

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Uso del péptido recombinante D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 para la detección de anticuerpos en caninos (*Canis lupus familiaris*) potencialmente expuestos a COVID-19

Trabajo de titulación previo a la obtención
del título de Médico Veterinario
Zootecnista

Autor:

Andrea Nicole Cuichán Bautista

Cristina Patricia Jiménez Ávila

Director:

Antonio Javier Vallecillo Maza

ORCID:  0000-0001-9141-0176

Cuenca, Ecuador

2023-07-24

Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso del péptido recombinante D+E ($L^{230}-A^{419}$) de la Nucleoproteína del SARS-CoV-2 para la detección de anticuerpos en caninos (*Canis lupus familiaris*) potencialmente expuestos a COVID-19. Para lo anterior, se usaron 30 muestras de suero sanguíneo colectadas pre-pandemia y 30 post-pandemia, se colectaron de caninos sin considerar raza, edad y sexo, únicamente haber tenido una estrecha convivencia con personas diagnosticadas como COVID-19 positivas. En los ensayos empleados para la detección de anticuerpos ELISA indirecto y Western Blot, se logró evidenciar la presencia de anticuerpos anti-péptido D+E ($L^{230}-A^{419}$) en sueros post-pandemia (ELISA indirecto/Western Blot, 34/5 de 34). Sin embargo, también se encontró presencia de anticuerpos en los sueros colectados en el periodo pre-pandemia (28/12 de 29). Lo anterior sugiere una previa exposición de los perros de donde se colectaron los sueros pre-pandemia, a un antígeno similar al péptido D+E ($L^{230}-A^{419}$), probablemente de un posible *Betacoronavirus* bovino, en razón de que los caninos convivían con animales de esta especie, por lo tanto, el péptido recombinante resultó ser inespecífico para detectar anticuerpos. Por ello, para futuras investigaciones se sugiere la búsqueda de otros antígenos con el fin de identificar uno más específico para el diagnóstico serológico de la exposición a SARS-CoV-2 en los caninos que cohabitaban estrechamente con personas.

Palabras clave: Covid-19, perros, animales, antígenos



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The objective of this research was to evaluate the use of the recombinant peptide D+E ($L^{230}-A^{419}$) of the SARS-CoV-2 Nucleoprotein for the detection of antibodies in canines (*Canis lupus familiaris*) potentially exposed to COVID-19. For the above, 30 blood serum samples collected pre-pandemic and 30 post-pandemic were used, they were collected from canines without considering race, age and sex, only having had close coexistence with people diagnosed as COVID-19 positive. In the assays used for the detection of indirect ELISA and Western Blot antibodies, it was possible to demonstrate the presence of anti-peptide D+E ($L^{230}-A^{419}$) antibodies in post-pandemic sera (indirect ELISA/Western Blot, 34/5 of 34). However, the presence of antibodies was also found in the sera collected in the pre-pandemic period (28/12 of 29). This suggests a previous exposure of the dogs from which the pre-pandemic sera were collected, to an antigen similar to the D+E peptide ($L^{230}-A^{419}$), probably from a possible bovine *Betacoronavirus*, because the canines lived with animals of this species, therefore, the recombinant peptide turned out to be non-specific for detecting antibodies. Therefore, for future research, the search for other antigens is suggested in order to identify a more specific one for the serological diagnosis of exposure to SARS-CoV-2 in canines that live closely with people.

Keywords: Covid-19, dogs, animals, antigens



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Resumen.....	2
Abstract.....	3
Índice de contenido	4
Índice de figuras.....	7
Índice de tablas	8
Índice de ilustraciones.....	9
Índice de anexos	10
Agradecimientos.....	11
Dedicatoria.....	12
Abreviaturas	14
Introducción.....	16
1.1. Objetivos.....	18
1.1.2. Objetivos específicos.....	18
1.2. Pregunta de investigación.....	18
Revisión de literatura.....	19
2.1. Historia	19
2.2. Etiología.....	20
2.2.1. Taxonomía	20
2.2.2. Estructura del virión de SARS-CoV-2	21
2.2.3. Nucleoproteína o proteína N.....	21
2.2.4. Evolución del SARS-CoV-2	22
2.3. Transmisión	22
2.3.1. Transmisión horizontal por contacto directo.....	22
2.3.2. Transmisión horizontal de manera indirecta	22
2.3.3. Gotículas infecciosas.....	23
2.3.4. Aerosoles infecciosos.....	23

2.3.5. Transmisión viral por las heces	23
2.4. Patogenia.....	23
2.4.1. Replicación del SARS-CoV-2 y patogénesis.....	24
2.5. Rol zoonótico de SARS-CoV-2	24
2.6. Reportes de infecciones en animales de compañía	25
2.7. Manifestaciones clínicas de la COVID-19	28
2.8. Diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2.....	28
2.8.1. Diagnóstico clínico de la infección por SARS-CoV-2 en animales	28
2.8.2. Diagnóstico diferencial	28
2.8.3. Diagnóstico de laboratorio	29
2.9. Ensayos de ELISA indirecto.....	29
2.10. Ensayo de Western Blot.....	30
2.11. Tratamiento específico de la infección por SARS-CoV-2	31
2.12. Prevención y control de la COVID-19.....	31
Materiales y métodos	32
3.1. Área de estudio y unidad de análisis.....	32
3.2 Actividad 1: Colección, transporte de muestras para la obtención de suero post-pandemia	32
3.2.1 Materiales de trabajo	32
3.2.2 Materiales biológicos	32
3.2.3 Materiales químicos.....	32
3.2.4 Procedimiento	33
3.3 Actividad 2: Obtención de suero sanguíneo de las muestras de sangre	33
3.3.1 Materiales físicos y equipos.....	33
3.3.2 Materiales biológicos	33
3.3.3 Materiales químicos.....	33
3.3.4 Procedimiento	33
3.4 Actividad 3: Ensayo de ELISA indirecto	34

3.4.1 Materiales físicos y equipos.....	34
3.4.2 Materiales biológicos	34
3.4.3 Materiales químicos.....	34
3.4.4 Procedimiento	35
3.5 Actividad 4: Ensayo de Western Blot	35
3.5.1 Materiales físicos y equipos.....	35
3.5.2 Materiales biológicos	36
3.5.3 Materiales químicos.....	36
3.5.4 Procedimiento	37
3.6 Actividad 5: Análisis estadístico	41
Resultados	42
4.1. Ensayo de ELISA indirecto	42
4.2. Ensayo de Western Blot.....	43
4.3. Prueba de McNemar.....	44
Discusión.....	45
Conclusiones.....	47
Recomendaciones.....	48
Referencias	49
Anexos	56

Índice de figuras

- Figura 1:** Resultados obtenidos del ensayo de ELISA indirecto aplicado para la detección de anticuerpos de SARS-CoV-2 empleando el péptido recombinante D+E ($L^{230}-A^{419}$) de la Nucleoproteína del Virus en caninos (*Canis lupus familiaris*) potencialmente expuestos a COVID-19. Valores de densidad óptica (DO) obtenidos con los sueros pre-pandemia (Verdes) y post-pandemia (Rojos), junto a los valores de los pozos blanco (Sin suero).....42
- Figura 2:** Resultados obtenidos del ensayo de Western Blot aplicado para la detección de anticuerpos de SARS-CoV-2 empleando el péptido recombinante D+E ($L^{230}-A^{419}$) de la Nucleoproteína del SARS-CoV-2 en caninos (*Canis lupus familiaris*) potencialmente expuestos a COVID-19. Valores de intensidad de la señal (Pixel) obtenidos con los sueros pre-pandemia (Verdes) y post-pandemia (Rojos), junto a los valores de ensayos sin suero (Blancos).....43

Índice de tablas

Tabla 1: Taxonomía del Coronavirus relacionado con el Síndrome Respiratorio Agudo Severo.	20
Tabla 2: Reactivos para la resolución del péptido D+E ($L^{230}-A^{419}$) recombinante.	38
Tabla 3: Reactivos para la preparación del gel concentrador (Stacking)	38
Tabla 4: Comparación de los ensayos serológicos aplicados a los sueros pre-pandémicos mediante la prueba estadística de McNemar.	44
Tabla 5: Comparación de los ensayos serológicos aplicados a los sueros post-pandémicos mediante la prueba estadística de McNemar	44

Índice de ilustraciones

Ilustración 1: Estructura del SARS-CoV-2.	21
Ilustración 2: Zoonosis inversa del COVID-19. Las flechas continuas muestran la posible transmisión de persona a animal, confirmada por ARN viral, datos de secuenciación o aislamiento del virus. Las flechas discontinuas muestran la presumible transmisión de persona a animal basada por datos serológicos.	25
Ilustración 3: Esquema simplificado del ensayo de ELISA indirecto.	30

Índice de anexos

Anexo 1: Fotografías de la realización del proyecto de titulación.....	56
Anexo 2: Encuesta dirigida a los propietarios de las mascotas para identificar infección de SARS-CoV-2	60

Agradecimientos

En primer lugar, agradecemos a Dios que es nuestro principal apoyo y motor para continuar cada día sin rendirnos.

A la Universidad de Cuenca por habernos abierto sus puertas y brindarnos el conocimiento y excelente formación con el fin de ser unas ilustres profesionales.

A los docentes de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia por ser parte de nuestra formación académica y más que eso, guiarnos para ser mejores personas y expertos e incentivarnos a seguir actualizándonos en lo que nos apasiona.

De manera especial, Al Dr. Antonio J. Vallecillo, PhD asesor de esta tesis, por habernos guiado y acompañado durante este proyecto en base a su experiencia y conocimiento científico, por compartirnos su conocimiento de manera desinteresada, sin usted esto no habría sido posible.

Al Dr. Guillermo Guevara por su apoyo incondicional, quién supo guiarnos cuando más lo necesitábamos.

Finalmente; agradecemos a toda nuestra familia y amigos quienes estuvieron a lo largo de todo este proceso, gracias por su amor y apoyo, por no perder la fe en nosotras.

Andrea Nicole Cuichán Bautista
Cristina Patricia Jiménez Ávila

Dedicatoria

Mi tesis la dedico con todo mi cariño y respeto a mis padres Sara y Luis quienes estuvieron apoyándome en cada etapa de mi vida y siempre quieren verme triunfar, a pesar de que no tenían los suficientes recursos económicos, siempre me dieron lo mejor y lo necesario para estudiar esta carrera, me faltará la vida para devolverles todo lo que me dieron. A mis hermanos Vanessa y Carlos que me impartían los mejores consejos para que yo no me equivocara en cada obstáculo que tuve que enfrentar y siempre creyeron en mí en momentos que ni yo misma creía en mí. A mis abuelitos Natividad y Luis quienes me cuidaron de pequeña y me entregaron todo su amor, quienes fueron el pilar fundamental por el cual decidí estudiar esta carrera muy noble, siempre los llevaré en mi corazón y mi eterna gratitud. A mis tíos Sergio y Ramiro quienes me enseñaron el valor del trabajo, el esfuerzo y la perseverancia, que siempre tendría su apoyo incondicional y que para ser feliz no se necesitaba de tantos lujos. Finalmente la dedico a todas mis amigas es especial a mi amiga Cristina quien compartió hermosos momentos conmigo durante toda la carrera y siempre me apoyo incondicionalmente.

Andrea Nicole Cuichán Bautista

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a Dios mi fuente de vida y esperanza, quién me ha brindado sabiduría y fortaleza para culminar con éxitos mi carrera profesional.

A mis padres Edwin y María, mis modelos a seguir, quienes me han enseñado desde niña que todo lo que me proponga puedo hacerlo realidad, por ser soporte en cada paso que he dado, brindándome amor y confianza incondicional para alcanzar mis sueños.

A mis hermanos Paola, Israel y Paúl quienes han sido mis cómplices en cada aventura que la vida nos ha puesto, gracias por su respaldo y cariño constante.

A mi sobrina Natalia por llenar de dulzura y bondad cada día que me acompaña.

A Sebastián por creer en mí, demostrarme su apoyo y amor verdadero, por motivarme cuando más lo necesitaba, gracias por ser parte de este maravilloso viaje.

A mi gran amiga y compañera de tesis Andrea por ser fundamental en este caminar universitario, gracias por tu amistad incondicional, por las risas y por todas las experiencias vividas.

A mis amigas Angie y Cora por regalarme recuerdos valiosos desde tiempos inmemorables.

A todos mis amigos y profesionales que de alguna u otra manera me apoyaron y confiaron en mí.

A todos ustedes, mi amor y gratitud.

Cristina Patricia Jiménez Ávila

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
SARS	Síndrome Respiratorio Agudo Grave
MERS	Síndrome Respiratorio por Coronavirus de Oriente Medio
OMS	Organización Mundial de la Salud
SDRA	Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda
SARS-CoV-2	El Virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2
ARN	Ácido ribonucleico
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
Kbp	kilo par de bases
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina 2
pp1a y pp1ab	Poliproteínas
RTC	Complejo de replicación-transcripción
PFU	Unidades formadoras de placa
RT-Qpcr	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
RT-LAMP	LAMP de transcripción inversa
VNT	Prueba de neutralización viral
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato
PBS	Solución buferada de fosfatos
NaCl	Cloruro de Sodio
KCl	Cloruro de potasio
NaH ₂ PO ₄	Bifosfato de sodio
BSA	Albúmina sérica bovina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SDS	Dodecilsulfato sódico
TEMED	Tetrametiletilendiamina
DAB	3,3'-diaminobenzidine
Stacking gel	Gel concentrador
DO's	Densidades ópticas
BCoV	Coronavirus Bovino
HEV	Encefalomielitis hemaglutinante porcina
Tris	Trisaminometano
hh	Hora
min	Minuto
s	Segundo
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
ml	Mililitros
μl	Microlitro

x g	Gravedad
mM	Milimolar
g	Gramo
µg	Microgramo
mg	Miligramo
ng	Nanogramo
kDa	Kilodalton
v/v	Volumen a Volumen
No. Cat.	Número de catálogo

Introducción

El Virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) es el agente causal de la actual enfermedad COVID-19, posee la capacidad de infectar tanto a humanos como algunas especies animales. El SARS-CoV-2 tiene tropismo principalmente por tejidos epiteliales del aparato respiratorio y digestivo, pero también puede afectar a los de otros órganos (Schoch *et al.*, 2020). COVID-19 puede convertirse en una enfermedad mortal en aquellos pacientes que son vulnerables al padecer otras enfermedades previas como cáncer, enfermedad cardiovascular, diabetes, obesidad, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, tabaquismo, afectación hepática, alteraciones de la inmunidad y cirugía mayor reciente (Machhi *et al.*, 2020; Vicente *et al.*, 2020).

La enfermedad causada por este *Betacoronavirus* emergente, COVID-19 se reportó por primera vez en diciembre del 2019 en Wuhan, China; se dispersó velozmente por todo el mundo, con altas cifras de letalidad en ciertos intervalos etarios, es por ello que se constituyó en una situación de emergencia sanitaria de interés mundial (Abuabara-Franco *et al.*, 2020). A la fecha del 23 de febrero de 2022 se reportó 426.624.859 casos confirmados de COVID-19 a nivel mundial. En Ecuador se reportaron un total de 820.541 casos confirmados y 35.172 fallecidos (OMS, 2022). En particular, para la provincia del Azuay se reportan 26.413 casos confirmados de COVID-19 (Coronavirus Ecuador.com, 2022).

