewolf, C., Vu, M., Vanderheiden, A., Swetnam, D., Plante, J.A., Aguilar, P., Plante, K.S., Lee, B., Weaver, S.C., Suthar, M.S., Routh, A.L., Ren, P., Ku, Z., An, Z., Debbink, K., Shi, P.Y., Freiberg, A.N., Menachery, V.D., 2020. Furin Cleavage Site Is Key to SARS-CoV-2 Pathogenesis. *bioRxiv Prepr. Serv. Biol.* <https://doi.org/10.1101/2020.08.26.268854>
- Jones, B.A., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M.Y., McKeever, D., Mutua, F., Young, J.,

- McDermott, J., Pfeiffer, D.U., 2013. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 8399–8404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208059110>
- Kalendar, R., Khassenov, B., Ramankulov, Y., Samuilova, O., Ivanov, K.I., 2017. FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics* 109, 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.05.005>
- Kaur, G., Chandra, M., Dwivedi, P.N., Narang, D., 2016. Multiplex real-time PCR for identification of canine parvovirus antigenic types. *J. Virol. Methods* 233, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.02.013>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kelman, M., Ward, M.P., Barrs, V.R., Norris, J.M., 2019. The geographic distribution and financial impact of canine parvovirus in Australia. *Transbound. Emerg. Dis.* 66, 299–311. <https://doi.org/10.1111/tbed.13022>
- Khan, K.A., Cheung, P., 2021. Presence of mismatches between diagnostic PCR assays and coronavirus SARS-CoV-2 genome. *R. Soc. Open Sci.* 7, 200636. <https://doi.org/10.1098/rsos.200636>
- Khan, K.A., Cheung, P., 2020. Presence of mismatches between diagnostic PCR assays and coronavirus SARS-CoV-2 genome. *R. Soc. open Sci.* 7, 200636. <https://doi.org/10.1098/rsos.200636>
- Kuchinski, K.S., Jassem, A.N., Prystajecy, N.A., 2020. Assessing oligonucleotide designs from early lab developed PCR diagnostic tests for SARS-CoV-2 using the PCR_strainer pipeline. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 131, 104581. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104581>
- Kucirka, L.M., Lauer, S.A., Laeyendecker, O., Boon, D., Lessler, J., 2020. Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. *Ann. Intern. Med.* 173, 262–267. <https://doi.org/10.7326/M20-1495>
- Kwok, P.-Y., Chen, X., 2003. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr. Issues Mol. Biol.* 5, 43–60.
- Kwok, S., Kellogg, D.E., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., Sninsky, J.J., 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res.* 18, 999–1005. <https://doi.org/10.1093/nar/18.4.999>
- Lamarca, A.P., de Almeida, L.G.P., da Silva Francisco, R.J., Cavalcante, L., Machado, D.T., Brustolini, O., Gerber, A.L., Guimarães, A.P. de C., Policarpo, C., Oliveira, G. da S. de, Boullosa, L.T., Souza, I.V. de, Carvalho, E.M. de, Ribeiro, M.S., Carvalho, S., Silva, F.D. da, Garcia, M.H. de O., Souza, L.M. de, Silva, C.G. Da, Ribeiro, C.L.P., Cavalcanti, A.C., Mello, C.M.B. de, Tanuri, A., Vasconcelos, A.T.R., 2022. Genomic Surveillance Tracks the First Community Outbreak of the SARS-CoV-2 Delta (B.1.617.2) Variant in Brazil. *J. Virol.* <https://doi.org/10.1128/JVI.01228-21>
- Lamarca, A.P., de Almeida, L.G.P., Francisco, R. da S., Lima, L.F.A., Scortecci, K.C., Perez, V.P., Brustolini,

- O.J., Sousa, E.S.S., Secco, D.A., Santos, A.M.G., Albuquerque, G.R., Mariano, A.P.M., Maciel, B.M., Gerber, A.L., Guimarães, A.P. de C., Nascimento, P.R., Neto, F.P.F., Gadelha, S.R., Porto, L.C., Campana, E.H., Jeronimo, S.M.B., Vasconcelos, A.T.R., 2021. Genomic surveillance of SARS-CoV-2 tracks early interstate transmission of P.1 lineage and diversification within P.2 clade in Brazil. medRxiv 2021.03.21.21253418. <https://doi.org/10.1101/2021.03.21.21253418>
- Lamm, C.G., Rezabek, G.B., 2008. Parvovirus infection in domestic companion animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 38, 837–50, viii–ix. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.03.008>
- Lauring, A.S., Frydman, J., Andino, R., 2013. The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 327–336. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3003>
- Ledeker, B.M., De Long, S.K., 2013. The effect of multiple primer-template mismatches on quantitative PCR accuracy and development of a multi-primer set assay for accurate quantification of pcrA gene sequence variants. *J. Microbiol. Methods* 94, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.013>
- Lee, L.G., Connell, C.R., Bloch, W., 1993. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21, 3761–3766. <https://doi.org/10.1093/nar/21.16.3761>
- Lefever, S., Pattyn, F., Hellemans, J., Vandesompele, J., 2013. Single-nucleotide polymorphisms and other mismatches reduce performance of quantitative PCR assays. *Clin. Chem.* 59, 1470–1480. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.203653>
- Leister, D., Varotto, C., 2007. GST-PRIME: an algorithm for genome-wide primer design. *Methods Mol. Biol.* 402, 141–158. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_7
- Li, D., Wang, D., Dong, J., Wang, N., Huang, H., Xu, H., Xia, C., 2020. False-Negative Results of Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: Role of Deep-Learning-Based CT Diagnosis and Insights from Two Cases. *Korean J. Radiol.* 21, 505–508. <https://doi.org/10.3348/kjr.2020.0146>
- Li, Q., Wu, J., Nie, J., Zhang, Li, Hao, H., Liu, S., Zhao, C., Zhang, Q., Liu, H., Nie, L., Qin, H., Wang, M., Lu, Q., Li, Xiaoyu, Sun, Q., Liu, J., Zhang, Linqi, Li, Xuguang, Huang, W., Wang, Y., 2020. The Impact of Mutations in SARS-CoV-2 Spike on Viral Infectivity and Antigenicity. *Cell* 182, 1284-1294.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.012>
- Lim, J., Shin, S.G., Lee, S., Hwang, S., 2011. Design and use of group-specific primers and probes for real-time quantitative PCR. *Front. Environ. Sci. Eng. China* 5, 28–39. <https://doi.org/10.1007/s11783-011-0302-x>
- Liu, Y., Liu, J., Johnson, B.A., Xia, H., Ku, Z., Schindewolf, C., Widen, S.G., An, Z., Weaver, S.C., Menachery, V.D., Xie, X., Shi, P.-Y., 2021. Delta spike P681R mutation enhances SARS-CoV-2 fitness over Alpha variant. *bioRxiv Prepr. Serv. Biol.* <https://doi.org/10.1101/2021.08.12.456173>
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 4, 357–362. <https://doi.org/10.1101/gr.4.6.357>

- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W.J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E.C., Gao, G.F., Wu, G., Chen, W., Shi, W., Tan, W., 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)* 395, 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Lypai, M.V.N., Bianco, B., 2015. *Biologia molecular: métodos e interpretação*, 1st ed. Rio de Janeiro - Brasil.
- Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A., 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 30, 1292–1305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>
- Mani, K., Thirumalmuthu, K., Kathiresan, D.S., Ramalingam, S., Sankaran, R., Jeyaraj, S., 2021. In-silico analysis of Covid-19 genome sequences of Indian origin: Impact of mutations in identification of SARS-CoV-2. *Mol. Cell. Probes* 58, 101748. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2021.101748>
- Markovich, J.E., Stucker, K.M., Carr, A.H., Harbison, C.E., Scarlett, J.M., Parrish, C.R., 2012. Effects of canine parvovirus strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 241, 66–72. <https://doi.org/10.2460/javma.241.1.66>
- Martella, V., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2006. Evolution of CPV-2 and implication for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes* 33, 11–13. <https://doi.org/10.1007/s11262-005-0034-8>
- Martinez-Picado, J., Morales-Lopetegui, K., Villena, C., Gutiérrez, C., Izquierdo, N., Marfil, S., Clotet, B., Ruiz, L., 2005. Evidence for preferential genotyping of a minority human immunodeficiency virus population due to primer-template mismatching during PCR-based amplification. *J. Clin. Microbiol.* 43, 436–438. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.436-438.2005>
- Martins, A.F., Zavascki, A.P., Wink, P.L., Volpato, F.C.Z., Monteiro, F.L., Rosset, C., De-Paris, F., Ramos, Á.K., Barth, A.L., 2021. Detection of SARS-CoV-2 lineage P.1 in patients from a region with exponentially increasing hospitalisation rate, February 2021, Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* 26. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.12.2100276>
- Maya, L., Calleros, L., Francia, L., Hernández, M., Iraola, G., Panzera, Y., Sosa, K., Pérez, R., 2013. Phylodynamics analysis of canine parvovirus in Uruguay: evidence of two successive invasions by different variants. *Arch. Virol.* 158, 1133–1141. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1591-5>
- Mazzaferro, E.M., 2020. Update on Canine Parvoviral Enteritis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 50, 1307–1325. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.07.008>
- McCormick, K.D., Jacobs, J.L., Mellors, J.W., 2021. The emerging plasticity of SARS-CoV-2. *Science (80-.)*. 371, 1306–1308. <https://doi.org/10.1126/science.abg4493>
- McIntosh, K., Perlman, S., 2015. Coronaviruses, Including Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Middle East Respiratory Syndrome (MERS). *Mand. Douglas, Bennett's Princ. Pract. Infect. Dis.*