SARS-CoV-2 se transmite de persona a persona mediante aerosoles que son emitidos al estornudar, toser y hablar, contacto de mano a boca a ojo y mediante fómites. Cabe mencionar que algunas especies animales también pueden adquirir la infección, la cual causa manifestaciones clínicas muy similares a los que se presentan en humanos, entre las que destacan, fiebre, inapetencia, letargo, alteraciones gastrointestinales, entre otros, también se ha reportado que algunos animales infectados no desarrollan signología clínica (OIE, 2022).

Por otro lado, en los animales expuestos a la COVID-19 la respuesta inmune en contra del SARS-CoV-2 en su totalidad o hacia alguno de sus componentes antigenicos como el dominio de unión al receptor (RBD, del Inglés, Receptor Binding Domain) de la proteína que actúa como ligando viral, la llamada proteína S (Spike o espícula) y la proteína N de la nucleocápside o Nucleoproteína, podría ser monitoreada con el test de ELISA indirecto que se ha usado ampliamente para la detección de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 en personas. La utilidad de estos ensayos para determinar la exposición al SARS-CoV-2 en especies animales requiere de una exhaustiva evaluación, debido a que hay una extensa diversidad de coronavirus que infectan a los animales y podrían interferir en los resultados, sin embargo, los estudios serológicos son herramientas fundamentales para la detección rápida y precisa de la circulación viral en poblaciones animales (Barua *et al.*, 2021; Colitti *et al.*, 2022).

En Ecuador prima la ausencia de evidencia científica que fundamente la presencia de anticuerpos contra SARS-CoV-2 en animales, en especial estudios acerca de la detección de

respuesta inmune humoral en caninos (*Canis lupus familiaris*), a pesar de que ya se han reportado infecciones en estos animales (Zambrano-Mila *et al.*, 2022). Por lo anterior, el presente proyecto tuvo como objeto el empleo del péptido recombinante D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 descrito por Colitti *et al.*, (2022) evidenciar si los caninos potencialmente expuestos a la COVID-19 por su convivencia con personas infectadas, tienen anticuerpos detectables mediante ensayos de ELISA indirecto y Western Blot, en contraste con muestras de animales que fueron tomadas meses antes de iniciada la pandemia, con ello se pretende tener una herramienta que permitirá identificar la frecuencia de transmisión de esta enfermedad de humanos hacia caninos.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Evaluar el uso del péptido recombinante D+E ($L^{230}-A^{419}$) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 para la detección de anticuerpos de caninos (*Canis lupus familiaris*) potencialmente expuestos al agente causal de la COVID-19.

1.1.2. Objetivos específicos

- Desarrollar ensayos de ELISA y Western Blot con el péptido recombinante D+E ($L^{230}-A^{419}$) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 para la detección de anticuerpos de caninos (*Canis lupus familiaris*).
- Comparar la capacidad de los ensayos de ELISA y Western Blot para la detección de anticuerpos contra el péptido recombinante D+E ($L^{230}-A^{419}$) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 en caninos (*Canis lupus familiaris*) potencialmente expuestos a COVID-19.

1.2. Pregunta de investigación

¿El péptido recombinante D+E ($L^{230}-A^{419}$) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2, producido en un modelo bacteriano de expresión es capaz de permitir la detección de anticuerpos en caninos (*Canis lupus familiaris*) potencialmente expuestos a la COVID-19?

Revisión de literatura

2.1. Historia

A lo largo de la historia se han reportado casos de personas infectadas por diversos virus como el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS) y el Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS), estos virus que en el pasado han desatado brotes poseen similitudes estructurales y moleculares con el actual SARS-CoV-2.

En 2003 la OMS (Organización Mundial de la Salud) reportó una serie de casos de SARS cuyo origen tuvo en Guangdong, China. posteriormente, se propagó a Hong Kong infectando a 1.755 personas con una tasa de letalidad mundial de 11 %. Los signos y síntomas fueron similares a los que se presentan con el actual SARS-CoV-2, dificultad respiratoria, tos y dolor en el pecho, que progresaron a dificultad respiratoria y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) (Hung, 2003).

Por otro lado, en 2012 emergió un nuevo brote de infecciones causado por un Coronavirus, el del MERS, notificado por primera vez en Arabia Saudita, posteriormente entre el 2012 y 2015 la OMS notificó 1.611 casos confirmados y 575 muertes a nivel mundial, alcanzando así una tasa de letalidad mundial del 35 % (Cho *et al.*, 2016). De igual manera los síntomas del MERS muestran similitud a los del SARS, comúnmente se presenta fiebre, tos, dificultad para respirar siendo compatible con una neumonía atípica. Sin embargo, los síntomas digestivos, diarrea, náuseas o vómitos también van a presentarse (Leguía *et al.*, 2019). Las medidas de precaución que se tomaron para tratar de disminuir los contagios y erradicar la enfermedad fueron similares a las medidas tomadas para SARS: uso de cubrebocas o mascarillas, mantener una distancia física prudente, lavado de manos vigoroso y frecuente. Además, se sugirió a las personas que evitaran en lo posible el contacto con camellos, consumo de leche o carne de camello cruda (Abdullah *et al.*, 2003; Hung, 2003; Mackay & Arden, 2015).

El 31 de diciembre de 2019, se informó a la OMS sobre un aumento repentino de casos de neumonía con etiología desconocida presentados en Wuhan, China y poco después se identificó un nuevo Coronavirus, el ahora denominado SARS-CoV-2 como el agente causal (Machhi *et al.*, 2020; Yoo & Yoo, 2020). El 13 de enero del 2020, se reportó en Tailandia el primer caso notificado fuera de China (OMS, 2020b). Y a finales del mismo mes la OMS informó de 7.818 casos a nivel mundial, distribuidos en 18 países y con 170 muertes en China (OMS, 2020a). El virus se dispersó rápidamente por diversos países, por lo cual el 11 de marzo de 2020 la OMS declaró oficialmente la propagación como una pandemia global (Machhi *et al.*, 2020; Yoo & Yoo, 2020).

En Ecuador los sucesos se desarrollaron de la siguiente manera, en febrero del 2020 el Ministerio de Salud confirmó el primer caso de COVID-19 en Guayaquil, dos meses después Guayaquil se convirtió en uno de los epicentros de la pandemia. Sin embargo, el 23 de julio fue sobrepasada por Quito convirtiéndose, así como el nuevo epicentro (Chauca, 2021).

Actualmente se siguen identificando períodos de contagios masivos por las diversas variantes: Alpha, Delta, Gamma, Iota, Lambda, Mu y Omicron (COE, 2022). Y desde el 3 de enero de 2020 hasta el 7 de marzo de 2022 se han confirmado 836.216 casos de COVID-19 con 35.264 muertes (OMS, 2022).

2.2. Etiología

El Coronavirus que causa el Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 más conocido como SARS-CoV-2 es un *Betacoronavirus* que fue descubierto en muestras de lavado broncoalveolar, las cuales fueron tomadas de pacientes que tenían neumonía de origen desconocido (Ren *et al.*, 2020).

2.2.1. Taxonomía

Los Coronaviruses constituyen una familia de virus con genoma de ARN (Ácido ribonucleico), monocatenario, sentido positivo y con una cápside envuelta. Éstos pertenecen a la familia *Coronaviridae*, que comprende 3 subfamilias, 6 géneros, 28 subgéneros y 54 especies de virus según la última actualización de la taxonomía del Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV, por sus siglas en inglés) en el año 2021. Las tres subfamilias se denominan, *Letovirinae*, *Orthocoronavirinae* y *Pitovirinae*, en la subfamilia *Orthocoronavirinae* se encuentra el género *Betacoronavirus*, dentro del cual tiene al subgénero *Sarbecovirus* que contiene a la especie *Coronavirus* relacionada con el Síndrome respiratorio agudo severo, a la cual pertenece el SARS-CoV-2 (ICTV, 2021).

Tabla 1: Taxonomía del Coronavirus relacionado con el Síndrome Respiratorio Agudo Severo.

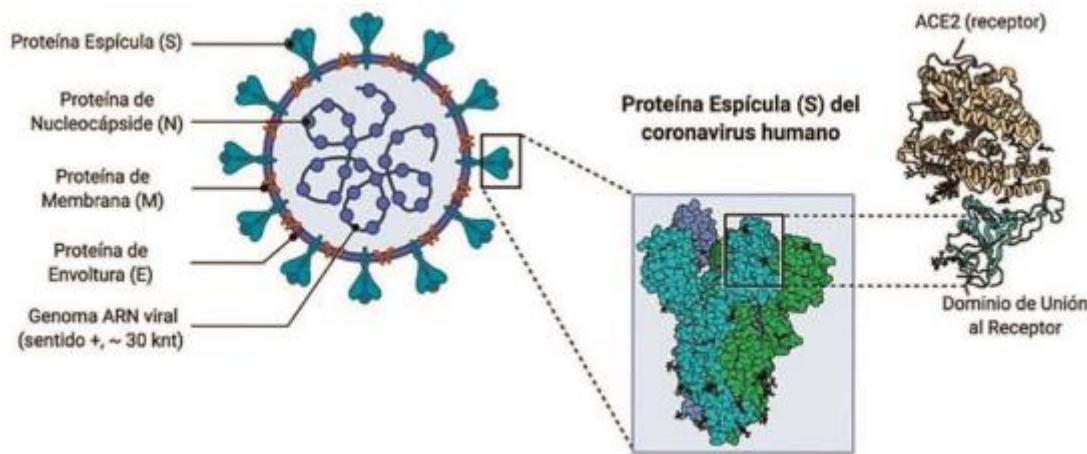
TAXONOMÍA	
Dominio	<i>Riboviria</i>
Reino	<i>Orthornavirae</i>
Filo	<i>Pisuviricota</i>
Clase	<i>Pisoniviricetes</i>
Orden	<i>Nidovirales</i>
Suborden	<i>Cornidovirinae</i>
Familia	<i>Coronaviridae</i>
Subfamilia	<i>Orthocoronavirinae</i>
Género	<i>Betacoronavirus</i>
Subgénero	<i>Sarbecovirus</i>
Especie	<i>Coronavirus</i>

Fuente: (ICTV, 2021).

2.2.2. Estructura del virión de SARS-CoV-2

El virión del SARS-CoV-2 posee un tamaño de 60-140 nm, puede mostrar una morfología de tipo elíptico, esférico o pleomórfico, cuyo genoma viral tiene una longitud de 29,9 kbp (Del Inglés Kilobase pairs), en donde se encuentran codificadas las proteínas estructurales y no estructurales, las estructurales tales como: espícula o proteína S, proteína de membrana M, proteína de nucleocápside N y proteína de envoltura E (Alvarado-Amador *et al.*, 2020; Dhama *et al.*, 2020) y dieciséis proteínas no estructurales (nsp 1-16) (Algaissi *et al.*, 2020). Algunas proteínas estructurales se encuentran asociadas o se encuentran integradas en la envoltura viral, membrana lipídica que tiene como origen la célula infectada. La partícula viral contiene internamente una Nucleoproteína N, la cual se une al ARN viral en una estructura helicoidal similar a una cuerda con cuentas, de esta manera protege al ARN de su degeneración (Palacios-Cruz *et al.*, 2021). Durante el proceso de invasión viral, al ingresar a la célula, la proteína N se separa del ARN y el genoma viral es traducido por los ribosomas de la célula infectada. Mientras que las proteínas estructurales E, M y S conforman la envoltura viral, estas se integran en la membrana celular para modificarse antes de empleada por el virus como envoltura durante el proceso de liberación de las partículas virales (Machhi *et al.*, 2020).

Ilustración 1: Estructura del SARS-CoV-2.



Fuente: (Cortés, 2020).

2.2.3. Nucleoproteína o proteína N

La nucleoproteína N del SARS-CoV-2 es una proteína estructural importante que desempeña funciones esenciales en el proceso de replicación viral, incluida la propia replicación, la transcripción y el empaquetamiento del genoma. La proteína N de longitud completa es una fosfoproteína flexible y multivalente que se asocia con el genoma de ARN viral y forma el núcleo de la ribonucleoproteína (Mu *et al.*, 2020). Esta proteína N es utilizada con mucha frecuencia en inmunoensayos, ya que se sobreexpresa durante la infección, es altamente antigénica, induciendo altos títulos de anticuerpos en los pacientes infectados, representando

así un antígeno ideal para desarrollar una prueba para la detección de anticuerpos anti-COVID-19 (Rikhtegaran *et al.*, 2020; Zeng *et al.*, 2020). Es por ello que en la actualidad la proteína N se utiliza con frecuencia en el desarrollo de vacunas y ensayos serológicos (Ahmed *et al.*, 2020).

2.2.4. Evolución del SARS-CoV-2

Desde finales del año 2020, el SARS-CoV-2 ha exhibido una evolución continua, caracterizada por la generación de un conjunto de mutaciones que impactan en la transmisibilidad y antigenicidad del virus. Las mutaciones que con mayor frecuencia se identifican se suceden en la proteína de la espícula o proteína S, pueden afectar la entrada del virus en las células diana y la eficacia de la protección de anticuerpos. Singularmente las mutaciones del dominio de unión al receptor (RBD) son de gran importancia ya que la mayoría de las vacunas actuales se dirigen a este dominio (Kim *et al.*, 2022).

Por otro lado, la continua secuenciación de la totalidad del genoma del SARS-CoV-2 han demostrado que las infecciones de animales salvajes y en cautiverio como el venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y leones asiáticos (*Panthera leo persica*) pueden ser una consecuencia de la alteración del tropismo del SARS-CoV-2 y la probabilidad de la aparición de un reservorio natural de este virus que le permitiría mantenerse circulando (Kim *et al.*, 2022).

2.3. Transmisión

La transmisión del SARS-CoV-2 sucede de diferente manera, por ejemplo, la transmisión por contacto directo con la persona infectada, contacto indirecto a través de objetos que juegan el papel de intermediarios, principalmente por la vía de las manos, de los fómites y por el transporte de gotitas cargadas de virus en el aire (Alcamí *et al.*, 2020). A continuación, se describirán con mayor detalle cada una de ellas.

2.3.1. Transmisión horizontal por contacto directo

Contacto directo o primario se refiere al contacto físico estrecho o cercano entre un individuo infectado y otro individuo vulnerable que permite la transmisión (Alcamí *et al.*, 2020).

2.3.2. Transmisión horizontal de manera indirecta

Transmisión indirecta o mediada por un fómite, este último hace referencia a un objeto o superficie que ha sido tocado por un individuo infectado, o en el que se han depositado gotículas y/o aerosoles generados por un individuo infectado y que posteriormente entra en contacto con otro individuo (Chia *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2015).

2.3.3. Gotículas infecciosas

Gotículas o gotas de Flugge que son expulsadas por el individuo infectado al hablar, cantar, toser, estornudar y respirar, que pueden colisionar en las superficies mucosas de los ojos, fosas nasales, o boca de otro individuo a una distancia menor a un metro. Además, las gotículas caen al suelo antes de evaporarse ocasionan contaminación local (Sigler, 2021).

2.3.4. Aerosoles infecciosos

Son partículas (gotas) mucho más pequeñas que las gotículas y por su reducido tamaño pueden persistir en suspensión en el aire durante más tiempo (Alcamí *et al.*, 2020). Estas son liberadas al hablar, toser, estornudar, vomitar o por las heces al descargar el inodoro (Sigler, 2021). Asimismo, los aerosoles se producen en los hospitales al realizar procedimientos terapéuticos diagnósticos como la intubación endotraqueal, broncoscopia, aspiración de secreciones, nebulizaciones, ventilación manual, entre otras (Sigler, 2021). En tiempo promedio en el virus puede mantenerse viable es de 1,1 a 1,2 hora, la viabilidad puede prolongarse cuando está integrado a partículas en forma de aerosol hasta por 3 horas.

2.3.5. Transmisión viral por las heces

El principal mecanismo de dispersión de las heces es la aerosolización de partículas creada durante la descarga de los inodoros, las gotículas atomizadas pueden ser directamente inhaladas o depositadas en las superficies del baño contaminando más adelante las manos (Morawska, 2005).

2.4. Patogenia

La infección del SARS-CoV-2 inicia con la unión de su ligando viral (proteína S) a un receptor específico. El receptor humano para este virus es la Enzima Convertidora de la Angiotensina 2 (ACE2) que es una exopeptidasa de membrana tipo 1 que se encuentra expresada en las células de órganos como pulmón, corazón, endotelio vascular, intestino y riñones, que están relacionados a enfermedades cardiovasculares. La ACE2 posee una afinidad 20 veces mayor a la proteína S del SARS-CoV-2, esto explica la eficiente y rápida transmisión de esta enfermedad (Guo *et al.*, 2020; Manta *et al.*, 2022).

Los receptores ACE2 que se encuentran expresados en los epitelios del tracto respiratorio inferior de los humanos son aquellos receptores para SARS-CoV-2 debido a que el virus cuenta con glicoproteína S en la superficie y tiene la capacidad de unirse al receptor ACE2 de las células. Esta glicoproteína S está constituida por las subunidades S1 y S2. La S1 es la encargada de definir el tropismo celular y S2 se encarga de mediar la fusión de la envoltura viral con las membranas celulares, lo lleva a que el ARN del genoma viral se libera hacia el citoplasma, el ARN no envuelto se traduce en dos lipoproteínas que son pp1a y pp1ab, juntas forman el complejo de replicación-transcripción (RTC) en una vesícula que tiene doble

membrana, para continuarse con los siguientes pasos del proceso de replicación del virus (Guo *et al.*, 2020).

2.4.1. Replicación del SARS-CoV-2 y patogénesis

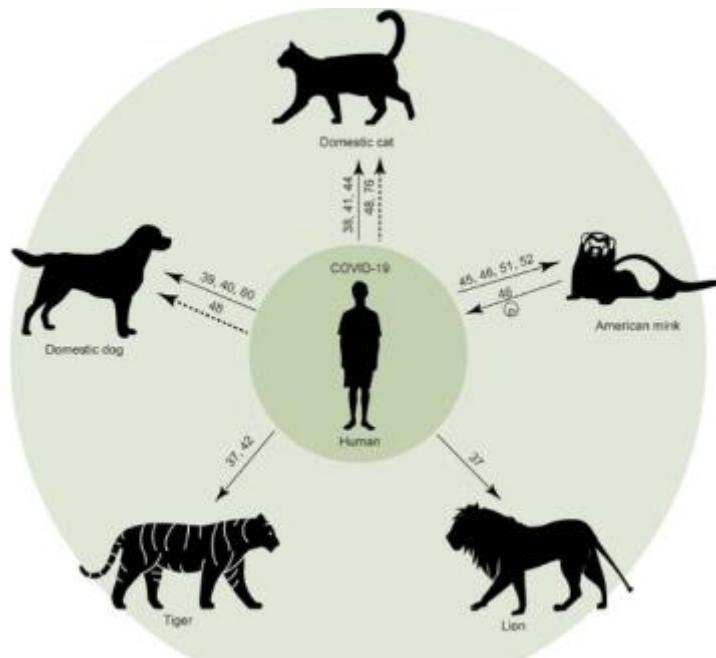
El propio proceso de replicación y la liberación de los viriones del SARS-CoV-2 causa piroptosis a la célula infectada, la cual está mediada por la Caspasa 1, lo que promueve el desarrollo del proceso inflamatorio y libera sustancias intracelulares directamente al endotelio vascular, las mismas que son identificadas por células endoteliales y macrófagos alveolares; desatando una tormenta de citoquinas y quimiocinas pro-inflamatorias, que favorecen el reclutamiento de monocitos, macrófagos y células T directamente al sitio de infección causando una amplificación de la inflamación (González-Cantero *et al.*, 2022).

2.5. Rol zoonótico de SARS-CoV-2

El término zoonosis hace referencia a una enfermedad infecciosa transmisible entre animales y el ser humano en condiciones naturales (Dabanch, 2003). Existe evidencia científica acerca de que los siete coronavirus responsables de infecciones en humanos tienen origen zoonótico, con diferentes reservorios e intermediarios (Cortés, 2021). Se habla de zoonosis inversa cuando el patógeno tiene una amplia distribución en la población humana y resulta en un mayor riesgo de transmisión de personas hacia animales. Para el caso de COVID-19 esto fue demostrado en febrero del 2020, cuando se informó de un caso de infección de SARS-CoV-2 en un canino, convirtiéndose de esta manera en el primer caso de zoonosis inversa por SARS-CoV-2 (OIE, 2022). Es motivo de preocupación la infección y propagación del SARS-CoV-2 en especies animales susceptibles tanto domésticos como silvestres, en las que su manejo o comportamiento gregario en grandes grupos y la estructura de la red de contactos llevarían a tener como consecuencia la aparición de un reservorio de virus alternativo, el cual podría llegar a reintroducirse en humanos.

Recientes investigaciones evidencian la transmisión del SARS-CoV-2 hacia animales de compañía como caninos (*Canis lupus familiaris*), felinos (*Felis catus*), hurones (*Mustelidae*) y hámsters (*Cricetinae*) debido a la estrecha convivencia con sus tutores y susceptibilidad que estos presentan, puesto que estos tienen los receptores celulares que el virus requiere para ingresar a sus células y multiplicarse satisfactoriamente. En la actualidad aún no se ha demostrado científicamente que los animales domésticos y/o de compañía, en particular perros y gatos desempeñen rol en la transmisión zoonótica al ser humano (Chiliqinga *et al.*, 2022).

Ilustración 2: Zoonosis inversa del COVID-19. Las flechas continuas muestran la posible transmisión de persona a animal, confirmada por ARN viral, datos de secuenciación o aislamiento del virus. Las flechas discontinuas muestran la presumible transmisión de persona a animal basada por datos serológicos.



Fuente: (Sookswasdi Na Ayudhya & Kuiken, 2021).

En visones (*Neovison vison* y *Mustela vison*) se han descrito varios brotes en granjas de Dinamarca y Países Bajos, en los que se evidenciado la capacidad del virus de transmitirse desde y hacia humanos que hayan estado en contacto con visones infectados con SARS-CoV-2. Las estrategias de control que dictaron autoridades ante el brote, fue la de aplicar sacrificio sanitario para todas las poblaciones de visones expuestas al virus (Cabrera *et al.*, 2022).

La circulación de SARS-CoV-2 en la población humana se logra detectar en aguas residuales, actualmente no se ha identificado algún tipo de amenaza que esto puede representar para la vida acuática y sobre todo para mamíferos marinos, sin embargo, en modelos predictivos con el uso de modelado molecular del receptor ACE2 se evaluó la posible susceptibilidad a la infección de 15 especies marinas definiéndose como probablemente vulnerables (Mathavarajah *et al.*, 2021).

2.6. Reportes de infecciones en animales de compañía

En la actualidad se ha evidenciado en varios estudios de infecciones experimentales y naturales que los perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) tienen una baja susceptibilidad al SARS-CoV-2. Existe evidencia científica de replicación viral limitada en una proporción importante de perros infectados, sin embargo, aún no se ha demostrado una infección aguda

prolongada necesaria para una transmisión sostenida. En la mayoría de los perros infectados experimentalmente se evidencia que desarrollan una respuesta inmune humoral, es decir, anticuerpos contra el SARS-CoV-2 y también se ha reportado la seroconversión en eventos de transmisión natural de humano a perro (Meekins *et al.*, 2021).

En estudios experimentales, realizados en perros Beagles para medir la susceptibilidad al SARS-CoV-2 usando una dosis viral de 1×10^5 unidades formadoras de placas de efecto citopático (PFU, Plaque-forming units) administrada por vía intranasal; en el cual en uno de los experimentos se usaron perros de 3 meses de edad y en el otro se usaron perros adultos entre 5 a 6 años de edad. En ambos estudios se obtuvo como resultado una replicación viral limitada después de la inoculación nasal. Durante el periodo de estudio que fue de 14 a 42 días no se aisló virus viable de ningún hisopo o muestra de tejido colectado de los animales inoculados (Bosco-Lauth *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2020). Sin embargo, el ARN genómicos del SARS-CoV-2 se detectó en hisopos rectales en 2 de 5 perros inoculados 2 días después de la infección y en uno de estos perros en 6 días después de la infección, esto sugiere que se produjo cierto nivel de replicación viral (Shi *et al.*, 2020). Ninguno de los perros inoculados experimentalmente mostró signos clínicos durante el período de observación de 14 a 42 días del estudio. Además, se demostró que 2 de 4 perros inoculados con el virus desarrollaron anticuerpos contra el SARS-CoV-2 a los 14 días post-infección, en el otro estudio 3 de 3 perros desarrollaron anticuerpos neutralizantes a partir de los 14 días post-infección que alcanzaron un máximo de 21 días. Con estos resultados se demuestra que los perros tienen una baja susceptibilidad a infecciones experimentales por SARS-CoV-2 con ausencia de signos clínicos y replicación viral limitada, pero con clara evidencia de seroconversión (Meekins *et al.*, 2021).

En cuanto a la infección natural, en febrero 26 del año 2020 se reportó el primer caso de infección natural por SARS-CoV-2 en perros, ocurrió en Hong Kong, China, donde un Pomerania de 17 años con varias comorbilidades, durante el periodo de cuarentena luego de que el propietario diera positivo a la infección por COVID-19. Pese a esto, el animal no mostró signología clínica a consecuencia de la infección. En marzo 18, un Pastor Alemán de 2,5 años fue diagnosticado con SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR; en ambos casos, los dos perros generaron anticuerpos detectables contra SARS-CoV-2 (De Morais *et al.*, 2020). Posteriormente, el 1 de junio del mismo año, en los Países Bajos, se detectaron anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2 en un Bulldog Americano de 8 años con dificultad para respirar y que además de que el propietario fuera diagnosticado como positivo para COVID-19 (Sterling *et al.*, 2020).

En EE.UU., dos perros dieron positivo a anticuerpos anti-SARS-CoV-2, un perro presentó signos respiratorios y letargo severo el cual fue asociado con anemia hemolítica; el otro perro no mostró signología clínica, de igual manera el propietario había sido diagnosticado con

SARS-CoV-2 (De Morais *et al.*, 2020). En mayo del 2020 un Pastor Alemán llamado Buddy de 7 años de edad fue diagnosticado con SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR después de haber estado seis semanas con dificultad para respirar. No obstante, los registros médicos proporcionados por los propietarios que fueron revisados por veterinarios de National Geographic que no participaron en su tratamiento indican que Buddy probablemente tuvo linfoma; lo que explicaría los clínicos que presentó justo antes de su muerte. No está totalmente definido que el cáncer lo hizo más susceptible a contraer SARS-CoV-2, o si el virus fue el responsable de alguno de los signos mostrados o si solo fue un caso de coincidencia de tiempo (Erdman, 2020).

Adicionalmente, en Ecuador se ha registrado el primer informe de transmisión natural de SARS-CoV-2 en perros, convirtiéndose en el primer reporte de América del Sur y el primer informe en perros que deambulan libremente; estos perros pertenecían a una comunidad indígena rural de la Amazonia Ecuatoriana. En este estudio se recolectaron muestras de hisopos orales y nasales de tres perros encontrados durante una intervención de vigilancia de COVID-19. El ARN total se extrajo de las muestras colectadas de los perros y se realizó la detección de las secuencias de los genes de SARS-CoV-2 N, ORF1ab y S. Cabe mencionar que hubo una alta tasa de infección por SARS-CoV-2 del 87,2 % dentro de la comunidad, y el 17,1 % de los individuos positivos a SARS-CoV-2 tenían una carga muy alta, superior a 1×10^8 copias/ml por lo cual es probable que esto haya facilitado la transmisión de humanos a perros. De acuerdo a lo descrito en el estudio, los resultados que obtuvieron fueron que estos 3 perros no presentaron signos clínicos, pero dieron positivo en al menos dos secuencias genéticas del SARS-CoV-2 N1 y N2; adicionalmente, 2 de los perros también fueron positivo para el gen ORF1ab y uno de ellos para el gen S. Es importante resaltar la significancia de la detección del virus en estos animales ya que al encontrarse en la selva amazónica la transmisión del SARS-CoV-2 a los mamíferos salvajes representa una preocupación potencial (Zambrano-Mila *et al.*, 2022).

En cuanto a gatos domésticos (*Felis catus domesticus*); en los meses de marzo y abril del 2020 al tomar muestras en un gato clínicamente sano, éste dio positivo para SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR, luego de que el propietario había presentado la infección por COVID-19 (AVMA, 2020). De igual manera se han reportado casos clínicos en gatos domésticos; en marzo del 2020, en Bélgica se detectó ARN viral del SARS CoV-2 mediante RT-qPCR en muestras de vómito y heces de un gato que presentó problemas respiratorios, vómito y diarrea (OIE, 2020). posteriormente el 22 de abril, en EE.UU., 2 gatos dieron positivo para SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR, luego de presentar signos respiratorios como estornudos y secreción nasal, esto posterior a que sus propietarios días atrás habían sido diagnosticados con COVID-19 (De Morais *et al.*, 2020). El 17 de abril, en Francia en una gata de 9 años de edad, se detectó ARN del SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR, este animal desarrolló signos

como anorexia, vómitos y tos, 17 días después de que su dueño diera positivo a COVID-19 (Sailleau *et al.*, 2020). No es extraño que los gatos desarrollen signos clínicos, ya que el SARS-CoV-2 penetra en la célula al unirse al receptor ACE2 y este receptor en los gatos tiene una alta identidad y similitud con el receptor humano (Wan *et al.*, 2020). Además, los gatos son susceptibles tanto a la infección natural como experimental. En un trabajo se inoculó experimentalmente a gatos con altas dosis del virus SARS-CoV-2 por vía intranasal. Estos animales no mostraron signos clínicos, pero desarrollaron anticuerpos neutralizantes y eliminaron el ARN viral en las heces (Shi *et al.*, 2020).

2.7. Manifestaciones clínicas de la COVID-19

La enfermedad infecciosa causada por el SARS-CoV-2 es un síndrome con síntomas leves que pueden llegar hasta enfermedad sistémica inflamatoria, esto en humanos. Un síntoma característico es la fiebre y puede ser acompañado de tos, anosmia o disgeusia, disnea, fatiga, mialgias odinofagia, cefalea, rinorrea, manifestaciones cutáneas y síntomas gastrointestinales tales como náusea, vómito, diarrea o dolor abdominal (Madrigal-Rojas *et al.*, 2020).

En animales los signos clínicos causadas por la infección por SARS-CoV-2 no están totalmente definidos, pero se ha descrito que pueden incluir signos como tos, estornudos, dificultad respiratoria, descarga nasal, descarga ocular, vómito o diarrea, fiebre, inapetencia y letargia. Además, pueden producirse infecciones carentes de manifestación clínica en animales, muy similar como ocurre en los humanos asintomáticos (OIE, 2022).