<https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00157-0>

- Ministério da Saúde, 2022. Boletim epidemiológico especial n° 95 [WWW Document]. URL <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/covid-19/2022/boletim-epidemiologico-no-95-boletim-coe-coronavirus.pdf>
- Ministério da Saúde, 2021a. Boletim epidemiológico especial n° 67 [WWW Document]. URL https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/junho/18/boletim_epidemiologico_covid_67.pdf (accessed 1.4.22).
- Ministério da Saúde, 2021b. Boletim epidemiológico especial n° 69 [WWW Document]. URL https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/julho/02/69_boletim_epidemiologico_covid_2junho.pdf (accessed 6.28.21).
- Miranda, C., Thompson, G., 2016. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *J. Gen. Virol.* 97, 2043–2057. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000540>
- Miranda, P., Weber, G., 2021. Thermodynamic evaluation of the impact of DNA mismatches in PCR-type SARS-CoV-2 primers and probes. *Mol. Cell. Probes* 56, 101707. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2021.101707>
- Mochizuki, M., San Gabriel, M.C., Nakatani, H., Yoshida, M., Harasawa, R., 1993. Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res. Vet. Sci.* 55, 60–63. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(93\)90035-e](https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90035-e)
- Naveca, F.G., Nascimento, V., de Souza, V.C., Corado, A. de L., Nascimento, F., Silva, G., Costa, Á., Duarte, D., Pessoa, K., Mejía, M., Brandão, M.J., Jesus, M., Gonçalves, L., da Costa, C.F., Sampaio, V., Barros, D., Silva, M., Mattos, T., Pontes, G., Abdalla, L., Santos, J.H., Arantes, I., Dezordi, F.Z., Siqueira, M.M., Wallau, G.L., Resende, P.C., Delatorre, E., Gräf, T., Bello, G., 2021. COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. *Nat. Med.* <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01378-7>
- Nicolelis, M.A.L., Raimundo, R.L.G., Peixoto, P.S., Andreazzi, C.S., 2021. The impact of super-spreader cities, highways, and intensive care availability in the early stages of the COVID-19 epidemic in Brazil. *Sci. Rep.* 11, 13001. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92263-3>
- Nogales, A., L DeDiego, M., 2019. Host Single Nucleotide Polymorphisms Modulating Influenza A Virus Disease in Humans. *Pathog. (Basel, Switzerland)* 8. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040168>
- Ong, S.W.X., Chiew, C.J., Ang, L.W., Mak, T.-M., Cui, L., Toh, M.P.H.S., Lim, Y.D., Lee, P.H., Lee, T.H., Chia, P.Y., Maurer-Stroh, S., Lin, R.T.P., Leo, Y.-S., Lee, V.J., Lye, D.C., Young, B.E., 2021. Clinical and virological features of SARS-CoV-2 variants of concern: a retrospective cohort study comparing B.1.1.7 (Alpha), B.1.315 (Beta), and B.1.617.2 (Delta). *Clin. Infect. Dis. an Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciab721>
- Pachetti, M., Marini, B., Benedetti, F., Giudici, F., Mauro, E., Storici, P., Masciovecchio, C., Angeletti, S., Ciccozzi, M., Gallo, R.C., Zella, D., Ippodrino, R., 2020. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include

- a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J. Transl. Med.* 18, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6>
- Parrish, C.R., 1999. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 69, 29–40. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(99\)00084-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(99)00084-x)
- Parrish, C.R., Aquadro, C.F., Strassheim, M.L., Evermann, J.F., Sgro, J.Y., Mohammed, H.O., 1991. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J. Virol.* 65, 6544–6552. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.12.6544-6552.1991>
- Parrish, C.R., Have, P., Foreyt, W.J., Evermann, J.F., Senda, M., Carmichael, L.E., 1988. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 5), 1111–1116. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-5-1111>
- Parrish, C.R., O’Connell, P.H., Evermann, J.F., Carmichael, L.E., 1985. Natural variation of canine parvovirus. *Science* 230, 1046–1048. <https://doi.org/10.1126/science.4059921>
- Peñarrubia, L., Ruiz, M., Porco, R., Rao, S.N., Juanola-Falgarona, M., Manissero, D., López-Fontanals, M., Pareja, J., 2020. Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. *Int. J. Infect. Dis.* 97, 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.027>
- Pereira, C.A., Monezi, T.A., Mehnert, D.U., D’Angelo, M., Durigon, E.L., 2000. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.* 75, 127–133. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00214-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00214-5)
- Persson, S., Karlsson, M., Borsch-Reniers, H., Ellström, P., Eriksson, R., Simonsson, M., 2019. Missing the Match Might Not Cost You the Game: Primer-Template Mismatches Studied in Different Hepatitis A Virus Variants. *Food Environ. Virol.* 11, 297–308. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09387-z>
- Phan, T., 2020. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infect. Genet. Evol.* 81, 104260. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104260>
- Phelan, J., Deelder, W., Ward, D., Campino, S., Hibberd, M.L., Clark, T.G., 2020. Controlling the SARS-CoV-2 outbreak, insights from large scale whole genome sequences generated across the world. *bioRxiv* 2020.04.28.066977. <https://doi.org/10.1101/2020.04.28.066977>
- Pinto, L.D., Streck, A.F., Gonçalves, K.R., Souza, C.K., Corbellini, Â.O., Corbellini, L.G., Canal, C.W., 2012. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Res.* 165, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.01.001>
- Pollock, R. V, 1982. Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Vet.* 72, 103–119.
- Ponce, D., 2020. The impact of coronavirus in Brazil: politics and the pandemic. *Nat. Rev. Nephrol.* 16, 483. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0327-0>
- Qi, S., Zhao, J., Guo, D., Sun, D., 2020. A Mini-Review on the Epidemiology of Canine Parvovirus in China.

- Front. Vet. Sci. 7, 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00005>
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., Fitzpatrick, E.S., Fanning, S., 2018. *Microbiologia veterinária essencial*, 2nd ed. E-book.
- Rahimi, A., Mirzazadeh, A., Tavakolpour, S., 2021. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. *Genomics* 113, 1221–1232. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.09.059>
- Ramanathan, M., Ferguson, I.D., Miao, W., Khavari, P.A., 2021. SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 spike variants bind human ACE2 with increased affinity. *Lancet. Infect. Dis.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00262-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00262-0)
- Ramírez-Bello, J., Jiménez-Morales, M., 2017. [Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases]. *Gac. Med. Mex.* 153, 238–250.
- Ramírez-Bello, J., Vargas-Alarcón, G., Tovilla-Zárate, C., Fragoso, J.M., 2013. [Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases]. *Gac. Med. Mex.* 149, 220–228.
- Rana, D.R., Pokhrel, N., 2020. Sequence mismatch in PCR probes may mask the COVID-19 detection in Nepal. *Mol. Cell. Probes* 53, 101599. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101599>
- Ranzani, O.T., Bastos, L.S.L., Gelli, J.G.M., Marchesi, J.F., Baião, F., Hamacher, S., Bozza, F.A., 2021. Characterisation of the first 250 000 hospital admissions for COVID-19 in Brazil: a retrospective analysis of nationwide data. *Lancet Respir. Med.* 9, 407–418. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30560-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30560-9)
- Rappolee, D.A., Brenner, C.A., Schultz, R., Mark, D., Werb, Z., 1988a. Developmental expression of PDGF, TGF-alpha, and TGF-beta genes in preimplantation mouse embryos. *Science* 241, 1823–1825. <https://doi.org/10.1126/science.3175624>
- Rappolee, D.A., Mark, D., Banda, M.J., Werb, Z., 1988b. Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 241, 708–712. <https://doi.org/10.1126/science.3041594>
- Rejali, N.A., Moric, E., Wittwer, C.T., 2018. The Effect of Single Mismatches on Primer Extension. *Clin. Chem.* 64, 801–809. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.282285>
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., Andrade, M.J., 2015. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods Mol. Biol.* 1275, 31–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3
- Rychlik, W., 2007. OLIGO 7 primer analysis software. *Methods Mol. Biol.* 402, 35–60. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_2
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–

491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- SantaLucia, J.J., 2007. Physical principles and visual-OMP software for optimal PCR design. *Methods Mol. Biol.* 402, 3–34. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_1
- Santana, W. de O., Lencina, M.M., Bertolazzi, S., Silveira, S., Streck, A.F., 2020. Parvovirus canino: uma abordagem evolutiva e clínica. *Med. Veterinária* 13, 526–533. <https://doi.org/10.26605/medvet-v13n4-3661>
- Santos, N.S. de O., Romanos, M.T.V., Wigg, M.D., Couceiro, J.N. dos S.S., 2021. *Virologia humana*, 4th ed. Rio de Janeiro, Brasil.
- Santos, R. da S., Bret, R.S.C., Moreira, A.C. de O.M., Campos, A.R., Silva, A.R.A.E., Lima, D.M., Tavares, K.C.S., 2020. In silico analysis of mismatches in RT-qPCR assays of 177 SARS-CoV-2 sequences from Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 53, e20200657. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0657-2020>
- Schmitz, S., Coenen, C., König, M., Thiel, H.-J., Neiger, R., 2009. Comparison of three rapid commercial Canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *J. Vet. diagnostic Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians, Inc* 21, 344–345. <https://doi.org/10.1177/104063870902100306>
- Shetty, B.D., Zachariah, A., Farver, T.B., Smith, B., Goldstein, T., Mazet, J.A.K., 2020. CARNIVORE PROTOPARVOVIRUS 1 (PARVOVIRUSES) AT THE DOMESTIC-WILD CARNIVORE INTERFACE IN INDIA. *J. zoo Wildl. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Zoo Vet.* 50, 1016–1020. <https://doi.org/10.1638/2018-0166>
- Shiehzaegan, S., Alaghemand, N., Fox, M., Venketaraman, V., 2021. Analysis of the Delta Variant B.1.617.2 COVID-19. *Clin. Pract.* 11, 778–784. <https://doi.org/10.3390/clinpract11040093>
- Simoska, O., Stevenson, K.J., 2019. Electrochemical sensors for rapid diagnosis of pathogens in real time. *Analyst* 144, 6461–6478. <https://doi.org/10.1039/C9AN01747J>
- Smith, G.J.D., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S.J., Worobey, M., Pybus, O.G., Ma, S.K., Cheung, C.L., Raghvani, J., Bhatt, S., Peiris, J.S.M., Guan, Y., Rambaut, A., 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459, 1122–1125. <https://doi.org/10.1038/nature08182>
- Srivastava, G.P., Xu, D., 2007. Genome-scale probe and primer design with PRIMEGENS. *Methods Mol. Biol.* 402, 159–176. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_8
- Stadhouders, R., Pas, S.D., Anber, J., Voermans, J., Mes, T.H.M., Schutten, M., 2010. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J. Mol. Diagn.* 12, 109–117. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090035>
- Starr, T.N., Greaney, A.J., Dingens, A.S., Bloom, J.D., 2021. Complete map of SARS-CoV-2 RBD mutations that escape the monoclonal antibody LY-CoV555 and its cocktail with LY-CoV016. *Cell reports. Med.* 2, 100255. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100255>