2.8. Diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2

A principios del brote de SARS-CoV-2 se aplicaron técnicas moleculares que detectan el genoma viral, de este modo usando la reacción de cadena de polimerasa convencional acoplada a transcripción inversa (RT-PCR). Actualmente esta prueba en tiempo real es la técnica más empleada para el diagnóstico de COVID-19 (Tastanova *et al.*, 2021).

2.8.1. Diagnóstico clínico de la infección por SARS-CoV-2 en animales

El diagnóstico clínico se realiza en base a los signos y manifestación clínica que presentan los animales; se ha reportado escasa información sobre las manifestaciones clínicas que pueden presentar. Sin embargo, los signos que presentan los animales son los anteriormente descritos (OIE, 2022).

2.8.2. Diagnóstico diferencial

Antes de realizar un diagnóstico tentativo o sugestivo de infección por SARS-CoV-2 se recomienda excluir otras causas de enfermedad respiratoria o digestiva. Al momento de reducir la lista de diagnósticos diferenciales se deberá considerar la existencia de un nexo epidemiológico con una infección confirmada en humanos o en otros animales con los que convive el paciente animal (OIE, 2021).

2.8.3. Diagnóstico de laboratorio

2.8.3.1 Muestras empleadas

De acuerdo al tipo de prueba diagnóstica que se desea realizar, las muestras que se pueden incluir son hisopos nasales, bucofaríngeo o rectales y de sangre, ya sean las muestras únicas o combinadas. Las pruebas deben validarse para el propósito, especie y la matriz a analizar (OIE, 2021).

2.8.3.2 Pruebas laboratoriales

Las pruebas laboratoriales para el diagnóstico de SARS-CoV-2 se dividen en pruebas directas e indirectas. Dentro de las pruebas directas se encuentran las pruebas para la detección de ácidos nucleicos y las pruebas para la detección de antígenos (Onoda & Martínez, 2020). Las pruebas indirectas se basan en la detección de anticuerpos, de esta manera, si dicha prueba diera como resultado positivo se supondrá que el individuo ha sido infectado previamente, se ha recuperado y no presenta manifestación clínica (Callejas *et al.*, 2021).

La OIE (Organización Internacional de Sanidad Animal), (2022) clasifica en dos grupos las pruebas para el diagnóstico de SARS-CoV-2.

2.8.3.3. Identificación de la infección

- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa acoplada a reacción de transcripción inversa (RT-qPCR).
- Amplificación isotérmica mediada por bucle o lazo acoplada a reacción de transcriptasa inversa (RT-LAMP).
- Aislamiento e identificación del virus.
- Secuencia del genoma viral.
- Otras pruebas moleculares desarrolladas para uso en humanos.

2.8.3.4. Detección de la respuesta inmune adaptativa de tipo humoral

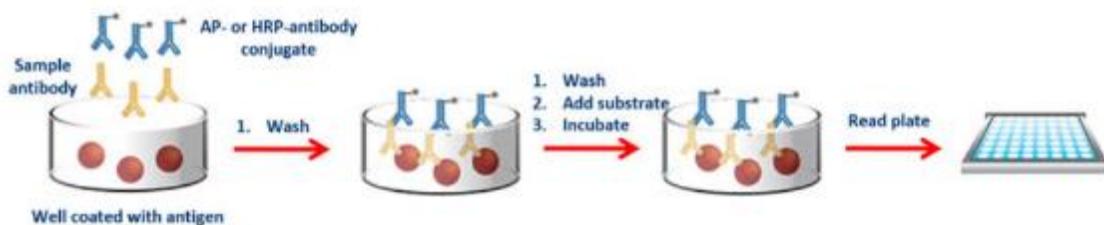
- Prueba de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos.
- Prueba de neutralización viral (VNT).
- Test rápido de anticuerpos o inmnocromatografías.
- Diversas otras pruebas para la detección de anticuerpos.

2.9. Ensayos de ELISA indirecto

ELISA es el acrónimo de *Enzyme-linked immunosorbent assay*, en español ensayo de inmunoadsorción acoplado a enzima, este es un procedimiento que permite la cuantificación de un marcador o analito de importancia en una muestra biológica, el cual puede ser una hormona, un péptido, proteína o un anticuerpo. En lo que respecta al ensayo de ELISA indirecto, éste permite la detección de anticuerpos generados en contra de un antígeno, el

procedimiento consiste en un paso de sensibilización de la superficie de cada uno de los pocillos de la placa con el antígeno, seguido del bloqueo con proteínas como la albúmina sérica bovina (BSA), gelatina o las presentes en la leche. Posteriormente se adicionan las muestras de suero a analizar, una vez concluido el periodo de incubación y lavado. Se colocan reactivos para la fase de detección. Los reactivos empleados para la detección pueden consistir en proteínas de afinidad a los anticuerpos, como SpA de *Staphylococcus aureus* o SpG de estreptococos beta hemolíticos grupo C marcadas con enzimas como trazadores, sean estas peroxidases HRP (Horseradish peroxidase), fosfatases, entre otras; también se emplean anticuerpos anti-anticuerpos de la especie a la que pertenece el suero sometido al análisis, también estas moléculas se encuentran marcadas con los trazadores antes descritos. Este método diagnóstico se usa para identificar la exposición a infecciones bacterianas, virales, parasitarias, etc., mediante la detección y/o cuantificación de anticuerpos generados en contra de antígenos específicos. La detección de anticuerpos por el método ELISA indirecto es un procedimiento ampliamente ajustable debido a que se pueden utilizar diferentes marcadores de visualización para sueros de la misma especie. En vista de que se puede enlazar más de un anticuerpo marcado por objetivo de anticuerpo (Morgan, 2017).

Ilustración 3: Esquema simplificado del ensayo de ELISA indirecto.



Fuente: Morgan, (2017).

2.10. Ensayo de Western Blot

Este método de diagnóstico de laboratorio es utilizado para identificar el reconocimiento a una proteína antigénica específica de un patógeno por anticuerpos generados en un paciente expuesto, este método requiere el uso de electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, del inglés SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) para resolver las proteínas antigénicas. La proteína o el extracto proteico resuelto se transfieren a una de Nitrocelulosa o PVDF (PolyVinylidene DiFluoride). La interacción anticuerpo-antígeno se descubre de manera similar a lo empleado en los ensayos de ELISA indirecto. La unión de la fase trazadora se evidencia con la adición de un sustrato cromogénico hidrosoluble el cual se

precipita como producto en el sitio en donde se localiza el complejo antígeno-anticuerpo donde se revela en forma de bandas coloreadas (Toche, 2012).

Esta técnica ha mejorado el diagnóstico de múltiples enfermedades y además posee ventajas sobre otras técnicas serológicas que existen dentro del mercado que no son asequibles en zonas endémicas por ser costoso, requerimientos de equipos adicionales, por el proceso y tiempo que toman realizarlas. Sin embargo, el test de ELISA indirecto continúa siendo la técnica de tamizaje serológico de uso más frecuente (Miranda-Ulloa *et al.*, 2014).

2.11. Tratamiento específico de la infección por SARS-CoV-2

Hasta el momento no se ha descrito algún tratamiento específico para las infecciones o enfermedad causada por el SARS-CoV-2 en animales (OIE, 2021).

2.12. Prevención y control de la COVID-19

Las personas que sospechan o se han confirmado que están infectadas por SARS-CoV-2 deberán restringir el contacto con animales mamíferos. Aquellos propietarios a pesar de que carezcan de síntomas de SARS-CoV-2 deben mantener las medidas de higiene durante la interacción con sus mascotas y también se recomienda evitar el contacto con personas o animales en lugares aglomerados (OIE, 2021).

Las medidas de prevención a tomar por parte del propietario de una mascota en sospecha de contacto con una persona infectada de SARS-CoV-2 es el uso de mascarillas faciales, uso de alcohol etílico como antiséptico, y en general evitar el contacto con las mascotas; en ellas se consideró el lavado de su patas e incluso proporcionarle baño luego del paseo, siendo estas una de las medidas más prácticas que se adoptó durante los momentos más álgidos de la pandemia de la COVID-19 (Villegas *et al.*, 2021).

Materiales y métodos

3.1. Área de estudio y unidad de análisis

Las muestras de suero sanguíneo post-pandemia fueron tomadas de 33 perros de tutores que padecieron de COVID-19, y con los cuales convivieron estrechamente. Estas muestras se colectaron en dos Clínicas Veterinarias de la ciudad de Cuenca, ubicadas en la parroquia Yanuncay. Por otro lado, las muestras de suero sanguíneo pre-pandemia fueron tomadas de caninos que residían en parroquias aledañas a la ciudad de Cuenca y en los alrededores del Camal Municipal de Cuenca-Azuay, entre los años 2018 y 2019, estos sueros formaban parte del biobanco del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Cuenca. En esta investigación no se distinguió raza, edad y sexo.

3.2 Actividad 1: Colección, transporte de muestras para la obtención de muestras de suero post-pandemia

3.2.1 Materiales de trabajo

- Mandil antifluido
- Guantes de látex descartables
- Mascarillas quirúrgicas
- Torniquetes
- Gorros
- Marcador rotulador de muestras
- Cinta para rotular
- Tubos sin anticoagulante (Tapa roja), agujas y adaptadores para agujas
- Rasuradora
- Tijeras
- Torundas de algodón con Alcohol etílico al 70%
- Jeringas de 5 ml
- Gel refrigerante
- Cooler

3.2.2 Materiales biológicos

- Pacientes caninos (*Canis lupus familiaris*) para los cuales existe un antecedente de convivencia estrecha con personas que desarrollaron la infección por SARS-CoV-2, la colecta de la muestra se realizó previo consentimiento del responsable de la mascota.

3.2.3 Materiales químicos

- Alcohol etílico al 70%

3.2.4 Procedimiento

Paso 1.- Una vez sujetado de manera adecuada el paciente canino, se procedió a la asepsia de la zona correspondiente a la vena cefálica con la solución de Etanol al 70%.

Paso 2.- Se realizó la punción en la vena cefálica para la recolección de al menos 2 ml de sangre de cada perro con la ayuda de tubos con vacío y sin anticoagulante.

Paso 3.- Una vez colectada la muestra, los tubos fueron colocados con la tapa hacia abajo en un ángulo de entre 25 a 30 grados, durante aproximadamente 20-30 min, a temperatura ambiente y protegidos del sol, para permitir la formación del coágulo y liberación del suero sanguíneo.

Paso 4.- Con el coágulo formado, para el transporte, los tubos fueron colocados de forma vertical en el Cooler con gel refrigerante lo cual permitió una adecuada conservación de las muestras.

Paso 5.- Las muestras fueron trasladadas al laboratorio Biología Molecular de la F.CC.AA. de la Universidad de Cuenca, en donde se conservaron en refrigeración ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) por un periodo máximo de 5 días para la obtención del suero sanguíneo.

3.3 Actividad 2: Obtención de suero sanguíneo de las muestras de sangre

3.3.1 Materiales físicos y equipos

- Micropipetas de varios volúmenes y sus puntas
- Tubos eppendorf
- Palillos de dientes estériles
- Marcadores
- Papel absorbente
- Gradillas
- Microcentrífuga
- Refrigerador ($\pm 4^{\circ}\text{C}$)
- Ultracongelador (-80 °C)

3.3.2 Materiales biológicos

Muestras de sangre colectadas en tubos sin anticoagulante mantenidas en refrigeración

3.3.3 Materiales químicos

Alcohol etílico al 70%

3.3.4 Procedimiento

Paso 1.- Para la obtención del suero de las muestras de sangre almacenadas en refrigeración, en posición vertical con la tapa hacia arriba para favorecer la retracción del coágulo y liberación del suero, dentro de un periodo entre 1 a 5 días como máximo se procedió cuidadosamente a retirar y desechar el coágulo con ayuda de un palillo de dientes estéril.

Paso 2.- Se tomó de cada tubo \pm 500 μ l de suero sanguíneo y se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml, previamente identificados.

Paso 3.- Para eliminar la mayoría de los glóbulos rojos liberados del coágulo, las muestras de suero sanguíneo fueron centrifugadas a 4,500 $\times g$, por 10 min a temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$).

Paso 4.- Posteriormente, se tomó \pm 400 μ l de cada muestra de suero sanguíneo se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml, previamente rotulados.

Paso 5.- Las muestras de suero sanguíneo se mantuvieron en congelación (-80°C) hasta su uso en los ensayos de ELISA indirecto y Western Blot.

3.4 Actividad 3: Ensayo de ELISA indirecto

3.4.1 Materiales físicos y equipos

- Placas de 96 pozos
- Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas
- Recipientes de vidrio para la preparación de soluciones
- Agitador orbital
- Potenciómetro (pHmetro)
- Balanza analítica
- Lector de placas de ELISA Epoch (BioTek)
- Computadora

3.4.2 Materiales biológicos

- Muestras de suero sanguíneo
- Solución con el péptido recombinante D+E ($\text{L}^{230}\text{-A}^{419}$) de la Nucleoproteína del SARS-CoV-2, previamente cuantificada que fue proporcionada por el Dr. Antonio J. Vallecillo, del Laboratorio de Biología Molecular de la F.CC.AA. de la Universidad de Cuenca.

3.4.3 Materiales químicos

- Solución para la sensibilización de las placas de ELISA (Nunc MaxiSorp flat-bottom plate, Invitrogen, No. cat.: 442404), que consistió en Buffer de carbonatos (100 mM de Na_2CO_3 (Merck, No. cat.: 106393); 100 mM de NaHCO_3 (Merck, No. cat.: 144558), pH 9.6) con 2 $\mu\text{g/ml}$ (0.1 μg por pozo) del péptido recombinante D+E ($\text{L}^{230}\text{-A}^{419}$)
- Solución buferada de fosfatos (PBS), pH 7.4, (137 mM de NaCl (Sigma, No. cat S3014); 2.7 mM KCl (Sigma, No. cat 746436); 10 mM NaH_2PO_4 (Fisher, No. cat S369-1); 1.8 mM KH_2PO_4 (Sigma, No. cat.: P0662), pH 7.4)
- Solución para el lavado de las placas (PBS-T0.05) (PBS, pH 7.4 y 0.05% de Tween 20 (Sigma, No. cat.: P1379))
- Solución para el bloqueo de las placas y la dilución de los sueros (PBS-T0.05-BSA3) (PBS-T0.05; 3% de BSA (Albúmina sérica bovina) fracción V (Roche, No. cat 10735078001))

- Solución para la detección de anticuerpos (PBS-T0.05-BSA3; 100 ng/ml de Proteína A-HRP-(Horseradish peroxidase) (MP Biomedical, No. cat.: 0855901)
- Solución del sustrato para la Peroxidasa (Solución de ABTS) (100 mM de Ácido cítrico (Sigma, No. cat.: 791725), pH 4.5; 0.5487 mg/ml (1 mM) de ABTS (Sigma, No. cat A1888) y 1:1,000 (v/v) de una solución de H₂O₂ al 30% (Fisher, No. cat H325-4)

3.4.4 Procedimiento

Paso 1.- Para el ensayo de ELISA indirecto se procedió a la sensibilización de las placas, para lo cual se colocó 50 µl de la Solución de sensibilización del péptido recombinante D+E (L^{230} - A^{419}) por cada pocillo. Las placas se incubaron en estático durante toda la noche (± 14 h) a una temperatura de 4 °C (Refrigeración).

Paso 2.- Una vez concluida la sensibilización de las placas con el antígeno, se procedió al bloqueo de las placas retirando la Solución de sensibilización y colocando en su lugar 100 µl de la Solución de bloqueo, y se sometieron a incubación por 2 h a una temperatura de 23 a 25 °C (ambiente) en estático.

Paso 3.- Una vez concluido la sensibilización y bloqueo de las placas, se colocaron cada una de las muestras de suero diluido 1:20 en la Solución de dilución de los sueros, por duplicado (50 µl) previo lavado de las placas con la Solución de lavado (3 veces durante 5 min, en agitación a temperatura ambiente).

Paso 4.- Las placas con las muestras de suero fueron incubadas por 1 h, en agitación constante a temperatura ambiente. Concluida la incubación se realizaron 3 lavados, de 5 min con la solución de lavado.

Paso 5.- Posterior a los lavados, se adicionaron 50 µl de la Solución con la Proteína A-HRP, y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante.

Paso 6.- Una vez concluida la incubación con la Solución de proteína A-HRP, se realizaron 3 lavados, de 5 min con la Solución de lavado.

Paso 7.- Concluidos los lavados se adicionaron de 50 µl de la Solución del sustrato, y se incubaron las placas por 15 min a temperatura ambiente, en estático y protegida de la luz.

Paso 8.- Concluida la incubación se procedió a realizar la lectura en el lector de placas de ELISA (Epoch, BioTek) a una longitud de onda de 420 nm.

Paso 9.- Como reacción positiva a la presencia de anticuerpos en contra del péptido recombinante se consideró a las lecturas mayores al promedio de la lectura del blanco más dos desviaciones estándar de las lecturas del blanco de cada placa.

3.5 Actividad 4: Ensayo de Western Blot

3.5.1 Materiales físicos y equipos

- Cámara de electroforesis para SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

- Cámara de electroforesis para la electrotransferencia de las proteínas
- Fuente de poder
- Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas
- Recipientes de vidrio para la preparación de soluciones.
- Potenciómetro (pHmetro)
- Balanza analítica
- Agitador orbital
- Escáner
- Computadora

3.5.2 Materiales biológicos

- Solución con el péptido recombinante D+E ($L^{230}-A^{419}$)
- Muestras de suero sanguíneo

3.5.3 Materiales químicos

3.5.3.1 Para la resolución de las proteínas mediante SDS-PAGE

- Agua destilada estéril
- Solución resolving buffer 4X (1,500 mM de Tris-HCl, pH 8.8 (Sigma, No. cat.: T4661, Fisher, Cat. n.º: 7647-01-0), 0.4% de SDS (Sigma, No. cat 71725)
- Solución stacking buffer 4X (1,500 mM de Tris-HCl, pH 8.8 (Sigma, No. cat.: T4661, Fisher, Cat. n.º: 7647-01-0), 0.4 % de SDS (Sigma, No. cat.: 71725)
- Solución de acrilamida/bis-acrilamida 29:1 al 30 % (Bio-Rad, No. cat.: 161015)
- Solución al 10% de Persulfato de amonio (0.1 g/ml de Persulfato de amonio (Sigma, No. cat.: A3678)
- Solución TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletano-1,2-diamina (Bio-Rad, No. cat 161-08.01)
- Solución buffer para SDS-PAGE (25 mM de Tris base; 1% de SDS; 191 mM de Glicina (Sigma, No. cat.: T4661, 71725; Bio-Rad, No. cat.: 161-0718)
- Solución loadding buffer para proteínas 2X (125 mM de Tris-HCl, pH 8.8; 4 % de SDS; 5 % de β-Mercaptoetanol; 20 % de Glicerol; 0.0025 % de Azul de bromofenol (Sigma, No. cat.: T4661, 71725, 63689, G5516, B8026))
- Marcador de peso molecular para proteínas (SDS-PAGE molecular weight standars-Low range (Bio-Rad, Cat. n.º: 161-0304))

3.5.3.2 Para la electrotransferencia de las proteínas a la membrana PVDF

- Solución buffer de transferencia 10X (250 mM de Tris base; 1.91 M de Glicina (Sigma, No. cat T4661, Bio-Rad, No. cat.161-0718)
- Membranas PVDF (Thermo scientific, No. cat.: 88520)
- Alcohol etílico (Sigma, No. cat.: E7023)

3.5.3.3 Para la tinción de las proteínas transferidas a la membrana PVDF

- Solución para la tinción de las membranas de PVDF con azul de Coomassie (1 % de Azul de Coomassie R-250, 10% de Metanol, 7 % de Ácido acético glacial (Bio-Rad, No. cat.: 1610400, Sigma, No. cat.: E7023, Fisher, No. cat 64-19-7))
- Solución para desteñir las membranas teñidas con azul de Coomassie (10% de Metanol; 10% de Ácido acético glacial (Sigma, No. cat.: E7023, Fisher, No. cat.: 64-19-7))

3.5.3.4 Para la inmunodetección de los anticuerpos

- Solución para el bloqueo de las membranas (PBS-T0.05-BSA3) (10 mM de NaH₂PO₄; 1.8 mM de KH₂PO₄; 137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl; 0.05% de Tween 20, 3% de BSA fracción V, pH 7.4 (Fisher, No. cat S369-1, Sigma, No. cat P0662, S3014, 746436, P1379, Roche, Cat. no.: 10735078001)
- Solución para la dilución de los sueros sanguíneos (PBS-T0.05-BSA3)
- Solución para el lavado de las membranas (PBS-T0.05) (10 mM de NaH₂PO₄; 1.8 mM de KH₂PO₄; 137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl; 0.05% de Tween 20, pH 7.4 (Fisher, No. cat S369-1, Sigma, No. cat P0662, S3014, 746436, P1379)
- Solución para la detección de anticuerpos (PBS-T0.05-BSA3; 100 ng/ml de Proteína A-HRP-(Horseradish peroxidase) (BioRad, No. cat.: 1706522)
- Solución del sustrato para la peroxidasa (500 µg/ml de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) en PBS-T0.05 (Sigma, No. cat D5637)

3.5.4 Procedimiento

Para el ensayo Western Blot se requirió resolver el D+E ($L^{230}\text{-}A^{419}$) recombinante mediante SDS-PAGE, su posterior electrotransferencia a las membranas de PVDF y finalmente la detección del posible reconocimiento de los anticuerpos presentes en la muestra de suero hacia el péptido recombinante.

3.5.4.1 Para resolución del péptido D+E ($L^{230}\text{-}A^{419}$) recombinante mediante SDS-PAGE

Paso 1.- Para resolver el péptido D+E ($L^{230}\text{-}A^{419}$) se preparó un gel discontinuo desnaturizante de poliacrilamida al 12 %, para el gel resolutivo (Resolving) se colocó en un recipiente limpio (Tubo Falcón de 50 ml) los siguientes reactivos, previo al armado de las placas con los aditamentos para formar el gel (Gel casting system):

Tabla 2: Reactivos para la resolución del péptido D+E (L^{230} - A^{419}) recombinante.

Reactivos:	Número de geles (Volumen del reactivo):	
	Un gel (ml)	Dos geles (ml)
Agua destilada estéril	2.625	5.250
Solución resolving buffer 4X	1.875	3.750
Solución de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) al 30%	3.000	6.000
Solución al 10% de Persulfato de amonio	0.025	0.050
Solución TEMED	0.002	0.005
Volumen total	7.027	15.055

Paso 2.- Se mezclaron cuidadosamente los reactivos, evitando en lo posible la formación de espuma y de la misma manera se transfirieron a los moldes de los geles, hasta la marca previamente colocada para definir la longitud del gel. Se adicionó 500 μ L de agua destilada estéril para evitar la evaporación del agua del gel y el ingreso de Oxígeno, y se esperó el tiempo suficiente para permitir la polimerización del gel.

Paso 3.- Una vez que polimerizó el gel resolutivo se procedió a la preparación del gel concentrador (Stacking), para lo cual se adicionó en un recipiente limpio (Tubo Falcon de 50 ml) los siguientes reactivos:

Tabla 3: Reactivos para la preparación del gel concentrador (Stacking).

Reactivos:	Número de geles (Volumen del reactivo):	
	Un gel (ml)	Dos geles (ml)
Agua destilada estéril	1.445	2.890
Solución stacking buffer 4X	0.625	1.250
Solución de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) al 30%	0.375	0.750
Solución al 10% de Persulfato de amonio	0.050	0.100
Solución TEMED	0.005	0.010
Volumen total	2.500	5.000

Paso 4.- Se mezclaron los reactivos con excepción del TEMED. Se procedió a retirar el agua adicionado al gel resolutivo, se colocó los peines para formar los pozos en un formato de gel preparativo. Adicionamos al gel concentrador el TEMED, mezclamos de forma cuidadosa para evitar la formación de espuma, cuidadosa y rápidamente se transfirieron a los moldes de los

geles. Se adicionó un poco de agua destilada estéril y se esperó el tiempo suficiente para permitir la polimerización del gel.

Paso 5.- Una vez preparados los geles, se colocó en la cámara de electroforesis, se adicionó la Solución buffer de electroforesis SDS-PAGE.

Paso 6.- El péptido D+E ($L^{230}\text{-}A^{419}$) (20 μg) antes de ser colocado en el gel fue mezclado con un volumen igual de la Solución buffer de carga 2X (250 μl de volumen total), y sometido a ebullición por 5 min.

Paso 7.- Se cargó el péptido recombinante y el Marcador de peso molecular para proteínas en sus respectivos pozos.

Paso 8.- Se procedió a la resolución con la aplicación de 60 Voltios hasta que las muestras llegaron al gel separador, posteriormente se incrementó el voltaje a 120 y aplicó durante el tiempo necesarios para que el frente de corrida llegue al borde del gel.

Paso 9.- Una vez resuelto el péptido recombinante mediante SDS-PAGE se procedió a la electrotransferencia.

3.5.4.2 Para electrotransferencia del péptido D+E ($L^{230}\text{-}A^{419}$) recombinante resuelto mediante SDS-PAGE

Paso 1.- Una vez resuelto el péptido D+E ($L^{230}\text{-}A^{419}$) mediante SDS-PAGE, se procedió a desarmar la cámara de electroforesis, retirar los geles de los moldes.

Paso 2.- En un recipiente plástico con tapa para evitar la evaporación se colocó Alcohol metílico, y se sumergió en él una porción de membrana PVDF de dimensiones similares al gel.

Paso 3.- Se adicionó en la cámara de electrotransferencia la Solución buffer de transferencia fría ($\pm 4^\circ\text{C}$) y se colocó el adaptador de las carcasa de los “sándwich” de la transferencia.

Paso 4.- Para el armado de los “sándwich” de la transferencia, se colocó en un recipiente amplio cantidad suficiente de la Solución buffer de transferencia, se introdujo la porción de la carcasa para el “sándwich” del cátodo (Color negro), las esponjas de relleno y una porción de papel filtro, se colocó cuidadosamente el gel previamente retirado de los moldes de vidrio, inmediatamente se colocó la membrana evitando la formación de burbujas entre la membrana de PVDF y el gel, se adicionó una porción de papel filtro, las esponjas y finalmente a otro porción de la carcasa (Color rojo). Cuidadosamente se retiró del recipiente y se colocó en la cámara de electrotransferencia.

Paso 5.- Para la transferencia se completó el armado de la cámara y se aplicará un voltaje de 60 Voltios por 1 h.

Paso 6.- Una vez concluida la electrotransferencia se desarmó la cámara y retiró la membrana del “sándwich” y se secó a temperatura ambiente, si fueron visibles las bandas de las proteínas se marcaron con ayuda de un lápiz.

3.4.4.3 Para la tinción del péptido D+E (L^{230} - A^{419}) transferido a la membrana de PVDF con Azul de Coomassie

Paso 1.- Para verificar la resolución de las proteínas y la electrotransferencia del péptido D+E (L^{230} - A^{419}) a las membranas se seccionó una porción de la membrana de ambos extremos, intentando incluir una parte de las bandas de las proteínas resueltas y se tiñó con Azul de Coomassie. El resto de la membrana se seccionó en tiras no mayores a 2 mm de grosor y se almacenaron a temperatura ambiente, protegidas de la luz y el polvo.

Paso 2.- Para la tinción de las porciones de las membranas, éstas fueron sumergidas por 20 a 30 segundos en la Solución colorante para la tinción de azul de Coomassie, agitándolas para favorecer el contacto con el colorante.

Paso 3.- Inmediatamente se retiró la Solución colorante para la tinción de azul de Coomassie, se adicionó cantidad suficiente de la Solución para desteñir las membranas teñidas con la tinción de azul de Coomassie, se agitó constantemente hasta observar las bandas teñidas del marcador de peso molecular, la del péptido D+E (L^{230} - A^{419}). Las membranas fueron secadas y guardadas para su posterior uso.

3.5.4.4 Para detección del reconocimiento de las proteínas recombinantes por los anticuerpos presente en los sueros pre y post-pandemia

Paso 1.- Para la detección del posible reconocimiento de los anticuerpos de los caninos hacia el péptido D+E (L^{230} - A^{419}) recombinante se procedió a realizar el bloqueo de las membranas, para lo cual fueron sumergidas en la Solución de bloqueo durante 1 h en agitación constante a temperatura ambiente (± 23 °C).

Paso 2.- Durante el periodo de bloqueo de las membranas se procedió a descongelar las muestras de suero sanguíneo, y se diluyeron 1:20 en 1 ml de la Solución para dilución de los sueros sanguíneos, en tubos de vidrio de tamaño suficiente para colocar las porciones de las membranas (Tiras de no más 2 mm de grosor) con las proteínas recombinantes.

Paso 3.- Una vez concluido el periodo de bloqueo de las membranas, a cada tubo con la muestra de suero diluido se le adicionó una porción de la membrana. Los tubos así preparados fueron incubados por 1 h en agitación constante.

Paso 4.- Una vez concluida la incubación, se retiró la solución de los sueros diluidos de cada tubo y se procedió a realizar 3 lavados con 1 ml de la solución de lavado, por 5 min cada lavado en agitación constante.

Paso 5.- Concluido los lavados, las tiras fueron transferidas a un recipiente con cantidad suficiente de la solución con la Proteína A-HRP, se incubaron en agitación constantes a temperatura ambiente por 1 hora. Una vez que concluyó la incubación se procedió a realizar 3 lavados con cantidad suficiente de la solución de lavado, por 5 min cada lavado en agitación constante.

Paso 6.- Una vez concluidos los lavados, en un recipiente se colocó la solución con el sustrato, cuidadosamente se colocaron las membranas y se mantuvieron en incubación, agitándolas por 5 min.

Paso 7.- Concluido el tiempo de incubación, las membranas fueron lavadas dos veces por 5 min en agua destilada estéril.

Paso 8.- Las membranas lavadas se secaron a temperatura ambiente, se ordenaron y fijaron a un soporte de papel (Cartulina) y se fotodocumentaron con ayuda de un escáner.

Paso 9.- Las imágenes fueron analizadas mediante el software libre ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) para evaluar la intensidad de la señal obtenida en los ensayos Western Blot.

Paso 10.- Como reconocimiento positivo se consideró a las muestras para las que se obtenga un valor de la intensidad de la señal mayor al valor de la intensidad de la señal de las réplicas del control negativo (Western Blot sin la presencia de suero sanguíneo) más dos desviaciones estándar.

3.6 Actividad 5: Análisis estadístico

Para mostrar los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA indirecto y Western Blot para identificar el reconocimiento del péptido D+E ($L^{230}-A^{419}$) de la Nucleoproteína de SARS-CoV-2 por anticuerpos generados en los perros potencialmente expuestos a COVID-19, se usaron herramientas de estadística descriptiva adecuada a los tipos de variables implicadas, lo que permite evidenciar el comportamiento de los datos generados.