- Starr, T.N., Greaney, A.J., Hilton, S.K., Ellis, D., Crawford, K.H.D., Dingens, A.S., Navarro, M.J., Bowen, J.E., Tortorici, M.A., Walls, A.C., King, N.P., Veelsler, D., Bloom, J.D., 2020. Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. *Cell* 182, 1295-1310.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.012>
- Streck, A.F., Rüster, D., Truyen, U., Homeier, T., 2013. An updated TaqMan real-time PCR for canine and feline parvoviruses. *J. Virol. Methods* 193, 6–8. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.04.025>
- Sun, Y., Cheng, Y., Lin, P., Yi, L., Tong, M., Cao, Z., Wang, G., Li, S., Cheng, S., Yuan, W., Wang, J., 2018. A multiplex TaqMan real-time PCR for detection and differentiation of four antigenic types of canine parvovirus in China. *Mol. Cell. Probes* 38, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2018.02.004>
- Tang, J.W., Toovey, O.T.R., Harvey, K.N., Hui, D.D.S., 2021. Introduction of the South African SARS-CoV-2 variant 501Y.V2 into the UK. *J. Infect.* <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.01.007>
- Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., Giandhari, J., Doolabh, D., Pillay, S., San, E.J., Msomi, N., Mlisana, K., von Gottberg, A., Walaza, S., Allam, M., Ismail, A., Mohale, T., Glass, A.J., Engelbrecht, S., Van Zyl, G., Preiser, W., Petruccione, F., Sigal, A., Hardie, D., Marais, G., Hsiao, N.-Y., Korsman, S., Davies, M.-A., Tyers, L., Mudau, I., York, D., Maslo, C., Goedhals, D., Abrahams, S., Laguda-Akingba, O., Alisoltani-Dehkordi, A., Godzik, A., Wibmer, C.K., Sewell, B.T., Lourenço, J., Alcantara, L.C.J., Kosakovsky Pond, S.L., Weaver, S., Martin, D., Lessells, R.J., Bhiman, J.N., Williamson, C., de Oliveira, T., 2021. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* 592, 438–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9>
- Teng, S., Sobitan, A., Rhoades, R., Liu, D., Tang, Q., 2021. Systemic effects of missense mutations on SARS-CoV-2 spike glycoprotein stability and receptor-binding affinity. *Brief. Bioinform.* 22, 1239–1253. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa233>
- Tian, D., Sun, Y., Zhou, J., Ye, Q., 2021. The Global Epidemic of the SARS-CoV-2 Delta Variant, Key Spike Mutations and Immune Escape. *Front. Immunol.* 12, 751778. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.751778>
- Toms, D., Li, J., Cai, H.Y., 2020. Evaluation of WHO listed COVID-19 qPCR primers and probe in silico with 375 SERS-CoV-2 full genome sequences. *medRxiv* 2020.04.22.20075697. <https://doi.org/10.1101/2020.04.22.20075697>
- Truyen, U., 2006. Evolution of canine parvovirus--a need for new vaccines? *Vet. Microbiol.* 117, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.003>
- Truyen, U., Evermann, J.F., Vieler, E., Parrish, C.R., 1996. Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology* 215, 186–189. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0021>
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., Thiel, V., 2021. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Vanneste, K., Garland, L., Broeders, S., Van Gucht, S., Roosens, N.H., 2018. Application of whole genome data

- for in silico evaluation of primers and probes routinely employed for the detection of viral species by RT-qPCR using dengue virus as a case study. *BMC Bioinformatics* 19, 312. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2313-0>
- Vito, M., Alessandra, C., Annamaria, P., Giancarlo, B., Michele, C., Domenico, B., Donato, N., Maria, T., Canio, B., 2004. A Canine Parvovirus Mutant Is Spreading in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1333–1336. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1333-1336.2004>
- Vogels, C.B.F., Brito, A.F., Wyllie, A.L., Fauver, J.R., Ott, I.M., Kalinich, C.C., Petrone, M.E., Casanovas-Massana, A., Catherine Muenker, M., Moore, A.J., Klein, J., Lu, P., Lu-Culligan, A., Jiang, X., Kim, D.J., Kudo, E., Mao, T., Moriyama, M., Oh, J.E., Park, A., Silva, J., Song, E., Takahashi, T., Taura, M., Tokuyama, M., Venkataraman, A., Weizman, O.-E., Wong, P., Yang, Y., Cheemarla, N.R., White, E.B., Lapidus, S., Earnest, R., Geng, B., Vijayakumar, P., Odio, C., Fournier, J., Bermejo, S., Farhadian, S., Dela Cruz, C.S., Iwasaki, A., Ko, A.I., Landry, M.L., Foxman, E.F., Grubaugh, N.D., 2020. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nat. Microbiol.* 5, 1299–1305. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0761-6>
- Walter-Weingärtner, J., Bergmann, M., Weber, K., Truyen, U., Muresan, C., Hartmann, K., 2021. Comparison of Eight Commercially Available Faecal Point-of-Care Tests for Detection of Canine Parvovirus Antigen. *Viruses* 13. <https://doi.org/10.3390/v13102080>
- Wang, R., Zhang, W., Ye, R., Pan, Z., Li, G., Su, S., 2020. One-step multiplex TaqMan probe-based method for real-time PCR detection of four canine diarrhea viruses. *Mol. Cell. Probes* 53, 101618. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101618>
- Waters, D.L.E., Shapter, F.M., 2014. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods Mol. Biol.* 1099, 65–75. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_7
- Whiley, D.M., Sloots, T.P., 2005. Sequence variation in primer targets affects the accuracy of viral quantitative PCR. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 34, 104–107. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.02.010>
- WHO, 2021a. Status of COVID-19 Vaccines within WHO EUL/PQ evaluation process.
- WHO, 2021b. Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern [WWW Document]. URL [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern) (accessed 12.1.22).
- WHO, 2020. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report - 1, WHO.
- Wilkes, R.P., Lee, P.-Y.A., Tsai, Y.-L., Tsai, C.-F., Chang, H.-H., Chang, H.-F.G., Wang, H.-T.T., 2015. An insulated isothermal PCR method on a field-deployable device for rapid and sensitive detection of canine parvovirus type 2 at points of need. *J. Virol. Methods* 220, 35–38. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.04.007>
- Wolf, J.M., Streck, A.F., Fonseca, A., Ikuta, N., Simon, D., Lunge, V.R., 2021. Dissemination and evolution of

- SARS-CoV-2 in the early pandemic phase in South America. *J. Med. Virol.* 93, 4496–4507. <https://doi.org/10.1002/jmv.26967>
- Won, J., Lee, S., Park, M., Kim, T.Y., Park, M.G., Choi, B.Y., Kim, D., Chang, H., Kim, V.N., Lee, C.J., 2020. Development of a Laboratory-safe and Low-cost Detection Protocol for SARS-CoV-2 of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Exp. Neurobiol.* 29, 107–119. <https://doi.org/10.5607/en20009>
- World Health Organization, 2020a. WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020 [WWW Document]. URL <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
- World Health Organization, 2020b. Coronavirus Disease (COVID-19) Technical Guidance: Laboratory Testing for 2019-nCoV in Humans [WWW Document]. URL <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf> (accessed 5.5.21).
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J., Sheng, J., Quan, L., Xia, Z., Tan, W., Cheng, G., Jiang, T., 2020. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe* 27, 325–328. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yu, B., Zhang, C., 2011. In silico PCR analysis. *Methods Mol. Biol.* 760, 91–107. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-176-5_6
- Zaha, A., Ferreira, H.B., Passaglia, L.M.P., 2014. *Biologia Molecular Básica*, 5^a. ed.
- Zhang, L., Li, Q., Liang, Z., Li, T., Liu, S., Cui, Q., Nie, J., Wu, Q., Qu, X., Huang, W., Wang, Y., 2022. The significant immune escape of pseudotyped SARS-CoV-2 variant Omicron. *Emerg. Microbes Infect.* 11, 1–5. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.2017757>
- Zhang, Y.-Z., Holmes, E.C., 2020. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell* 181, 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.035>
- Zhao, J., Yan, X., Wu, W., 2011. [Origin and evolution of canine parvovirus--a review]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 51, 869–875.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G.F., Tan, W., 2020. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- Aldrich, S., 2020. Coronavirus qPCR Design Case Study & Related Products to Support SARS-CoV-2 Research [WWW Document]. URL <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/research-and-disease-areas/immunology-research/ncov-coronavirus> (accessed 5.5.21).

- Allard, M.W., Stevens, E.L., Brown, E.W., 2019. All for one and one for all: the true potential of whole-genome sequencing. *Lancet. Infect. Dis.* 19, 683–684. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30172-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30172-0)
- Álvarez-Díaz, D.A., Franco-Muñoz, C., Laiton-Donato, K., Usme-Ciro, J.A., Franco-Sierra, N.D., Flórez-Sánchez, A.C., Gómez-Rangel, S., Rodríguez-Calderon, L.D., Barbosa-Ramirez, J., Ospitia-Baez, E., Walteros, D.M., Ospina-Martinez, M.L., Mercado-Reyes, M., 2020. Molecular analysis of several in-house rRT-PCR protocols for SARS-CoV-2 detection in the context of genetic variability of the virus in Colombia. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 84, 104390. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104390>
- Andreson, R., Möls, T., Remm, M., 2008. Predicting failure rate of PCR in large genomes. *Nucleic Acids Res.* 36, e66. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn290>
- Appel, M.J., Scott, F.W., Carmichael, L.E., 1979. Isolation and immunisation studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* 105, 156–159. <https://doi.org/10.1136/vr.105.8.156>
- Arena, F., Pollini, S., Rossolini, G.M., Margaglione, M., 2021. Summary of the Available Molecular Methods for Detection of SARS-CoV-2 during the Ongoing Pandemic. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22031298>
- Ascoli, C.A., 2021. Could mutations of SARS-CoV-2 suppress diagnostic detection? *Nat. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00845-3>
- Aziz, A.B., Raqib, R., Khan, W.A., Rahman, M., Haque, R., Alam, M., Zaman, K., Ross, A.G., 2020. Integrated control of COVID-19 in resource-poor countries. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.009>
- Baral, P., Bhattarai, N., Hossen, M.L., Stebliankin, V., Gerstman, B.S., Narasimhan, G., Chapagain, P.P., 2021. Mutation-induced changes in the receptor-binding interface of the SARS-CoV-2 Delta variant B.1.617.2 and implications for immune evasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 574, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.08.036>
- Bourouiba, L., 2020. Turbulent Gas Clouds and Respiratory Pathogen Emissions: Potential Implications for Reducing Transmission of COVID-19. *JAMA* 323, 1837–1838. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.4756>
- Boyle, B., Dallaire, N., MacKay, J., 2009. Evaluation of the impact of single nucleotide polymorphisms and primer mismatches on quantitative PCR. *BMC Biotechnol.* 9, 75. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-75>
- Brito-Mutunayagam, S., Maloney, D., McAllister, G., Dewar, R., McHugh, M., Templeton, K., 2022. Rapid detection of SARS-CoV-2 variants using allele-specific PCR. *J. Virol. Methods* 114497. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114497>
- Brock, T.D., 1997. The value of basic research: discovery of *Thermus aquaticus* and other extreme thermophiles. *Genetics* 146, 1207–1210. <https://doi.org/10.1093/genetics/146.4.1207>
- Broeders, S., Garland, L., Fraiture, M.-A., Vandermassen, E., Suin, V., Vanhomwegen, J., Dupont-Rouzeyrol, M., Rousset, D., Van Gucht, S., Roosens, N., 2020. A new multiplex RT-qPCR method for the simultaneous