Se realizó una comparación de las proporciones de muestras de suero positivas definidas en los ensayos de ELISA indirecto y Western Blot con los sueros caninos colectados en períodos pre y post-pandemia (4 grupos), en dicha comparación al estar implicada una variable nominal dicotómica y el uso de muestras correlacionadas por lo que se usó la prueba estadística McNemar.

El estadístico de McNemar corresponde a una prueba no paramétrica de comparación de proporciones para dos muestras relacionadas y debe cumplir las siguientes condiciones: los datos se ajustan a la distribución de Chi cuadrado y debe tener un nivel nominal de la variable dependiente (Coronel, 2020). Es por eso que en este estudio científico se optó por este método de análisis estadístico acoplándose idealmente a estas variables.

Resultados

4.1. Ensayo de ELISA indirecto

Las 63 muestras de suero sanguíneo recolectadas durante la época pre-pandemia y post-pandemia junto a 3 pozos control (Blancos), fueron analizados por medio del ensayo de ELISA indirecto con el uso del péptido recombinante D+E ($L^{230}-A^{419}$) de la Nucleoproteína del SARS-CoV-2. Se consideró como resultado positivo a la presencia de anticuerpos las lecturas de densidades ópticas (DO's) mayores al valor promedio de los pozos blanco más dos desviaciones estándar de la media de las mismas lecturas de los blancos, en otras palabras, las muestras con valores superiores a 0,12 DO's se consideraron positivas a la presencia de anticuerpos anti-péptido D+E ($L^{230}-A^{419}$).

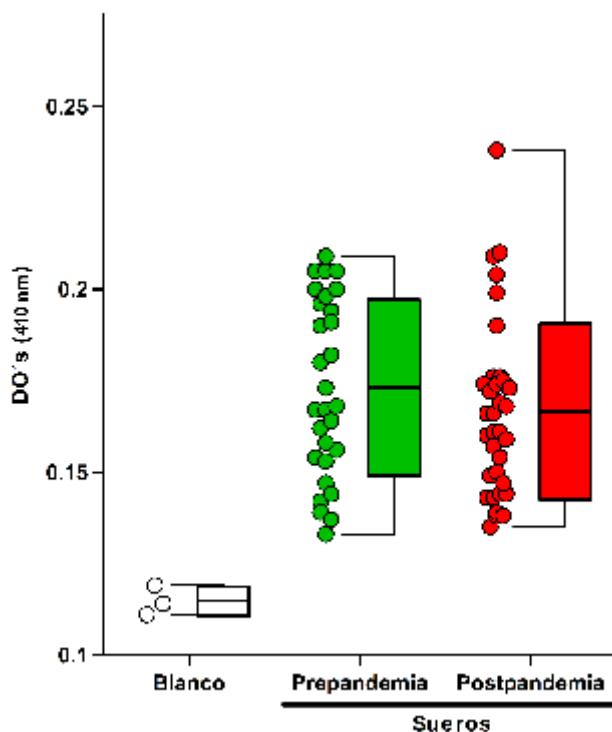


Figura 1: Resultados obtenidos del ensayo de ELISA indirecto aplicado para la detección de anticuerpos de SARS-CoV-2 empleando el péptido recombinante D+E ($L^{230}-A^{419}$) de la Nucleoproteína del Virus en caninos (*Canis lupus familiaris*) potencialmente expuestos a COVID-19. Valores de densidad óptica (DO) obtenidos con los sueros pre-pandemia (Verdes) y post-pandemia (Rojos), junto a los valores de los pozos blanco (Sin suero).

Como se observa en la **Figura 1**, de los 34 sueros sanguíneos post-pandémia se consideraron las 34 muestras como resultados positivos, los cuales mostraron la presencia de anticuerpos reactivos al dominio del extremo carboxiterminal de la Nucleoproteína del SARS-CoV-2, por

otro lado, en los 29 sueros sanguíneos pre-pandémicos también se evidenció muestras positivas. Los sueros sanguíneos utilizados en pre-pandemia fueron recolectados entre el año 2018 y 2019 en zonas en donde existía la presencia de bovinos, mientras que las muestras post-pandemia fueron recolectadas en caninos que habitaban dentro del casco urbano.

4.2. Ensayo de Western Blot

De la misma forma que en el ensayo de ELISA indirecto, las 63 muestras de sueros sanguíneos recolectadas durante la época pre-pandemia y post-pandemia junto a 3 ensayos control (sin suero), se analizaron con el ensayo de Western Blot con el péptido D+E ($L^{230}-A^{419}$) como antígeno. Para este caso, se consideró como muestras positivas a la presencia de anticuerpos de acuerdo a la intensidad de la señal expresada en pixeles mayores al valor promedio de los blancos más dos desviaciones estándar de la media de las mismas lecturas de los blancos, por lo que valores superiores a 160,2 pixeles se asumieron como muestras positivas.

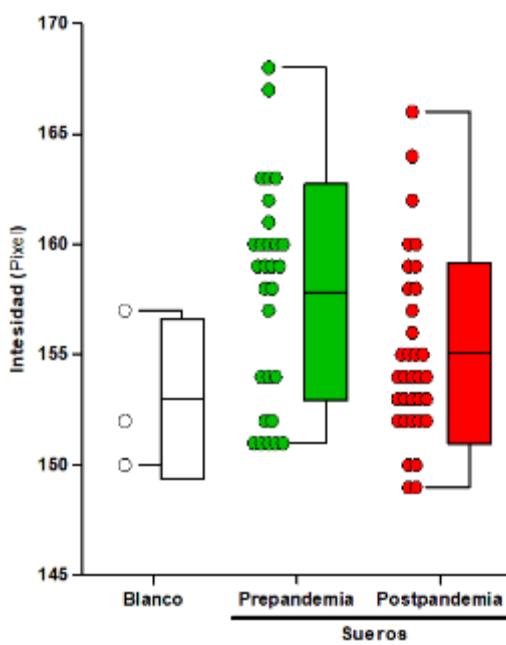


Figura 2: Resultados obtenidos del ensayo de Western Blot aplicado para la detección de anticuerpos de SARS-CoV-2 empleando el péptido recombinante D+E ($L^{230}-A^{419}$) de la Nucleoproteína del SARS-CoV-2 en caninos (*Canis lupus familiaris*) potencialmente expuestos a COVID-19. Valores de intensidad de la señal (Pixel) obtenidos con los sueros pre-pandemia (Verdes) y post-pandemia (Rojos), junto a los valores de ensayos sin suero (Blancos).

De acuerdo a lo mostrado en la **Figura 2**, de los 34 sueros sanguíneos post-pandémicos se consideraron 5 muestras como resultados positivos a la presencia de anticuerpos anti-Nucleoproteína del SARS-CoV-2, sin embargo, en los 29 sueros sanguíneos pre-pandémicos también se evidenció en 12 muestras la presencia de anticuerpos reactivos al péptido recombinante D+E ($L^{230}-A^{419}$).

4.3. Prueba de McNemar

Los resultados del análisis estadístico se muestran en la **Tabla 4**, en ella se evidencia la limitada coincidencia entre los dos ensayos serológicos aplicados a los sueros colectados durante el periodo pre-pandemia, se observa menos del 50 % (37.93 %) de coincidencia de muestras positivas entre las pruebas diagnósticas. Es decir que los métodos no mostraron un comportamiento similar a aplicarse a los sueros colectados en el periodo pre-pandemia ($p = 0.0010$).

Tabla 4: Comparación de los ensayos serológicos aplicados a los sueros pre-pandémicos mediante la prueba estadística de McNemar.

	Negativo		Positivo		Total ELISA indirecto	
Frecuencias	Absolutas (Fi)	Relativas (fi)	Absolutas (Fi)	Relativas (fi)	Absolutas (Fi)	Relativas (fi)
Positivo	17	58.62 %	11	37.93 %	28	96.55 %
Negativo	0	0.00 %	1	3.45 %	1	3.45 %
Total Western Blot	17	58.62 %	12	41.38 %	29	100.00 %

El Chi cuadrado fue de $p = 0.0010$, por lo cual existe diferencia significativa.

Tabla 5: Comparación de los ensayos serológicos aplicados a los sueros post-pandémicos mediante la prueba estadística de McNemar.

	Negativo		Positivo		Total ELISA indirecto	
Frecuencias	Absolutas (Fi)	Relativas (fi)	Absolutas (Fi)	Relativas (fi)	Absolutas (Fi)	Relativas (fi)
Positivo	29	85.29 %	5	14.71 %	34	100.00 %
Negativo	0	0.00 %	0	0.00 %	0	0.00 %
Total Western Blot	29	85.29 %	5	14.71 %	34	100.00 %

El Chi cuadrado fue de $p = 0.0001$, por lo cual existe diferencia significativa.

De manera similar, al contrastar los ensayos serológicos a muestras de sueros post-pandémicos (**Tabla 5**) se encontró que el ELISA indirecto y Western Blot no coinciden en más del 80 % (14.71 %) de las muestras consideradas positivas, lo que indica que hay diferencias significativas en el comportamiento entre los métodos serológicos aplicados ($p = 0.0001$).

Discusión

En un estudio anterior realizado por Chiliquinga *et al.*, (2022) detectaron anticuerpos del SARS-CoV-2 en perros en contacto con humanos positivos a COVID-19 por el método de inmunofluorescencia indirecta. Reportan que 2 de 40 caninos dieron positivo para SARS-CoV-2, encontrando valores de anticuerpos mayores a 0,04 Miliunidades internacionales por mililitro ($\text{mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$), tanto para IgG como para IgM. Por otro lado, Zambrano-Mila *et al.*, (2022) realizaron un estudio en la Amazonía ecuatoriana, en donde identificaron 3 caninos positivos a COVID-19 con la prueba RT-PCR; estos animales convivían con personas cuya tasa de infección del SARS-CoV-2 dentro de la comunidad era del 87.2 %. Los resultados de las investigaciones descritas anteriormente muestran concordancia con los resultados descritos en el presente trabajo al identificarse sueros positivos a la presencia de anticuerpos reactivos contra el dominio carboxiterminal de la Nucleoproteína del virus causal de la COVID-19, con el uso de ELISA indirecto y Western Blot. Sin embargo, es importante destacar el inesperado resultado en las muestras de sueros caninos colectados meses antes de iniciada la pandemia de COVID-19, un número significativo de muestras anticuerpos reactivos al péptido recombinante D+E ($\text{L}^{230}\text{-A}^{419}$) de la Nucleoproteína del SARS-CoV-2.

Guo *et al.*, (2020) indican que la similitud de aminoácidos es levemente mayor entre el SARS-CoV-2 y el *Betacoronavirus* canino, en comparación con los *Alfacoronavirus* caninos y felinos, y esto puede explicar el reconocimiento del péptido recombinante D+E ($\text{L}^{230}\text{-A}^{419}$) por los sueros pre-pandemia, a pesar de no emplearse la Nucleoproteína completa, ya que los perros y los gatos son susceptibles a sus propios coronavirus. Los sitios antigenicos predichos por análisis *in silico* muestran varios epítopenos lineales con reacción cruzada potencial, pudiendo ser responsable de una reacción falsa positiva, esto nos explicaría el alto porcentaje de positivos tanto en muestras pre-pandemia como en post-pandemia. Previamente Colitti *et al.*, (2022) plantearon el uso del fragmento D+E ($\text{L}^{230}\text{-A}^{419}$), por ser este segmento inmunodominante, lo cual favoreció un incremento de la especificidad del ensayo hasta en un 99.5 % en sueros de caninos residentes de áreas urbanas. Adicionalmente la comparación *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la región inmunodominante D+E ($\text{L}^{230}\text{-A}^{419}$) de la Nucleoproteína del SARS-CoV-2 y coronavirus relacionados mostró el grado más bajo de similitud en comparación con la Nucleoproteína completa, por tanto, respalda aún más el uso para el desarrollo de un test serológico específico y sensible para la identificación de la exposición al SARS-CoV-2 en animales susceptibles. Sin embargo, en este trabajo a pesar de que se usó el fragmento descrito por Colitti *et al.*, (2022) se identificaron muestras positivas a la presencia de anticuerpos tanto en sueros pre-pandemia como en post-pandemia, sugiriendo una baja especificidad diagnóstica de los ensayos de ELISA indirecto y Western Blot con el uso del péptido recombinante D+E ($\text{L}^{230}\text{-A}^{419}$).

Por otro lado, la inesperada alta frecuencia de animales con anticuerpos reactivos al péptido recombinante D+E (L^{230} - A^{419}), podría ser consecuencia de que las muestras de suero prepandemia se recolectaron en la ruralidad de Cuenca, en zonas aledañas del Camal Municipal y de la feria de ganado, teniendo como antecedente que estos animales convivían estrechamente con bovinos (*Bos spp.*), debido a esto se puede pensar que existe reconocimiento cruzado entre los *Betacoronavirus* bovinos (BCoV) con el SARS-CoV-2, dando así una identificación de anticuerpos en sueros colectados durante el periodo prepandemia. Adicionalmente, hay reportes que muestran que aproximadamente el 90 % de la población mundial de ganado bovino tiene anticuerpos contra BCoV y una encuesta sobre la transmisión experimental entre especies de rumiantes, perros, caballos y otros animales salvajes sugieren el papel del BCoV en la sensibilización de los caninos incluidos como sujetos de estudio en la presente investigación (Jevšnik *et al.*, 2021).

Los BCoV pertenecen a la familia *Coronaviridae* en el orden *Nidovirales* y son miembros del subgrupo 2a junto con el virus de la Encefalomielitis hemaglutinante porcina (HEV), el CoV respiratorio canino y los coronavirus CoV-OC43 y HKU1 humanos. En el caso de los coronavirus causales del SARS están asociados a infecciones respiratorias y entéricas en humanos y animales, estos pertenecen al nuevo subgrupo 2b de coronavirus (Saif, 2010). El análisis de los datos de las secuencias genómicas de los coronavirus ha revelado que el HEV porcino y el CoV-OC43 representan coronavirus que probablemente evolucionaron a partir de cepas ancestrales de BCoV (Saif, 2010).

En otro sentido, el ensayo de Western Blot es una técnica que permite identificar anticuerpos que reconocen antígenos que se absorben en una membrana, lo que reduce la interacción con epítopes conformacionales que tienen una forma tridimensional específica por su estructura proteica. Por lo que, en razón de lo comentado anteriormente, el péptido usado en este trabajo no es el adecuado para la búsqueda de anticuerpos en animales potencialmente expuestos al SARS-CoV-2 (Davelois *et al.*, 2016).

Hachim *et al.*, (2020) al evaluar la respuesta de anticuerpos contra 15 antígenos diferentes del SARS-CoV-2 en pacientes humanos con COVID-19, evidenciaron un diagnóstico altamente preciso de la exposición SARS-CoV-2 con el uso de los antígenos ORF3b y ORF8. Debido a que ORF3b y ORF8 inducen una respuesta antigénica específica más fuerte durante la infección del SARS-CoV-2, puedan considerarse en posteriores investigaciones como antígenos en el desarrollo de ensayos para la identificación anticuerpos en animales potencialmente expuestos a SARS-CoV-2.

Conclusiones

El péptido recombinante D+E ($L^{230}-A^{419}$) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 no es útil para detectar anticuerpos en caninos (*Canis lupus familiaris*) potencialmente expuestos a COVID-19 ya que se identificaron anticuerpos tanto en sueros pre-pandemia como post-pandemia.

Al contrastar los resultados obtenidos con las pruebas ELISA indirecto y Western Blot, se evidenció una diferencia significativa entre ambos ensayos aplicados a los sueros colectados en los periodos pre y post-pandemia, sin embargo, tiene poca relevancia la comparación de los métodos diagnósticos debido a que ambas fueron capaces de identificar sueros positivos tanto en el periodo pre y post-pandemia, pero es importante destacar que el Western Blot es la prueba de mayor especificidad analítica.

Recomendaciones

Debido a que los resultados del presente trabajo muestran que el péptido recombinante D+E ($L^{230}-A^{419}$) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 tiene limitada especificidad para la identificación de anticuerpos en caninos potencialmente expuestos a SARS-CoV-2, se sugiere la evaluación de otros péptidos virales, como los antígenos ORF3b y ORF8.

Adicionalmente, crear un biobanco de sueros de caninos diagnosticados como infectados por SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR u otra prueba de biología molecular.

Por último, pero no menos importante, se recomienda mantener la vigilancia de esta enfermedad en otros animales domésticos, sobre todo en aquellos en que los humanos mantienen un estrecho contacto por su manejo, en especial los bovinos.

Referencias

- Abuabara Franco, E., Bohórquez Rivero, J., Restom Arrieta, J., Uparella Gulfo, I., Sáenz Lopez, J., & Restom Tinoco, J. (2020). Infección por SARS - CoV -2 y enfermedad COVID19: revisión literaria. 36(1), 196–230. DOI: 10.14482/sun.36.1.616.21
- Abdullah, A. S. M., Tomlinson, B., Cockram, C. S., & Thomas, G. N. (2003). Lessons from the severe acute respiratory syndrome outbreak in Hong Kong. *Emerg. Infect. Dis.*, 9(9), 1042–1045. [DOI:10.3201/eid0909.030366](https://doi.org/10.3201/eid0909.030366)
- Ahmed, S. F., Quadeer, A. A., & McKay, M. R. (2020). Preliminary identification of potential vaccine targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies. *Viruses*, 12(3). [DOI:10.3390/v12030254](https://doi.org/10.3390/v12030254)
- Alcamí, A., Del Val, M., Hernán, M., Latassa, P., Jimenez, J. L., Querol, X., Robustillo, A., Sánchez, G., & Valencia, A. (2020). *Informe científico sobre vías de transmisión SARS-CoV-2*. Recuperado de: https://digital.csic.es/bitstream/10261/222555/1/Informe_Aerosoles_COVID_MCiencialnov.pdf
- Alqaissi, A., Alfaleh, M. A., Hala, S., Abujamel, T. S., Alamri, S. S., Almahboub, S. A., Alluhaybi, K. A., Hobani, H. I., Alsulaiman, R. M., AlHarbi, R. H., ElAssouli, M. Z. ak., Alhabbab, R. Y., AlSaieedi, A. A., Abdulaal, W. H., Al-Somali, A. A., Alofi, F. S., Khogeer, A. A., Alkayyal, A. A., Mahmoud, A. B., ... Hashem, A. M. (2020). SARS-CoV-2 S1 and N-based serological assays reveal rapid seroconversion and induction of specific antibody response in COVID-19 patients. *Sci. Rep.*, 10(1). [DOI:10.1038/s41598-020-73491-5](https://doi.org/10.1038/s41598-020-73491-5)
- Alvarado Amador, I., Bandera Anzaldo, J., Carreto Binaghi, L. E., Pavón Romero, G. F., & Alejandre García, A. (2020). Etiología y fisiopatología del SARS-CoV-2. *Rev. latinoam. infectol. pediatr.*, 33(s1), 5–9. DOI: 10.35366/96667
- AVMA. (2020). SARS-CoV-2 en animales. AVMA. Recuperado de: <https://www.avma.org/resources-tools/one-health/covid-19/sars-cov-2-animals-includingpets>.
- Barua, S., Hoque, M., Adekanmbi, F., Kelly, P., Jenkins-Moore, M., Torchetti, M. K., Chenoweth, K., Wood, T., & Wang, C. (2021). Antibodies to SARS-CoV-2 in dogs and cats, USA. *Emerg. microbios e infectar.*, 10(1), 1669–1674. DOI: 10.1080/22221751.2021.1967101
- Bosco-Lauth, A. M., Hartwig, A. E., Porter, S. M., Gordy, P. W., Nehring, M., Byas, A. D., VandeWoude, S., Ragan, I. K., Maison, R. M., & Bowen, R. A. (2020). Experimental infection of domestic dogs and cats with SARS-CoV-2: Pathogenesis, transmission, and response to reexposure in cats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 117(42), 26382–26388. [DOI:10.1073/pnas.2013102117](https://doi.org/10.1073/pnas.2013102117)
- Cabrera A, González-Álvarez D, Gutiérrez LA, Díaz FJ, Forero D, Rodas JD. Infección natural por SARS-CoV-2 en gatos y perros domésticos de personas con diagnóstico de COVID-

19 en el Valle de Aburrá, Antioquia. Biomédica. 2022;42(Supl.2):48-58. DOI: [DOI:10.7705/biomedica.6407](https://doi.org/10.7705/biomedica.6407)

Callejas de Valero, D., Obando, L. M., & Reyes Mena, S. (2021). El alcance del diagnóstico en la infección por SARS-COV-2. Investigación Y Desarrollo, 13(1), 103–106. [DOI:10.31243/id.v13.2020.1009](https://doi.org/10.31243/id.v13.2020.1009)

Chauca, R. (2021). Covid-19 in Ecuador: Political fragility and vulnerability of public health. Hist Cienc Saude Manguinhos .28(2), 587–591. DOI: 10.1590/S0104-59702021005000003

Chia, P. Y., Coleman, K. K., Tan, Y. K., Ong, S. W. X., Gum, M., Lau, S. K., Lim, X. F., Lim, A. S., Sutjipto, S., Lee, P. H., Son, T. T., Young, B. E., Milton, D. K., Gray, G. C., Schuster, S., Barkham, T., De, P. P., Vasoo, S., Chan, M., ... Moses, D. (2020). Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nat. Commun.*, 11(1). [DOI:10.1038/s41467-020-16670-2](https://doi.org/10.1038/s41467-020-16670-2)

Chiliqinga, R., Campos, N., & Castillo, E. (2022). Detección de anticuerpos del SARS-CoV-2 en perros en contacto con humanos positivos COVID-19 Detection of SARS-CoV-2 antibodies in dogs in contact with COVID-19 positive humans. *Revista Científica FCV-LUZ*, XXXII, 1–5. [DOI:10.52973/rccv-e32178](https://doi.org/10.52973/rccv-e32178)

Cho, S., Kang, J., Ha, Y., Park, G., Lee, J., Ko, J., Lee, J., Kim, J., Kang, C., Jo, I., Ryu, J., Choi, J., Kim, S., Huh, H., Ki, C., Kang, E., Peck, K., Dhong, H., Song, J., ... Kim, Y. (2016). MERS-CoV outbreak following a single patient exposure in an emergency room in South Korea: an epidemiological outbreak study. *Pub Med*, 388(10048), 994–1001. DOI:10.1016/S0140-6736(16)30623-7

Colitti, B., Bonfante, F., Grazioli, S., Anfossi, L., Nogarol, C., Scalas, D., Bertolotti, L., Bortolami, A., Pagliari, M., Pezzoni, G., Moreno, A., Lelli, D., Gennero, M. S., Dondo, A., Brocchi, E., & Rosati, S. (2022). Detailed epitope mapping of SARS-CoV-2 nucleoprotein reveals specific immunoresponse in cats and dogs housed with COVID-19 patients. *Res. Vet. Sci.*, 143(July 2021), 81–87. [DOI: 10.1016/j.rvsc.2021.12.020](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.12.020)

CoronavirusEcuador.com. (2022). Portal con información oficial sobre la pandemia que afecta a Ecuador. Recuperado de: <https://www.coronavirusecuador.com/datos-provinciales/>

Cortés, M. (2020). Conociendo al coronavirus SARS-CoV-2, protagonista de una pandemia. ABCL. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/journal/535/53564518008/html/>

Cortés, M. E. (2021). The COVID-19 pandemic: The importance of being alert to zoonoses. *Rev. Fac. Med. Hum.*, 21(1), 136–141. [DOI:10.25176/rfmh.v21i1.3451](https://doi.org/10.25176/rfmh.v21i1.3451)

Coronel-Carvajal, C. (2020). Forma correcta de presentar los datos y uso de McNemar en las intervenciones educativas. Archivo Médico Camagüey, 24(1). Recuperado de <https://revistaamc.sld.cu/index.php/amc/article/view/6819/3478>

Dabanch P, Jeanette. (2003). zoonosis. Revista chilena de infectología, 20 (Supl. 1), 47-51. [DOI:10.4067/S0716-10182003020100008](https://doi.org/10.4067/S0716-10182003020100008)

Davelois, K., Escalante, H., & Jara, C. (2016). Rendimiento diagnóstico del Western Blot para detectar simultáneamente anticuerpos en pacientes con Cisticercosis, Hidatidosis y Fascioliasis humana. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.*, 33(4), 616–624. [DOI:10.17843/rpmesp.2016.334.2543](https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.334.2543)

De Morais, H. A., dos Santos, A. P., do Nascimento, N. C., Kmetiuk, L. B., Barbosa, D. S., Brandão, P. E., Guimarães, A. M. S., Pettan-Brewer, C., & Biondo, A. W. (2020). Natural Infection by SARS-CoV-2 in Companion Animals: A Review of Case Reports and Current Evidence of Their Role in the Epidemiology of COVID-19. *Front. Vet. Sci.*, 7, 1–10. DOI: 10.3389/fvets.2020.591216

Dhama K, Khan S, Tiwari R, Sircar S, Bhat S, Malik YS, Singh KP, Chaicumpa W, Bonilla-Aldana DK, Rodriguez-Morales AJ. Coronavirus Disease 2019-COVID-19. *Clin Microbiol Rev.* 2020 Jun 24;33(4):e00028-20. DOI:10.1128/CMR.00028-20. PMID: 32580969; PMCID: PMC7405836.

Erdman, S. L. (2020). Buddy, first dog to test positive for COVID-19 in the U.S., has died. CNN. Recuperado de: <https://www.nationalgeographic.com/animals/article/first-dog-to-test-positive-for-covid-in-us-dies>

Guo, Y.-R., Cao, Q.-D., Hong, Z.-S., Tan, Y.-Y., Chen, S.-D., Jin, H.-J., Tan, K.-S., Wang, D.-Y., & Yan, Y. (2020). The origin, transmission and clinical therapies on Coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Mil Med Res.*, 7(11). DOI:10.1186/s40779-020-00240-0

Guo, L., Ren, L., Yang, S., Xiao, M., Chang, D., Yang, F., Dela Cruz, C. S., Wang, Y., Wu, C., Xiao, Y., Zhang, L., Han, L., Dang, S., Xu, Y., Yang, Q. W., Xu, S. Y., Zhu, H. D., Xu, Y. C., Jin, Q., ... Wang, J. (2020). Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *IDSA*, 71(15), 778–785. [DOI:10.1093/cid/ciaa310](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa310)

Hachim, A., Kavian, N., Cohen, C. A., Chin, A. W. H., Chu, D. K. W., Mok, C. K. P., Tsang, O. T. Y., Yeung, Y. C., Perera, R. A. P. M., Poon, L. L. M., Peiris, J. S. M., & Valkenburg, S. A. (2020). ORF8 and ORF3b antibodies are accurate serological markers of early and late SARS-CoV-2 infection. *Nat. Immunol.*, 21(October). [DOI:10.1038/s41590-020-0773-z](https://doi.org/10.1038/s41590-020-0773-z)

Hung, L. S. (2003). The SARS epidemic in Hong Kong: what lessons have we learned? *J. R. Soc. Med.*, 96(8), 374–378. [DOI:10.1258/jrsm.96.8.374](https://doi.org/10.1258/jrsm.96.8.374)

ICTV. (2021). Current ICTV Taxonomy Release, Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus. Recuperado de: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202101868

Jevšnik, M., Cerne, D., Petrovec, M., Paller, T., & Toplak, I. (2021). Genetic characterisation and comparison of three human Coronaviruses (HKU1, OC43, 229E) from patients and

Bovine Coronavirus (BCoV) from cattle with respiratory disease in Slovenia. *Viruses*, 13(January), 1–10. [DOI:10.3390/v13040676](https://doi.org/10.3390/v13040676)

Kim, Y. Il, Casel, M. A. B., & Choi, Y. K. (2022). Transmissibility and pathogenicity of SARS-CoV-2 variants in animal models. *J. Microbiol.*, 60(3), 255–267. [DOI:10.1007/s12275-022-2033-z](https://doi.org/10.1007/s12275-022-2033-z)

Leguía, E., Montero, J., & Quino, M. (2019). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). *Rev. med. carriónica*, 1(1), 10–27. Recuperado de: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov))

Ma, T., Tu, Y., Zhang, N. feng, Guo, J. peng, Deng, K. dong, Zhou, Y., Yun, Q., & Diao, Q. yu. (2015). Effects of dietary yeast β-glucan on nutrient digestibility and serum profiles in pre-ruminant Holstein calves. *J Integr Agric.*, 14(4), 749–757. [DOI:10.1016/S2095-3119\(14\)60843-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60843-1)

Machhi, J., Herskovitz, J., Senan, A. M., Dutta, D., Nath, B., Oleynikov, M. D., Blomberg, W. R., Meigs, D. D., Hasan, M., Patel, M., Kline, P., Chang, R. C. C., Chang, L., Gendelman, H. E., & Kevadiya, B. D. (2020). The natural history, pathobiology, and clinical manifestations of SARS-CoV-2 infections. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 15(3), 359–386. [DOI:10.1007/s11481-020-09944-5](https://doi.org/10.1007/s11481-020-09944-5)

Mackay, I. M., & Arden, K. E. (2015). MERS coronavirus: Diagnostics, epidemiology and transmission. *Virol. J.*, 12(1), 1–21. [DOI:10.1186/s12985-015-0439-5](https://doi.org/10.1186/s12985-015-0439-5)

Madrigal-Rojas JP, Quesada-Loría M, García-Sánchez M, et al . SARS CoV-2, manifestaciones clínicas y consideración en el abordaje diagnóstico de COVID-19. Rev Med Cos Cen. 2020;86 (629):13-21.

Manta, B., Sarkisian, A., García-fontana, B., & Pereira-Prado, V. (2022). Pathophysiology of COVID-19. Odontoestomatología, 24, 0–2. DOI:10.22592/ode2022n39e312

Mathavarajah, S., Stoddart, A. K., Gagnon, G. A., & Dellaire, G. (2021). Pandemic danger to the deep: The risk of marine mammals contracting SARS-CoV-2 from wastewater. *Sci. Total Environ.*, 760, 143346. [DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.143346](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143346)

Meekins, D. A., Gaudreault, N. N., & Ritch, J. A. (2021). Natural and experimental SARS-CoV-2 infection in domestic and wild animals. *Viruses*, 13(11), 1–44. DOI: 10.3390/v13101993

Miranda-Ulloa, E., Sandoval-Ahumada, R., Ayala, E., & Vásquez-Ampuero, J. (2014). Evaluación de las pruebas dot Blot y aglutinación de látex para el diagnóstico de Cisticercosis en Perú. 31(2), 297–301. [DOI:10.3390/v13101993](https://doi.org/10.3390/v13101993).