- detection and discrimination of Zika and chikungunya viruses. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 92, 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.12.028>
- Bru, D., Martin-Laurent, F., Philippot, L., 2008. Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA gene as an example. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1660–1663. <https://doi.org/10.1128/AEM.02403-07>
- Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N., Carmichael, L., 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82, 3021–3025. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-12-3021>
- Buss, L.F., Prete, C.A.J., Abraham, C.M.M., Mendrone, A.J., Salomon, T., de Almeida-Neto, C., França, R.F.O., Belotti, M.C., Carvalho, M.P.S.S., Costa, A.G., Crispim, M.A.E., Ferreira, S.C., Fraiji, N.A., Gurzenda, S., Whittaker, C., Kamaura, L.T., Takecian, P.L., da Silva Peixoto, P., Oikawa, M.K., Nishiya, A.S., Rocha, V., Salles, N.A., de Souza Santos, A.A., da Silva, M.A., Custer, B., Parag, K. V, Barral-Netto, M., Kraemer, M.U.G., Pereira, R.H.M., Pybus, O.G., Busch, M.P., Castro, M.C., Dye, C., Nascimento, V.H., Faria, N.R., Sabino, E.C., 2021. Three-quarters attack rate of SARS-CoV-2 in the Brazilian Amazon during a largely unmitigated epidemic. *Science* 371, 288–292. <https://doi.org/10.1126/science.abe9728>
- Callaway, E., 2021. Delta coronavirus variant: scientists brace for impact. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01696-3>
- Candido, D.D.S., Watts, A., Abade, L., Kraemer, M.U.G., Pybus, O.G., Croda, J., de Oliveira, W., Khan, K., Sabino, E.C., Faria, N.R., 2020. Routes for COVID-19 importation in Brazil. *J. Travel Med.* 27. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa042>
- CDC, 2022. What You Need to Know About Variants [WWW Document]. URL <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/about-variants.html> (accessed 3.18.22).
- Chaillon, A., Smith, D.M., 2021. Phylogenetic Analyses of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) B.1.1.7 Lineage Suggest a Single Origin Followed by Multiple Exportation Events Versus Convergent Evolution. *Clin. Infect. Dis. an Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 73, 2314–2317. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab265>
- Chan, J.F.-W., Kok, K.-H., Zhu, Z., Chu, H., To, K.K.-W., Yuan, S., Yuen, K.-Y., 2020a. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 221–236. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>
- Chan, J.F.-W., Yip, C.C.-Y., To, K.K.-W., Tang, T.H.-C., Wong, S.C.-Y., Leung, K.-H., Fung, A.Y.-F., Ng, A.C.-K., Zou, Z., Tsoi, H.-W., Choi, G.K.-Y., Tam, A.R., Cheng, V.C.-C., Chan, K.-H., Tsang, O.T.-Y., Yuen, K.-Y., 2020b. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 58. <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>
- Chen, J., Wang, R., Gilby, N.B., Wei, G.-W., 2022. Omicron Variant (B.1.1.529): Infectivity, Vaccine

- Breakthrough, and Antibody Resistance. *J. Chem. Inf. Model.* <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c01451>
- Chen, J., Wang, R., Wang, M., Wei, G.-W., 2020. Mutations Strengthened SARS-CoV-2 Infectivity. *J. Mol. Biol.* 432, 5212–5226. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.07.009>
- Choi, J.Y., Smith, D.M., 2021. SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei Med. J.* 62, 961–968. <https://doi.org/10.3349/ymj.2021.62.11.961>
- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., Yang, C.-H., 2013. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol. Lett.* 35, 1541–1549. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>
- Corman, V.M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D.K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M.L., Mulders, D.G., 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., Drosten, C., 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* 25. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Canuti, M., Chiorini, J.A., Eis-Hubinger, A.-M., Hughes, J., Mietzsch, M., Modha, S., Ogliastro, M., Pénczes, J.J., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Consortium, I.R., 2019. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *J. Gen. Virol.* 100, 367–368. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001212>
- D., B., F., M.-L., L., P., 2008. Quantification of the Detrimental Effect of a Single Primer-Template Mismatch by Real-Time PCR Using the 16S rRNA Gene as an Example. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1660–1663. <https://doi.org/10.1128/AEM.02403-07>
- Davi, M.J.P., Jeronimo, S.M.B., Lima, J.P.M.S., Lanza, D.C.F., 2021. Design and in silico validation of polymerase chain reaction primers to detect severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Sci. Rep.* 11, 12565. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91817-9>
- Davies, N.G., Abbott, S., Barnard, R.C., Jarvis, C.I., Kucharski, A.J., Munday, J.D., Pearson, C.A.B., Russell, T.W., Tully, D.C., Washburne, A.D., Wenseleers, T., Gimma, A., Waites, W., Wong, K.L.M., van Zandvoort, K., Silverman, J.D., Diaz-Ordaz, K., Keogh, R., Eggo, R.M., Funk, S., Jit, M., Atkins, K.E., Edmunds, W.J., 2021. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science* 372. <https://doi.org/10.1126/science.abg3055>
- Day, M.J., Horzinek, M.C., Schultz, R.D., Squires, R.A., 2016. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *J. Small Anim. Pract.* 57, 4–8. <https://doi.org/10.1111/jsap.12431>
- De la Torre, D., Mafla, E., Puga, B., Erazo, L., Astolfi-Ferreira, C., Ferreira, A.P., 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, 480–487. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.480-487>
- de Oliveira, P.S.B., Cargnelutti, J.F., Masuda, E.K., Weiblen, R., Flores, E.F., 2019. New variants of canine parvovirus in dogs in southern Brazil. *Arch. Virol.* 164, 1361–1369. <https://doi.org/10.1007/s00705-019->

04198-w

- de Oliveira Santana, W., Silveira, V.P., Wolf, J.M., Kipper, D., Echeverrigaray, S., Canal, C.W., Truyen, U., Lunge, V.R., Streck, A.F., 2022. Molecular phylogenetic assessment of the canine parvovirus 2 worldwide and analysis of the genetic diversity and temporal spreading in Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 98, 105225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105225>
- de Souza, F.S.H., Hojo-Souza, N.S., da Silva, C.M., Guidoni, D.L., 2021. Second wave of COVID-19 in Brazil: younger at higher risk. *Eur. J. Epidemiol.* 36, 441–443. <https://doi.org/10.1007/s10654-021-00750-8>
- Decaro, N., Buonavoglia, C., 2012. Canine parvovirus--a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet. Microbiol.* 155, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.007>
- Decaro, N., Buonavoglia, C., Barrs, V.R., 2020. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication? *Vet. Microbiol.* 247, 108760. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108760>
- Decaro, N., Cirone, F., Desario, C., Elia, G., Lorusso, E., Colaianni, M.L., Martella, V., Buonavoglia, C., 2009a. Severe parvovirus in a 12-year-old dog that had been repeatedly vaccinated. *Vet. Rec.* 164, 593–595. <https://doi.org/10.1136/vr.164.19.593>
- Decaro, N., Crescenzo, G., Desario, C., Cavalli, A., Losurdo, M., Colaianni, M.L., Ventrella, G., Rizzi, S., Aulicino, S., Lucente, M.S., Buonavoglia, C., 2014. Long-term viremia and fecal shedding in pups after modified-live canine parvovirus vaccination. *Vaccine* 32, 3850–3853. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.050>
- Decaro, N., Desario, C., Billi, M., Lorusso, E., Colaianni, M.L., Colao, V., Elia, G., Ventrella, G., Kusi, I., Bo, S., Buonavoglia, C., 2013. Evaluation of an in-clinic assay for the diagnosis of canine parvovirus. *Vet. J.* 198, 504–507. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.032>
- Decaro, N., Desario, C., Parisi, A., Martella, V., Lorusso, A., Miccolupo, A., Mari, V., Colaianni, M.L., Cavalli, A., Di Trani, L., Buonavoglia, C., 2009b. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology* 385, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.016>
- Decaro, N., Elia, G., Desario, C., Roperto, S., Martella, V., Campolo, M., Lorusso, A., Cavalli, A., Buonavoglia, C., 2006. A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. *J. Virol. Methods* 136, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.03.030>
- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Desario, C., Campolo, M., Trani, L. Di, Tarsitano, E., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2005. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet. Microbiol.* 105, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.018>
- Deng, X., Garcia-Knight, M.A., Khalid, M.M., Servellita, V., Wang, C., Morris, M.K., Sotomayor-González, A., Glasner, D.R., Reyes, K.R., Gliwa, A.S., Reddy, N.P., Sanchez San Martin, C., Federman, S., Cheng, J., Balcersek, J., Taylor, J., Streithorst, J.A., Miller, S., Sreekumar, B., Chen, P.-Y., Schulze-Gahmen, U., Taha, T.Y., Hayashi, J.M., Simoneau, C.R., Kumar, G.R., McMahon, S., Lidsky, P. V., Xiao, Y., Hemarajata, P.,

- Green, N.M., Espinosa, A., Kath, C., Haw, M., Bell, J., Hacker, J.K., Hanson, C., Wadford, D.A., Anaya, C., Ferguson, D., Frankino, P.A., Shivram, H., Lareau, L.F., Wyman, S.K., Ott, M., Andino, R., Chiu, C.Y., 2021. Transmission, infectivity, and neutralization of a spike L452R SARS-CoV-2 variant. *Cell* 184, 3426–3437.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.025>
- Dennehy, J.J., 2017. Evolutionary ecology of virus emergence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1389, 124–146. <https://doi.org/10.1111/nyas.13304>
- Dowgier, G., Mari, V., Losurdo, M., Larocca, V., Colaianni, M.L., Cirone, F., Lucente, M.S., Martella, V., Buonavoglia, C., Decaro, N., 2016. A duplex real-time PCR assay based on TaqMan technology for simultaneous detection and differentiation of canine adenovirus types 1 and 2. *J. Virol. Methods* 234, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.03.011>
- Dramé, M., Tabue Teguo, M., Proye, E., Hequet, F., Hentzien, M., Kanagaratnam, L., Godaert, L., 2020. Should RT-PCR be considered a gold standard in the diagnosis of COVID-19? *J. Med. Virol.* 92, 2312–2313. <https://doi.org/10.1002/jmv.25996>
- ECDC- European Center for Disease Prevention and Control., 2021. Threat assessment brief: emergence of SARS-CoV-2 B.1.617 variants in India and situation in the EU/EEA. [WWW Document]. URL <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-emergence-sars-cov-2-b1617-variants> (accessed 3.20.22).
- Elena, S.F., Bedhomme, S., Carrasco, P., Cuevas, J.M., de la Iglesia, F., Lafforgue, G., Lalić, J., Pròsper, A., Tromas, N., Zwart, M.P., 2011. The evolutionary genetics of emerging plant RNA viruses. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 24, 287–293. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-10-0214>
- Elia, G., Cavalli, A., Desario, C., Lorusso, E., Lucente, M.S., Decaro, N., Martella, V., Buonavoglia, C., 2007. Detection of infectious canine parvovirus type 2 by mRNA real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 146, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.06.017>
- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R. 3rd, Smith, T.F., 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 165–256. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006>
- Faria, N.R., Mellan, T.A., Whittaker, C., Claro, I.M., Candido, D. da S., Mishra, S., Crispim, M.A.E., Sales, F.C., Hawryluk, I., McCrone, J.T., Hulswit, R.J.G., Franco, L.A.M., Ramundo, M.S., de Jesus, J.G., Andrade, P.S., Coletti, T.M., Ferreira, G.M., Silva, C.A.M., Manuli, E.R., Pereira, R.H.M., Peixoto, P.S., Kraemer, M.U., Gaburo, N., Camilo, C. da C., Hoeltgebaum, H., Souza, W.M., Rocha, E.C., de Souza, L.M., de Pinho, M.C., Araujo, L.J.T., Malta, F.S. V, de Lima, A.B., Silva, J. do P., Zauli, D.A.G., Ferreira, A.C. de S., Schnekenberg, R.P., Laydon, D.J., Walker, P.G.T., Schlüter, H.M., dos Santos, A.L.P., Vidal, M.S., Del Caro, V.S., Filho, R.M.F., dos Santos, H.M., Aguiar, R.S., Modena, J.L.P., Nelson, B., Hay, J.A., Monod, M., Miscouridou, X., Coupland, H., Sonabend, R., Vollmer, M., Gandy, A., Suchard, M.A., Bowden, T.A., Pond, S.L.K., Wu, C.-H., Ratmann, O., Ferguson, N.M., Dye, C., Loman, N.J., Lemey, P., Rambaut, A.,

- Fraiji, N.A., Carvalho, M. do P.S.S., Pybus, O.G., Flaxman, S., Bhatt, S., Sabino, E.C., 2021. Genomics and epidemiology of a novel SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* (80-.). 2021.02.26.21252554. <https://doi.org/10.1101/2021.02.26.21252554>
- Fischer, C., de Lamballerie, X., Drexler, J.F., 2019. Enhanced Molecular Surveillance of Chikungunya Virus. *mSphere* 4. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00295-19>
- Freisl, M., Speck, S., Truyen, U., Reese, S., Proksch, A.-L., Hartmann, K., 2017. Faecal shedding of canine parvovirus after modified-live vaccination in healthy adult dogs. *Vet. J.* 219, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.11.011>
- Funk, T., Pharris, A., Spiteri, G., Bundle, N., Melidou, A., Carr, M., Gonzalez, G., Garcia-Leon, A., Crispie, F., O'Connor, L., Murphy, N., Mossong, J., Vergison, A., Wienecke-Baldacchino, A.K., Abdelrahman, T., Riccardo, F., Stefanelli, P., Di Martino, A., Bella, A., Lo Presti, A., Casaca, P., Moreno, J., Borges, V., Isidro, J., Ferreira, R., Gomes, J.P., Dotsenko, L., Suija, H., Epstein, J., Sadikova, O., Sepp, H., Ikonen, N., Savolainen-Kopra, C., Blomqvist, S., Möttönen, T., Helve, O., Gomes-Dias, J., Adlhoch, C., 2021. Characteristics of SARS-CoV-2 variants of concern B.1.1.7, B.1.351 or P.1: data from seven EU/EEA countries, weeks 38/2020 to 10/2021. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* 26. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.16.2100348>
- Gand, M., Vanneste, K., Thomas, I., Van Gucht, S., Capron, A., Herman, P., Roosens, N.H.C., De Keersmaecker, S.C.J., 2021. Deepening of In Silico Evaluation of SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Assays in the Context of New Variants. *Genes (Basel)*. 12. <https://doi.org/10.3390/genes12040565>
- Gand, M., Vanneste, K., Thomas, I., Van Gucht, S., Capron, A., Herman, P., Roosens, N.H.C., De Keersmaecker, S.C.J., 2020. Use of Whole Genome Sequencing Data for a First in Silico Specificity Evaluation of the RT-qPCR Assays Used for SARS-CoV-2 Detection. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5585. <https://doi.org/10.3390/ijms211155585>
- Geng, Y., Guo, D., Li, C., Wang, E., Wei, S., Wang, Z., Yao, S., Zhao, X., Su, M., Wang, X., Wang, J., Wu, R., Feng, L., Sun, D., 2015. Co-Circulation of the Rare CPV-2c with Unique Gln370Arg Substitution, New CPV-2b with Unique Thr440Ala Substitution, and New CPV-2a with High Prevalence and Variation in Heilongjiang Province, Northeast China. *PLoS One* 10, e0137288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137288>
- Gerlach, M., Proksch, A.-L., Dörfelt, R., Unterer, S., Hartmann, K., 2020. [Therapy of canine parvovirus infection - review and current insights]. *Tierarztl. Prax. Ausg. K. Kleintiere. Heimtiere.* 48, 26–37. <https://doi.org/10.1055/a-1020-3341>
- Ghedira, R., Papazova, N., Vuylsteke, M., Ruttink, T., Taverniers, I., De Loose, M., 2009. Assessment of primer/template mismatch effects on real-time PCR amplification of target taxa for GMO quantification. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9370–9377. <https://doi.org/10.1021/jf901976a>
- Giovanetti, M., Benedetti, F., Campisi, G., Ciccozzi, A., Fabris, S., Ceccarelli, G., Tambone, V., Caruso, A., Angeletti, S., Zella, D., Ciccozzi, M., 2021. Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome

- variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 538, 88–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.102>
- Giraldo-Ramirez, S., Rendon-Marin, S., Ruiz-Saenz, J., 2020. Phylogenetic, Evolutionary and Structural Analysis of Canine Parvovirus (CPV-2) Antigenic Variants Circulating in Colombia. *Viruses* 12. <https://doi.org/10.3390/v12050500>
- GISAID, n.d. GISAID Initiative [WWW Document]. URL <https://www.gisaid.org/> (accessed 4.1.22).
- Goddard, A., Leisewitz, A.L., 2010. Canine parvovirus. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 40, 1041–1053. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.007>
- Gräf, T., Bello, G., Venas, T., Pereira, E., Paixão, A., Appolinario, L., Lopes, R., Mendonça, A., Rocha, A., Motta, F., Gregianini, T., Salvato, R., Fernandes, S., Rovaris, D., Cavalcanti, A., Leite, A., Riediger, I., Debur, M., Bernardes, A., Resende, P., 2021. Identification of SARS-CoV-2 P.1-related lineages in Brazil provides new insights about the mechanisms of emergence of Variants of Concern. *Res. Sq.* <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-580195/v1>
- Green, M.R., Sambrook, J., 2019. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2019. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>
- Gu, H., Krishnan, P., Ng, D.Y.M., Chang, L.D.J., Liu, G.Y.Z., Cheng, S.S.M., Hui, M.M.Y., Fan, M.C.Y., Wan, J.H.L., Lau, L.H.K., Cowling, B.J., Peiris, M., Poon, L.L.M., 2022. Probable Transmission of SARS-CoV-2 Omicron Variant in Quarantine Hotel, Hong Kong, China, November 2021. *Emerg. Infect. Dis.* 28, 460–462. <https://doi.org/10.3201/eid2802.212422>
- Hagen, A., 2021. How Dangerous Is the Delta Variant (B.1.617.2)? *Am. Soc. Microbiol.*
- Hale, R., Crowley, P., Dervisevic, S., Coupland, L., Cliff, P.R., Ebie, S., Snell, L.B., Paul, J., Williams, C., Randell, P., Pond, M., Stanley, K., 2021. Development of a Multiplex Tandem PCR (MT-PCR) Assay for the Detection of Emerging SARS-CoV-2 Variants. *Viruses* 13. <https://doi.org/10.3390/v13102028>
- Hanna, S.E., Connor, C.J., Wang, H.H., 2005. Real-time Polymerase Chain Reaction for the Food Microbiologist: Technologies, Applications, and Limitations. *J. Food Sci.* 70, R49–R53.
- Hasöksüz, M., Kiliç, S., Saraç, F., 2020. Coronaviruses and SARS-COV-2. *Turkish J. Med. Sci.* 50, 549–556. <https://doi.org/10.3906/sag-2004-127>
- Hayman, D.T.S., 2016. Bats as Viral Reservoirs. *Annu. Rev. Virol.* 3, 77–99. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042203>
- He, X., Hong, W., Pan, X., Lu, G., Wei, X., 2021. SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention. *MedComm* 2, 838–845. <https://doi.org/10.1002/mco2.110>
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Bio/Technology* 10, 413–417. <https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>

- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. (N. Y). 11, 1026–1030. <https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026>
- Hoffmann, B., Beer, M., Reid, S.M., Mertens, P., Oura, C.A.L., van Rijn, P.A., Slomka, M.J., Banks, J., Brown, I.H., Alexander, D.J., King, D.P., 2009. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet. Microbiol.* 139, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.034>
- Holland, M., Negrón, D., Mitchell, S., Dellinger, N., Ivancich, M., Barrus, T., Thomas, S., Jennings, K.W., Goodwin, B., Sozhamannan, S., 2020. BioLaboro: A bioinformatics system for detecting molecular assay signature erosion and designing new assays in response to emerging and reemerging pathogens. *bioRxiv* 2020.04.08.031963. <https://doi.org/10.1101/2020.04.08.031963>
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7276–7280. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7276>
- Howson, E.L.A., Orton, R.J., Mioulet, V., Lembo, T., King, D.P., Fowler, V.L., 2020. GoPrime: Development of an In Silico Framework to Predict the Performance of Real-Time PCR Primers and Probes Using Foot-and-Mouth Disease Virus as a Model. *Pathog. (Basel, Switzerland)* 9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040303>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., Gao, H., Guo, L., Xie, J., Wang, G., Jiang, R., Gao, Z., Jin, Q., Wang, J., Cao, B., 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)* 395, 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Jaimes, J.A., André, N.M., Chappie, J.S., Millet, J.K., Whittaker, G.R., 2020. Phylogenetic Analysis and Structural Modeling of SARS-CoV-2 Spike Protein Reveals an Evolutionary Distinct and Proteolytically Sensitive Activation Loop. *J. Mol. Biol.* 432, 3309–3325. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.04.009>
- Johnson, B.A., Xie, X., Kalveram, B., Lokugamage, K.G., Muruato, A., Zou, J., Zhang, X., Juelich, T., Smith, J.K., Zhang, L., Bopp, N., Schindewolf, C., Vu, M., Vanderheiden, A., Swetnam, D., Plante, J.A., Aguilar, P., Plante, K.S., Lee, B., Weaver, S.C., Suthar, M.S., Routh, A.L., Ren, P., Ku, Z., An, Z., Debbink, K., Shi, P.Y., Freiberg, A.N., Menachery, V.D., 2020. Furin Cleavage Site Is Key to SARS-CoV-2 Pathogenesis. *bioRxiv Prepr. Serv. Biol.* <https://doi.org/10.1101/2020.08.26.268854>
- Jones, B.A., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M.Y., McKeever, D., Mutua, F., Young, J., McDermott, J., Pfeiffer, D.U., 2013. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 8399–8404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208059110>
- Kalendar, R., Khassenov, B., Ramankulov, Y., Samuilova, O., Ivanov, K.I., 2017. FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics* 109, 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.05.005>

- Kaur, G., Chandra, M., Dwivedi, P.N., Narang, D., 2016. Multiplex real-time PCR for identification of canine parvovirus antigenic types. *J. Virol. Methods* 233, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.02.013>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kelman, M., Ward, M.P., Barrs, V.R., Norris, J.M., 2019. The geographic distribution and financial impact of canine parvovirus in Australia. *Transbound. Emerg. Dis.* 66, 299–311. <https://doi.org/10.1111/tbed.13022>
- Khan, K.A., Cheung, P., 2021. Presence of mismatches between diagnostic PCR assays and coronavirus SARS-CoV-2 genome. *R. Soc. Open Sci.* 7, 200636. <https://doi.org/10.1098/rsos.200636>
- Khan, K.A., Cheung, P., 2020. Presence of mismatches between diagnostic PCR assays and coronavirus SARS-CoV-2 genome. *R. Soc. open Sci.* 7, 200636. <https://doi.org/10.1098/rsos.200636>
- Kuchinski, K.S., Jassem, A.N., Prystajecy, N.A., 2020. Assessing oligonucleotide designs from early lab developed PCR diagnostic tests for SARS-CoV-2 using the PCR_strainer pipeline. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 131, 104581. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104581>
- Kucirka, L.M., Lauer, S.A., Laeyendecker, O., Boon, D., Lessler, J., 2020. Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. *Ann. Intern. Med.* 173, 262–267. <https://doi.org/10.7326/M20-1495>
- Kwok, P.-Y., Chen, X., 2003. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr. Issues Mol. Biol.* 5, 43–60.
- Kwok, S., Kellogg, D.E., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., Sninsky, J.J., 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res.* 18, 999–1005. <https://doi.org/10.1093/nar/18.4.999>
- Lamarca, A.P., de Almeida, L.G.P., da Silva Francisco, R.J., Cavalcante, L., Machado, D.T., Brustolini, O., Gerber, A.L., Guimarães, A.P. de C., Policarpo, C., Oliveira, G. da S. de, Boullosa, L.T., Souza, I.V. de, Carvalho, E.M. de, Ribeiro, M.S., Carvalho, S., Silva, F.D. da, Garcia, M.H. de O., Souza, L.M. de, Silva, C.G. Da, Ribeiro, C.L.P., Cavalcanti, A.C., Mello, C.M.B. de, Tanuri, A., Vasconcelos, A.T.R., 2022. Genomic Surveillance Tracks the First Community Outbreak of the SARS-CoV-2 Delta (B.1.617.2) Variant in Brazil. *J. Virol.* <https://doi.org/10.1128/JVI.01228-21>
- Lamarca, A.P., de Almeida, L.G.P., Francisco, R. da S., Lima, L.F.A., Scortecci, K.C., Perez, V.P., Brustolini, O.J., Sousa, E.S.S., Secco, D.A., Santos, A.M.G., Albuquerque, G.R., Mariano, A.P.M., Maciel, B.M., Gerber, A.L., Guimarães, A.P. de C., Nascimento, P.R., Neto, F.P.F., Gadelha, S.R., Porto, L.C., Campana, E.H., Jeronimo, S.M.B., Vasconcelos, A.T.R., 2021. Genomic surveillance of SARS-CoV-2 tracks early interstate transmission of P.1 lineage and diversification within P.2 clade in Brazil. *medRxiv* 2021.03.21.21253418. <https://doi.org/10.1101/2021.03.21.21253418>
- Lamm, C.G., Rezabek, G.B., 2008. Parvovirus infection in domestic companion animals. *Vet. Clin. North Am.*

- Small Anim. Pract. 38, 837–50, viii–ix. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.03.008>
- Lauring, A.S., Frydman, J., Andino, R., 2013. The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 327–336. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3003>
- Ledeker, B.M., De Long, S.K., 2013. The effect of multiple primer-template mismatches on quantitative PCR accuracy and development of a multi-primer set assay for accurate quantification of pcrA gene sequence variants. *J. Microbiol. Methods* 94, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.013>
- Lee, L.G., Connell, C.R., Bloch, W., 1993. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21, 3761–3766. <https://doi.org/10.1093/nar/21.16.3761>
- Lefever, S., Pattyn, F., Hellemans, J., Vandesompele, J., 2013. Single-nucleotide polymorphisms and other mismatches reduce performance of quantitative PCR assays. *Clin. Chem.* 59, 1470–1480. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.203653>
- Leister, D., Varotto, C., 2007. GST-PRIME: an algorithm for genome-wide primer design. *Methods Mol. Biol.* 402, 141–158. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_7
- Li, D., Wang, D., Dong, J., Wang, N., Huang, H., Xu, H., Xia, C., 2020. False-Negative Results of Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: Role of Deep-Learning-Based CT Diagnosis and Insights from Two Cases. *Korean J. Radiol.* 21, 505–508. <https://doi.org/10.3348/kjr.2020.0146>
- Li, Q., Wu, J., Nie, J., Zhang, Li, Hao, H., Liu, S., Zhao, C., Zhang, Q., Liu, H., Nie, L., Qin, H., Wang, M., Lu, Q., Li, Xiaoyu, Sun, Q., Liu, J., Zhang, Linqi, Li, Xuguang, Huang, W., Wang, Y., 2020. The Impact of Mutations in SARS-CoV-2 Spike on Viral Infectivity and Antigenicity. *Cell* 182, 1284-1294.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.012>
- Lim, J., Shin, S.G., Lee, S., Hwang, S., 2011. Design and use of group-specific primers and probes for real-time quantitative PCR. *Front. Environ. Sci. Eng. China* 5, 28–39. <https://doi.org/10.1007/s11783-011-0302-x>
- Liu, Y., Liu, J., Johnson, B.A., Xia, H., Ku, Z., Schindewolf, C., Widen, S.G., An, Z., Weaver, S.C., Menachery, V.D., Xie, X., Shi, P.-Y., 2021. Delta spike P681R mutation enhances SARS-CoV-2 fitness over Alpha variant. *bioRxiv Prepr. Serv. Biol.* <https://doi.org/10.1101/2021.08.12.456173>
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 4, 357–362. <https://doi.org/10.1101/gr.4.6.357>
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W.J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E.C., Gao, G.F., Wu, G., Chen, W., Shi, W., Tan, W., 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)* 395, 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)

- Lypai, M.V.N., Bianco, B., 2015. *Biologia molecular: métodos e interpretação*, 1st ed. Rio de Janeiro - Brasil.
- Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A., 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 30, 1292–1305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>
- Mani, K., Thirumalmuthu, K., Kathiresan, D.S., Ramalingam, S., Sankaran, R., Jeyaraj, S., 2021. In-silico analysis of Covid-19 genome sequences of Indian origin: Impact of mutations in identification of SARS-Co-V2. *Mol. Cell. Probes* 58, 101748. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2021.101748>
- Markovich, J.E., Stucker, K.M., Carr, A.H., Harbison, C.E., Scarlett, J.M., Parrish, C.R., 2012. Effects of canine parvovirus strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 241, 66–72. <https://doi.org/10.2460/javma.241.1.66>
- Martella, V., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2006. Evolution of CPV-2 and implication for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes* 33, 11–13. <https://doi.org/10.1007/s11262-005-0034-8>
- Martinez-Picado, J., Morales-Lopetegi, K., Villena, C., Gutiérrez, C., Izquierdo, N., Marfil, S., Clotet, B., Ruiz, L., 2005. Evidence for preferential genotyping of a minority human immunodeficiency virus population due to primer-template mismatching during PCR-based amplification. *J. Clin. Microbiol.* 43, 436–438. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.436-438.2005>
- Martins, A.F., Zavascki, A.P., Wink, P.L., Volpato, F.C.Z., Monteiro, F.L., Rosset, C., De-Paris, F., Ramos, Á.K., Barth, A.L., 2021. Detection of SARS-CoV-2 lineage P.1 in patients from a region with exponentially increasing hospitalisation rate, February 2021, Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* 26. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.12.2100276>
- Maya, L., Calleros, L., Francia, L., Hernández, M., Iraola, G., Panzera, Y., Sosa, K., Pérez, R., 2013. Phylodynamics analysis of canine parvovirus in Uruguay: evidence of two successive invasions by different variants. *Arch. Virol.* 158, 1133–1141. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1591-5>
- Mazzaferro, E.M., 2020. Update on Canine Parvoviral Enteritis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 50, 1307–1325. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.07.008>
- McCormick, K.D., Jacobs, J.L., Mellors, J.W., 2021. The emerging plasticity of SARS-CoV-2. *Science* (80-.). 371, 1306–1308. <https://doi.org/10.1126/science.abg4493>
- McIntosh, K., Perlman, S., 2015. Coronaviruses, Including Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Middle East Respiratory Syndrome (MERS). *Mand. Douglas, Bennett's Princ. Pract. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00157-0>
- Ministério da Saúde, 2022. Boletim epidemiológico especial n° 95 [WWW Document]. URL <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/covid-19/2022/boletim-epidemiologico-no-95-boletim-coe-coronavirus.pdf>
- Ministério da Saúde, 2021a. Boletim epidemiológico especial n° 67 [WWW Document]. URL https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/junho/18/boletim_epidemiologico_covid_67.pdf (accessed

1.4.22).