Morawska L. (2006). Droplet fate in indoor environments, or can we prevent the spread of infection?. *Indoor air*, 16(5), 335–347. DOI:10.1111/j.1600-0668.2006.00432.x

- Morgan, M. (2017). What are the differences between ELISA assay types? Science Center. Recuperado de: <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/april/what-are-the-differences-between-elisa-assay-types/>
- Mu, J., Xu, J., Zhang, L., Shu, T., Wu, D., Huang, M., Ren, Y., Li, X., Geng, Q., Xu, Y., Qiu, Y., & Zhou, X. (2020). SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells. *Sci China Life Sci.*, 63(9), 1413–1416. DOI:10.1007/s11427-020-1692-1.
- OMS. (2020). Transmisión del SARS-CoV-2: repercusiones sobre las precauciones en materia de prevención de infecciones. Reseña Científica, 11, 1–11. Recuperado de: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/333390/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief-Transmission_modes-2020.3-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- OMS. (2022). Tablero de la OMS sobre el Coronavirus (COVID-19). Recuperado de: <https://covid19.who.int/>
- OIE. (2022). INFECCIÓN POR SARS-COV-2 EN ANIMALES. 2, 1–5. Recuperado de: <https://www.oie.int/app/uploads/2022/02/en-factsheet-sars-cov-2.pdf>
- OIE. (2022). Cruzar la barrera entre especies: COVID-19, un ejemplo de zoonosis inversa. Recuperado de: <https://www.woah.org/es/cruzar-la-barrera-entre-especies-covid-19-un-ejemplo-de-zoonosis-inversa/#:~:text=El%20de%20la%20zoonosis%20inversa,%20un%20humano%20a%20un%20animal>
- OMS. (2020a). Enfermedad por coronavirus (COVID-19) Actualización epidemiológica semanal y Actualización operativa semanal. Recuperado de: <https://www.paho.org/es/documentos/actualizacion-epidemiologica-enfermedad-por-coronavirus-covid-19-2-diciembre-2021>
- OMS. (2020b). Declaración de la OMS sobre el nuevo coronavirus detectado en Tailandia. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news/item/13-01-2020-who-statement-on-novel-coronavirus-in-thailand>
- Onoda, M., & Martínez, M. (2020). Pruebas diagnósticas de laboratorio de COVID-19. *AEPap*, 65(2), 229–233. DOI:10.31857/s0023476120020216
- Palacios Cruz, M., Santos, E., Velázquez Cervantes, M. A., & León Juárez, M. (2021). COVID-19, a worldwide public health emergency. *Rev. Clin. Esp.*, 221(1), 55–61. DOI:10.1016/j.rce.2020.03.001
- Ren, L.-L., Wang, Y.-M., Wu, Z.-Q., Xiang, Z.-C., Guo, L., Xu, T., Jiang, Y.-Z., Xiong, Y., Li, Y.-J., Li, X.-W., Li, H., Fan, G.-H., Gu, X.-Y., Xiao, Y., Gao, H., Xu, J.-Y., Yang, F., & Wang Jian-Wei. (2020). Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *The Chin. Med. J.*, 133(9), 1015–1024.
- Rikhtegaran, Z., Saadat, S., Saleh, E., Ouyang, X., Constantine, N., DeVico, A. L., Harris, A. D., Lewis, G. K., Kottilil, S., & Sajadi, M. M. (2020). Performance of nucleocapsid and

spikebased SARS-CoV-2 serologic assays. *PLoS ONE*, 15(11 November), 1–12. DOI:[10.1371/journal.pone.0237828](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237828)

Saif, L. J. (2010). Bovine respiratory Coronavirus. *Vet Clin Anim*, 26(2), 349–364. DOI:[10.1016/j.cvfa.2010.04.005](https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.005)

Sailleau, C., Dumarest, M., Vanhomwegen, J., Delaplace, M., Caro, V., Kwasiborski, A., Hourdel, V., Chevaillier, P., Barbarino, A., Comtet, L., Pourquier, P., Klonjkowski, B., Manuguerra, J. C., Zientara, S., & Le Poder, S. (2020). First detection and genome sequencing of SARS-CoV-2 in an infected cat in France. *Transbound Emerg Dis*, 67(6), 2324–2328. DOI: 10.1111/tbed.13659

Schoch, C. L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database: the journal of biological databases and curation*, 2020, baaa062. DOI: 10.1093/database/baaa062

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

Sigler, A. (2021). Vías de transmisión del SARS-CoV-2 SARS-CoV-2. *An. Acad. Cienc. Cuba.*, 11(2), e958. Recuperado de: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/958>

Sooksawasdi Na Ayudhya, S., & Kuiken, T. (2021). Reverse zoonosis of COVID-19: Lessons From the 2009 influenza pandemic. *Vet. Pathol.*, 58(2), 234–242. DOI:[10.1177/0300985820979843](https://doi.org/10.1177/0300985820979843)

Sterling, T., Richardson, A., & Heinrich, M. (2020). Dutch house pets test positive for coronavirus. *REUTERS*. Recuperado de: <https://www.reuters.com/article/us-health-coronavirus-netherlands-pets-idUSKBN22R2EN>

Tastanova, A., Stoffel, C. I., Dzung, A., Cheng, P. F., Bellini, E., Johansen, P., Duda, A., Nobbe, S., Lienhard, R., Bosshard, P. P., & Levesque, M. P. (2021). A Comparative Study of Real-Time RT-PCR-Based SARS-CoV-2 Detection methods and its application to human-derived and surface swabbed material. *J. Mol. Diagn.*, 23(7), 796–804. DOI:[10.1016/j.jimoldx.2021.04.009](https://doi.org/10.1016/j.jimoldx.2021.04.009)

Toche, P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Rev. Méd. Clín. Las Condes*, 23(4), 446–457. DOI:[10.1016/s0716-8640\(12\)70335-8](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(12)70335-8)

Vicente, T., Ramírez, V., & Rueda, J. (2020). Criterios de vulnerabilidad frente a infección Covid-19 en trabajadores. *Rev Asoc Esp Espec Med Trab*, 29.

Villegas, G., León, D., & Falcón, N. (2021). Riesgo de infección de mascotas con COVID-19 desde la perspectiva de sus propietarios en Lima, Perú. *Rev. de Investig. Vet. del Peru*, 32(5), e21349. [DOI:10.15381/rivep.v32i5.21349](https://doi.org/10.15381/rivep.v32i5.21349)

Wan Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S., & Li, F. (2020). Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *Virol. J.*, 94. DOI: 10.1128/jvi.00127-20

Yoo, H. S., & Yoo, D. (2020). COVID-19 and veterinarians for one health, zoonotic- and reverse-zoonotic transmissions. *J. Vet. Sci.*, 21(3), e51. DOI: 10.4142/jvs.2020.21.e51

Zambrano Mila, M. S., Freire Paspuel, B., Solon, Alberto O., & Garcia Bereguain, M. A. (2022). SARS-CoV-2 infection in free roaming dogs from the Amazonian jungle. *One Health*. DOI:10.1016/j.onehlt.2022.100387

Zeng, W., Liu, G., Ma, H., Zhao, D., Yang, Y., Liu, M., Mohammed, A., Zhao, C., Yang, Y., Xie, J., Ding, C., Ma, X., Weng, J., Gao, Y., He, H., & Jin, T. (2020). Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 527(3), 618–623. [DOI:10.1016/j.bbrc.2020.04.136](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.136)

Anexos

Anexo 1: Fotografías de la realización del proyecto de titulación



Fotografía 1: Toma de muestra en un perro French Poodle.
Fuente: Autoras



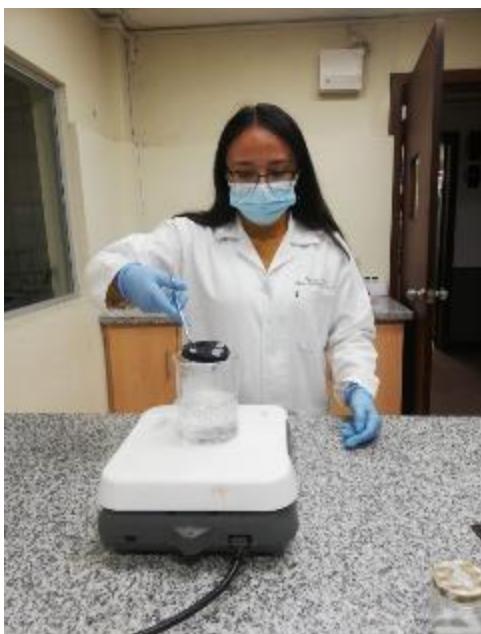
Fotografía 2: Toma de muestra en un perro Golden retriever.
Fuente: Autoras



Fotografía 3: Pesaje de los solutos para el

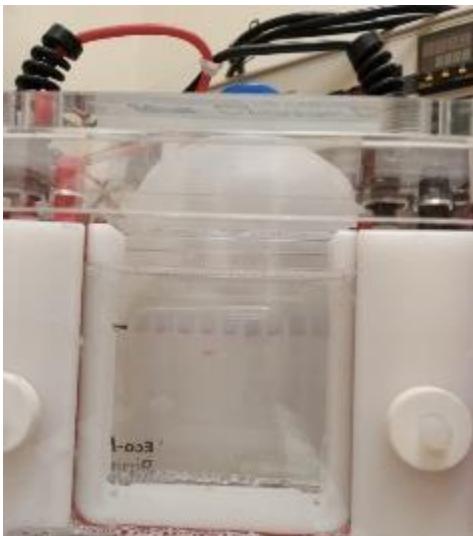
medio cultivo.

Fuente: Autoras



Fotografía 4: Incremento de temperatura de las bacterias para el medio de cultivo.

Fuente: Autoras



Fotografía 5: Cámara de electrotransferencia

para SDS-PAGE

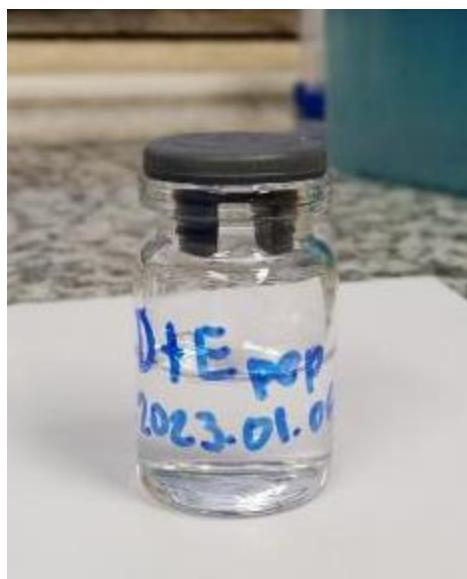
Fuente: Autoras



Fotografía 6: Muestras de suero sanguíneo

de perros

Fuente: Autoras



Fotografía 7: Péptido recombinante D+E

($L^{230}-A^{419}$) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2.

Fuente: Autoras



Fotografía 8: Tinción del péptido D+E (L^{230} - A^{419}) transferido a la membrana de PVDF con Azul de Coomassie.

Fuente: Autoras



Fotografía 9: Corte y enumeración de la membrana en tiras para su posterior uso.

Fuente: Autoras

Anexo 2: Encuesta dirigida a los propietarios de las mascotas para identificar infección de SARS-CoV-2.

Fotografía 10: Encuesta realizada a tutores de los perros (*Canis lupus familiaris*). Solo 10 propietarios brindaron sus datos.

Fuente: Autoras

ENCUESTA SARS-CoV-2 EN ANIMALES DE COMPAÑÍA

CON RESPECTO AL COVID-19

1. Despues de iniciada la pandemia del COVID-19, ¿cree usted haber contraido la enfermedad en alguna ocasión?
 - a. Sí.
 - b. No.
1. En el caso de responder afirmativamente, ¿cuántas veces tuvo la infección en el transcurso de la pandemia?
 - a. Una sola vez.
 - b. De dos a tres veces.
 - c. Más de 3 veces.
2. ¿Alguna vez se realizó la prueba de COVID-19 en las ocasiones que contrajo la enfermedad?
 - a. Sí.
 - b. No.
3. En caso afirmativo, ¿qué pruebas se realizó para confirmar la enfermedad?
 - a. Test rápido.
 - b. Test de antígenos
 - c. PCR-TR
 - d. Otra: especificar cual:
4. ¿Cómo fue el cuadro que presentó de la enfermedad?
 - a. Asintomática.
 - b. Síntomas leves: cansancio, tos seca, fiebre, pérdida de olfato y gusto.
 - c. Síntomas graves: Dificultad para respirar, dolor de pecho, neumonía.

CON RESPECTO A LAS MASCOTAS (PERROS) DEL HOGAR:

5. ¿Cuántos perros tiene en su hogar?
 - a. Uno.
 - b. De dos a cuatro.
 - c. Más de 4.
6. ¿La/las mascota/as en qué espacio conviven la mayoría del tiempo?
 - a. Fuera de la casa.
 - b. En el patio.
 - c. Dentro de la casa.
7. Si su mascota/as conviven dentro del hogar, ¿dónde suele descansar o habitar la mayoría del tiempo?
 - a. Tiene su propia cama.
 - b. En algún mueble/sillón.
 - c. En la cama.
8. Durante la pandemia tomaron alguna precaución con las mascotas:
 - a. Sí. Especificar:
 - b. No.
9. En el transcurso de la pandemia, ¿alguna vez su/sus mascota/as presentaron síntomas respiratorios o gastrointestinales de cualquier tipo?
 - a. Sí. Especificar:
 - b. No.

Fotografía 11: Resultados de la encuesta realizada a los propietarios de los perros.

Fuente: Autoras

1. Después de iniciada la pandemia del COVID-19, ¿cree usted haber contraído la enfermedad en alguna ocasión?

Si	No
6	4

2. En el caso de responder afirmativamente, ¿cuántas veces tuvo la infección en el transcurso de la pandemia?

Una sola vez	De dos a tres veces	Más de 3 veces
6	0	0

3. ¿Alguna vez se realizó la prueba de COVID-19 en las ocasiones que contrajo la enfermedad?

Si	No
6	0

4. En caso afirmativo, ¿qué pruebas se realizó para confirmar la enfermedad?

Test rápido	Test de antígenos	PCR-TR	Otra: especificar cual
0	5	1	0

5. ¿Cómo fue el cuadro que presentó de la enfermedad?

Asintomática	Síntomas leves: cansancio, tos seca, fiebre, pérdida de olfato y gusto.	Síntomas graves: Dificultad para respirar, dolor de pecho, neumonía.
2	3	1

CON RESPECTO A LAS MASCOTAS (PERROS) DEL HOGAR

1. ¿Cuántos perros tiene en su hogar?

Uno	De dos a cuatro	Más de 4
1	8	1

2. ¿La/las mascota/as en qué espacio conviven la mayoría del tiempo?

Fuera de la casa	En el patio	Dentro de la casa
0	4	6

3. Si su mascota/as conviven dentro del hogar, ¿dónde suele descansar o habitar la mayoría del tiempo?

Tiene su propia cama	En algún mueble/sillón.	En la cama
5	2	0

4. Durante la pandemia tomaron alguna precaución con las mascotas:

Sí. Especificar:	No
Higiene de sus patas	4
6	

5. En el transcurso de la pandemia, ¿alguna vez su/sus mascota/as presentaron síntomas respiratorios o gastrointestinales de cualquier tipo?

Sí. Especificar	No
Tos	8
2	