- Ministério da Saúde, 2021b. Boletim epidemiológico especial n° 69 [WWW Document]. URL https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/julho/02/69_boletim_epidemiologico_covid_2junho.pdf (accessed 6.28.21).
- Miranda, C., Thompson, G., 2016. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *J. Gen. Virol.* 97, 2043–2057. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000540>
- Miranda, P., Weber, G., 2021. Thermodynamic evaluation of the impact of DNA mismatches in PCR-type SARS-CoV-2 primers and probes. *Mol. Cell. Probes* 56, 101707. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2021.101707>
- Mochizuki, M., San Gabriel, M.C., Nakatani, H., Yoshida, M., Harasawa, R., 1993. Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res. Vet. Sci.* 55, 60–63. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(93\)90035-e](https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90035-e)
- Naveca, F.G., Nascimento, V., de Souza, V.C., Corado, A. de L., Nascimento, F., Silva, G., Costa, Á., Duarte, D., Pessoa, K., Mejía, M., Brandão, M.J., Jesus, M., Gonçalves, L., da Costa, C.F., Sampaio, V., Barros, D., Silva, M., Mattos, T., Pontes, G., Abdalla, L., Santos, J.H., Arantes, I., Dezordi, F.Z., Siqueira, M.M., Wallau, G.L., Resende, P.C., Delatorre, E., Gräf, T., Bello, G., 2021. COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. *Nat. Med.* <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01378-7>
- Nicolelis, M.A.L., Raimundo, R.L.G., Peixoto, P.S., Andreazzi, C.S., 2021. The impact of super-spreader cities, highways, and intensive care availability in the early stages of the COVID-19 epidemic in Brazil. *Sci. Rep.* 11, 13001. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92263-3>
- Nogales, A., L DeDiego, M., 2019. Host Single Nucleotide Polymorphisms Modulating Influenza A Virus Disease in Humans. *Pathog. (Basel, Switzerland)* 8. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040168>
- Ong, S.W.X., Chiew, C.J., Ang, L.W., Mak, T.-M., Cui, L., Toh, M.P.H.S., Lim, Y.D., Lee, P.H., Lee, T.H., Chia, P.Y., Maurer-Stroh, S., Lin, R.T.P., Leo, Y.-S., Lee, V.J., Lye, D.C., Young, B.E., 2021. Clinical and virological features of SARS-CoV-2 variants of concern: a retrospective cohort study comparing B.1.1.7 (Alpha), B.1.315 (Beta), and B.1.617.2 (Delta). *Clin. Infect. Dis. an Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciab721>
- Pachetti, M., Marini, B., Benedetti, F., Giudici, F., Mauro, E., Storici, P., Masciovecchio, C., Angeletti, S., Ciccozzi, M., Gallo, R.C., Zella, D., Ippodrino, R., 2020. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J. Transl. Med.* 18, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6>
- Parrish, C.R., 1999. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 69, 29–40. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(99\)00084-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(99)00084-x)
- Parrish, C.R., Aquadro, C.F., Strassheim, M.L., Evermann, J.F., Sgro, J.Y., Mohammed, H.O., 1991. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J. Virol.* 65, 6544–6552.

<https://doi.org/10.1128/JVI.65.12.6544-6552.1991>

- Parrish, C.R., Have, P., Foreyt, W.J., Evermann, J.F., Senda, M., Carmichael, L.E., 1988. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 5), 1111–1116. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-5-1111>
- Parrish, C.R., O’Connell, P.H., Evermann, J.F., Carmichael, L.E., 1985. Natural variation of canine parvovirus. *Science* 230, 1046–1048. <https://doi.org/10.1126/science.4059921>
- Peñarrubia, L., Ruiz, M., Porco, R., Rao, S.N., Juanola-Falgarona, M., Manissero, D., López-Fontanals, M., Pareja, J., 2020. Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. *Int. J. Infect. Dis.* 97, 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.027>
- Pereira, C.A., Monezi, T.A., Mehnert, D.U., D’Angelo, M., Durigon, E.L., 2000. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.* 75, 127–133. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00214-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00214-5)
- Persson, S., Karlsson, M., Borsch-Reniers, H., Ellström, P., Eriksson, R., Simonsson, M., 2019. Missing the Match Might Not Cost You the Game: Primer-Template Mismatches Studied in Different Hepatitis A Virus Variants. *Food Environ. Virol.* 11, 297–308. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09387-z>
- Phan, T., 2020. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infect. Genet. Evol.* 81, 104260. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104260>
- Phelan, J., Deelder, W., Ward, D., Campino, S., Hibberd, M.L., Clark, T.G., 2020. Controlling the SARS-CoV-2 outbreak, insights from large scale whole genome sequences generated across the world. *bioRxiv* 2020.04.28.066977. <https://doi.org/10.1101/2020.04.28.066977>
- Pinto, L.D., Streck, A.F., Gonçalves, K.R., Souza, C.K., Corbellini, Â.O., Corbellini, L.G., Canal, C.W., 2012. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Res.* 165, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.01.001>
- Pollock, R. V, 1982. Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Vet.* 72, 103–119.
- Ponce, D., 2020. The impact of coronavirus in Brazil: politics and the pandemic. *Nat. Rev. Nephrol.* 16, 483. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0327-0>
- Qi, S., Zhao, J., Guo, D., Sun, D., 2020. A Mini-Review on the Epidemiology of Canine Parvovirus in China. *Front. Vet. Sci.* 7, 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00005>
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., Fitzpatrick, E.S., Fanning, S., 2018. *Microbiologia veterinária essencial*, 2nd ed. E-book.
- Rahimi, A., Mirzazadeh, A., Tavakolpour, S., 2021. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. *Genomics* 113, 1221–1232. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.09.059>

- Ramanathan, M., Ferguson, I.D., Miao, W., Khavari, P.A., 2021. SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 spike variants bind human ACE2 with increased affinity. *Lancet. Infect. Dis.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00262-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00262-0)
- Ramírez-Bello, J., Jiménez-Morales, M., 2017. [Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases]. *Gac. Med. Mex.* 153, 238–250.
- Ramírez-Bello, J., Vargas-Alarcón, G., Tovilla-Zárate, C., Fragoso, J.M., 2013. [Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases]. *Gac. Med. Mex.* 149, 220–228.
- Rana, D.R., Pokhrel, N., 2020. Sequence mismatch in PCR probes may mask the COVID-19 detection in Nepal. *Mol. Cell. Probes* 53, 101599. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101599>
- Ranzani, O.T., Bastos, L.S.L., Gelli, J.G.M., Marchesi, J.F., Baião, F., Hamacher, S., Bozza, F.A., 2021. Characterisation of the first 250 000 hospital admissions for COVID-19 in Brazil: a retrospective analysis of nationwide data. *Lancet Respir. Med.* 9, 407–418. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30560-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30560-9)
- Rappolee, D.A., Brenner, C.A., Schultz, R., Mark, D., Werb, Z., 1988a. Developmental expression of PDGF, TGF-alpha, and TGF-beta genes in preimplantation mouse embryos. *Science* 241, 1823–1825. <https://doi.org/10.1126/science.3175624>
- Rappolee, D.A., Mark, D., Banda, M.J., Werb, Z., 1988b. Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 241, 708–712. <https://doi.org/10.1126/science.3041594>
- Rejali, N.A., Moric, E., Wittwer, C.T., 2018. The Effect of Single Mismatches on Primer Extension. *Clin. Chem.* 64, 801–809. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.282285>
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., Andrade, M.J., 2015. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods Mol. Biol.* 1275, 31–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3
- Rychlik, W., 2007. OLIGO 7 primer analysis software. *Methods Mol. Biol.* 402, 35–60. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_2
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- SantaLucia, J.J., 2007. Physical principles and visual-OMP software for optimal PCR design. *Methods Mol. Biol.* 402, 3–34. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_1
- Santana, W. de O., Lencina, M.M., Bertolazzi, S., Silveira, S., Streck, A.F., 2020. Parvovirus canino: uma abordagem evolutiva e clínica. *Med. Veterinária* 13, 526–533. <https://doi.org/10.26605/medvet-v13n4-3661>
- Santos, N.S. de O., Romanos, M.T.V., Wigg, M.D., Couceiro, J.N. dos S.S., 2021. *Virologia humana*, 4th ed. Rio

de Janeiro, Brasil.

- Santos, R. da S., Bret, R.S.C., Moreira, A.C. de O.M., Campos, A.R., Silva, A.R.A.E., Lima, D.M., Tavares, K.C.S., 2020. In silico analysis of mismatches in RT-qPCR assays of 177 SARS-CoV-2 sequences from Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 53, e20200657. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0657-2020>
- Schmitz, S., Coenen, C., König, M., Thiel, H.-J., Neiger, R., 2009. Comparison of three rapid commercial Canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *J. Vet. diagnostic Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians, Inc* 21, 344–345. <https://doi.org/10.1177/104063870902100306>
- Shetty, B.D., Zachariah, A., Farver, T.B., Smith, B., Goldstein, T., Mazet, J.A.K., 2020. CARNIVORE PROTOPARVOVIRUS 1 (PARVOVIRUSES) AT THE DOMESTIC-WILD CARNIVORE INTERFACE IN INDIA. *J. zoo Wildl. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Zoo Vet.* 50, 1016–1020. <https://doi.org/10.1638/2018-0166>
- Shiehzegegan, S., Alaghemand, N., Fox, M., Venketaraman, V., 2021. Analysis of the Delta Variant B.1.617.2 COVID-19. *Clin. Pract.* 11, 778–784. <https://doi.org/10.3390/clinpract11040093>
- Simoska, O., Stevenson, K.J., 2019. Electrochemical sensors for rapid diagnosis of pathogens in real time. *Analyst* 144, 6461–6478. <https://doi.org/10.1039/C9AN01747J>
- Smith, G.J.D., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S.J., Worobey, M., Pybus, O.G., Ma, S.K., Cheung, C.L., Raghwani, J., Bhatt, S., Peiris, J.S.M., Guan, Y., Rambaut, A., 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459, 1122–1125. <https://doi.org/10.1038/nature08182>
- Srivastava, G.P., Xu, D., 2007. Genome-scale probe and primer design with PRIMEGENS. *Methods Mol. Biol.* 402, 159–176. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_8
- Stadhouders, R., Pas, S.D., Anber, J., Voermans, J., Mes, T.H.M., Schutten, M., 2010. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J. Mol. Diagn.* 12, 109–117. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090035>
- Starr, T.N., Greaney, A.J., Dingens, A.S., Bloom, J.D., 2021. Complete map of SARS-CoV-2 RBD mutations that escape the monoclonal antibody LY-CoV555 and its cocktail with LY-CoV016. *Cell reports. Med.* 2, 100255. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100255>
- Starr, T.N., Greaney, A.J., Hilton, S.K., Ellis, D., Crawford, K.H.D., Dingens, A.S., Navarro, M.J., Bowen, J.E., Tortorici, M.A., Walls, A.C., King, N.P., Veelsler, D., Bloom, J.D., 2020. Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. *Cell* 182, 1295-1310.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.012>
- Streck, A.F., Rüster, D., Truyen, U., Homeier, T., 2013. An updated TaqMan real-time PCR for canine and feline parvoviruses. *J. Virol. Methods* 193, 6–8. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.04.025>
- Sun, Y., Cheng, Y., Lin, P., Yi, L., Tong, M., Cao, Z., Wang, G., Li, S., Cheng, S., Yuan, W., Wang, J., 2018. A

- multiplex TaqMan real-time PCR for detection and differentiation of four antigenic types of canine parvovirus in China. *Mol. Cell. Probes* 38, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2018.02.004>
- Tang, J.W., Toovey, O.T.R., Harvey, K.N., Hui, D.D.S., 2021. Introduction of the South African SARS-CoV-2 variant 501Y.V2 into the UK. *J. Infect.* <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.01.007>
- Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., Giandhari, J., Doolabh, D., Pillay, S., San, E.J., Msomi, N., Mlisana, K., von Gottberg, A., Walaza, S., Allam, M., Ismail, A., Mohale, T., Glass, A.J., Engelbrecht, S., Van Zyl, G., Preiser, W., Petruccione, F., Sigal, A., Hardie, D., Marais, G., Hsiao, N.-Y., Korsman, S., Davies, M.-A., Tyers, L., Mudau, I., York, D., Maslo, C., Goedhals, D., Abrahams, S., Laguda-Akingba, O., Alisoltani-Dehkordi, A., Godzik, A., Wibmer, C.K., Sewell, B.T., Lourenço, J., Alcantara, L.C.J., Kosakovsky Pond, S.L., Weaver, S., Martin, D., Lessells, R.J., Bhiman, J.N., Williamson, C., de Oliveira, T., 2021. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* 592, 438–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9>
- Teng, S., Sobitan, A., Rhoades, R., Liu, D., Tang, Q., 2021. Systemic effects of missense mutations on SARS-CoV-2 spike glycoprotein stability and receptor-binding affinity. *Brief. Bioinform.* 22, 1239–1253. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa233>
- Tian, D., Sun, Y., Zhou, J., Ye, Q., 2021. The Global Epidemic of the SARS-CoV-2 Delta Variant, Key Spike Mutations and Immune Escape. *Front. Immunol.* 12, 751778. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.751778>
- Toms, D., Li, J., Cai, H.Y., 2020. Evaluation of WHO listed COVID-19 qPCR primers and probe in silico with 375 SERS-CoV-2 full genome sequences. *medRxiv* 2020.04.22.20075697. <https://doi.org/10.1101/2020.04.22.20075697>
- Truyen, U., 2006. Evolution of canine parvovirus—a need for new vaccines? *Vet. Microbiol.* 117, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.003>
- Truyen, U., Evermann, J.F., Vieler, E., Parrish, C.R., 1996. Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology* 215, 186–189. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0021>
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., Thiel, V., 2021. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Vanneste, K., Garland, L., Broeders, S., Van Gucht, S., Roosens, N.H., 2018. Application of whole genome data for in silico evaluation of primers and probes routinely employed for the detection of viral species by RT-qPCR using dengue virus as a case study. *BMC Bioinformatics* 19, 312. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2313-0>
- Vito, M., Alessandra, C., Annamaria, P., Giancarlo, B., Michele, C., Domenico, B., Donato, N., Maria, T., Canio, B., 2004. A Canine Parvovirus Mutant Is Spreading in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1333–1336. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1333-1336.2004>
- Vogels, C.B.F., Brito, A.F., Wyllie, A.L., Fauver, J.R., Ott, I.M., Kalinich, C.C., Petrone, M.E., Casanovas-

- Massana, A., Catherine Muenker, M., Moore, A.J., Klein, J., Lu, P., Lu-Culligan, A., Jiang, X., Kim, D.J., Kudo, E., Mao, T., Moriyama, M., Oh, J.E., Park, A., Silva, J., Song, E., Takahashi, T., Taura, M., Tokuyama, M., Venkataraman, A., Weizman, O.-E., Wong, P., Yang, Y., Cheemarla, N.R., White, E.B., Lapidus, S., Earnest, R., Geng, B., Vijayakumar, P., Odio, C., Fournier, J., Bermejo, S., Farhadian, S., Dela Cruz, C.S., Iwasaki, A., Ko, A.I., Landry, M.L., Foxman, E.F., Grubaugh, N.D., 2020. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nat. Microbiol.* 5, 1299–1305. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0761-6>
- Walter-Weingärtner, J., Bergmann, M., Weber, K., Truyen, U., Muresan, C., Hartmann, K., 2021. Comparison of Eight Commercially Available Faecal Point-of-Care Tests for Detection of Canine Parvovirus Antigen. *Viruses* 13. <https://doi.org/10.3390/v13102080>
- Wang, R., Zhang, W., Ye, R., Pan, Z., Li, G., Su, S., 2020. One-step multiplex TaqMan probe-based method for real-time PCR detection of four canine diarrhea viruses. *Mol. Cell. Probes* 53, 101618. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101618>
- Waters, D.L.E., Shapter, F.M., 2014. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods Mol. Biol.* 1099, 65–75. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_7
- Whiley, D.M., Sloots, T.P., 2005. Sequence variation in primer targets affects the accuracy of viral quantitative PCR. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 34, 104–107. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.02.010>
- WHO, 2021a. Status of COVID-19 Vaccines within WHO EUL/PQ evaluation process.
- WHO, 2021b. Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern [WWW Document]. URL [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern) (accessed 12.1.22).
- WHO, 2020. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report - 1, WHO.
- Wilkes, R.P., Lee, P.-Y.A., Tsai, Y.-L., Tsai, C.-F., Chang, H.-H., Chang, H.-F.G., Wang, H.-T.T., 2015. An insulated isothermal PCR method on a field-deployable device for rapid and sensitive detection of canine parvovirus type 2 at points of need. *J. Virol. Methods* 220, 35–38. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.04.007>
- Wolf, J.M., Streck, A.F., Fonseca, A., Ikuta, N., Simon, D., Lunge, V.R., 2021. Dissemination and evolution of SARS-CoV-2 in the early pandemic phase in South America. *J. Med. Virol.* 93, 4496–4507. <https://doi.org/10.1002/jmv.26967>
- Won, J., Lee, S., Park, M., Kim, T.Y., Park, M.G., Choi, B.Y., Kim, D., Chang, H., Kim, V.N., Lee, C.J., 2020. Development of a Laboratory-safe and Low-cost Detection Protocol for SARS-CoV-2 of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Exp. Neurobiol.* 29, 107–119. <https://doi.org/10.5607/en20009>
- World Health Organization, 2020a. WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020 [WWW Document]. URL <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who>

director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020

- World Health Organization, 2020b. Coronavirus Disease (COVID-19) Technical Guidance: Laboratory Testing for 2019-nCoV in Humans [WWW Document]. URL <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf> (accessed 5.5.21).
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J., Sheng, J., Quan, L., Xia, Z., Tan, W., Cheng, G., Jiang, T., 2020. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe* 27, 325–328. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yu, B., Zhang, C., 2011. In silico PCR analysis. *Methods Mol. Biol.* 760, 91–107. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-176-5_6
- Zaha, A., Ferreira, H.B., Passaglia, L.M.P., 2014. *Biologia Molecular Básica*, 5^a. ed.
- Zhang, L., Li, Q., Liang, Z., Li, T., Liu, S., Cui, Q., Nie, J., Wu, Q., Qu, X., Huang, W., Wang, Y., 2022. The significant immune escape of pseudotyped SARS-CoV-2 variant Omicron. *Emerg. Microbes Infect.* 11, 1–5. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.2017757>
- Zhang, Y.-Z., Holmes, E.C., 2020. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell* 181, 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.035>
- Zhao, J., Yan, X., Wu, W., 2011. [Origin and evolution of canine parvovirus--a review]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 51, 869–875.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G.F., Tan, W., 2020. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>

ANEXOS

Material suplementar do artigo 1:

Arquivo suplementar S1 – O conjunto de dados de 1714 genomas SARS-CoV-2 Gamma baixados do banco de dados GISAID.

Arquivo suplementar S2 – O conjunto de dados de 1298 genomas SARS-CoV-2 Delta baixados do banco de dados GISAID.

Arquivo suplementar S3 – O conjunto de dados de 111 genomas SARS-CoV-2 Omicron baixados do banco de dados GISAID.

Arquivo complementar S4 – O conjunto de *primers*/sondas e *amplicon* usados no estudo.

Link:

https://drive.google.com/file/d/1Atf_1jTwufJ7iHUvQ2m6aixGUPpuRU8/view?usp=sharing

Material suplementar do artigo 2:

Arquivo suplementar S1 – O conjunto de dados de 298 genomas completos de CPV-2 baixados do bando de dados NCBI.

Arquivo suplementar S2 – O conjunto de dados de 698 genomas VP2 de CPV-2 baixados do bando de dados NCBI.

Arquivo suplementar S3 – O número de acesso e o país de origem de cada genoma de CPV-2.

Arquivo complementar S4 – O conjunto de *primers*/sondas e *amplicon* usados no estudo.

Link:

https://drive.google.com/file/d/1Zp2AsKm4x9OWpBTRK38o_-iIlluN4_PP/view?usp=sharing