

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 felinos domésticos (*Felis catus*) potencialmente expuestos a COVID-19

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

Autor:

Maryuri Alexandra Romero Vera

Director:

Omar Santiago Andrade Guzmán

ORCID:  0000-0003-0045-7513

Cuenca, Ecuador

2024-06-14

Resumen

Este estudio valoró el uso del péptido recombinante D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 para la detección de anticuerpos en felinos domésticos (*Felis catus*) potencialmente expuestos a COVID-19. Para este fin se utilizaron 30 muestras de suero sanguíneo recolectadas antes de la pandemia y 30 muestras recolectadas después de la pandemia de gatos domésticos que ya habían sido identificados como potencialmente expuestos a COVID-19. Las muestras se analizaron mediante dos pruebas serológicas, ELISA indirecto y Western Blot, evidenciándose la presencia de anticuerpos contra el péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 tanto en las muestras pre-pandemia (ELISA indirecto 27 positivos/Western Blot 7 positivos) como en las post-pandemia (ELISA indirecto 16 positivos/Western Blot 7 positivos), sin embargo, se observó diferencias significativas entre los dos métodos utilizados. Los resultados sugieren una posible reacción cruzada del SARS-CoV-2 con los FCoV endémicos del lugar debido a que la nucleoproteína de estos virus comparte epítomos antigénicos comunes, ya que los gatos muestreados procedían de zonas rurales y de mínimos cuidados sanitarios. Se recomienda el uso de otros antígenos más específicos para la valoración de la presencia de anticuerpos en contra del Sars-CoV-2 ya que se demostró la nula eficacia de este péptido recombinante para la detección de anticuerpos del virus.

Palabras Clave del autor: felinos domésticos, Western Blot, ELISA indirecto, nucleoproteína, anticuerpos



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

This study evaluated the use of the recombinant peptide D+E (L230-A419) of the nucleoprotein of the SARS-CoV-2 Virus for the detection of antibodies in domestic felines (*Felis catus*) potentially exposed to COVID-19. For this purpose, 30 blood serum samples collected before the pandemic and 30 samples collected after the pandemic from domestic cats that had already been identified as potentially exposed to COVID-19 were used. The samples were analyzed using two serological tests, indirect ELISA and Western Blot, showing the presence of antibodies against the D+E peptide (L230-A419) of the SARS-CoV-2 Virus Nucleoprotein in both the pre-pandemic samples (ELISA indirect 27 positive/Western Blot 7 positive) as in the post-pandemic (indirect ELISA 16 positive/Western Blot 7 positive), however, significant differences were observed between the two methods used. The results suggest a possible cross-reaction of SARS-CoV-2 with the FCoV endemic to the area because the nucleoprotein of these viruses shares common antigenic epitopes, since the cats sampled came from rural areas and with minimal health care. The use of other more specific antigens is recommended for the assessment of the presence of antibodies against Sars-CoV-2 since the null efficacy of this recombinant peptide for the detection of antibodies to the virus was demonstrated.

Author Keywords: domestic felines, Western Blot, indirect ELISA, nucleoprotein antibodies



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Resumen.....	2
Abstract.....	3
Índice de contenido.....	4
Índice de figuras.....	6
Índice de tablas.....	7
Dedicatoria.....	8
Agradecimientos.....	9
Abreviaturas.....	10
Introducción.....	12
1.1. Objetivos	
1.1.1. Objetivo General.....	14
1.1.2. Objetivos Específicos.....	14
1.2. Pregunta de la investigación	
Revisión de la literatura.....	15
2.1. Historia.....	15
2.1.1. Aislamiento de los Coronavirus en 1930.....	15
2.1.2. Primeros Coronavirus en Humanos, Década de 1960.....	15
2.1.3. Aparición del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS) en 2002.....	15
2.1.4. Brote de 2012 en Oriente Medio.....	15
2.1.5. Aparición del COVID-19 (coronavirus de 2019).....	15
2.1.6. COVID-19 en Ecuador.....	16
2.1.7. COVID-19 en la Actualidad.....	16
2.2. Etiología.....	17
2.2.1. Taxonomía.....	17
2.2.2. Morfología del Virión SARSCoV-2.....	17
2.2.3. Nucleoproteína N.....	18
2.3. Transmisión.....	19
2.3.1. Horizontal Directa.....	19
2.3.2. Horizontal Indirecta.....	19
2.3.3. Fecal-Oral.....	19
2.3.4. Otras Vías de Transmisión.....	20
2.4. Patogenia.....	20
2.5. Animales y SARS-CoV-2.....	22
2.6. SARS-CoV-2 en Perros y Gatos.....	23
2.7. Diagnóstico en Animales.....	25
2.7.1. Diagnóstico Clínico.....	25
2.7.2. Diagnóstico Diferencial.....	25
2.7.3. Diagnóstico de Laboratorio.....	25
2.7.4. ELISA Indirecto.....	26
2.7.5. Western Blot.....	27
2.8. Tratamiento SARS-CoV-2 en Animales.....	27

2.9. Prevención y Control.....	27
Materiales y métodos.....	29
3.1. Área de Estudio.....	29
3.2. Población en Estudio.....	29
3.3. Primera fase: Colección y Transporte de Muestras Sanguíneas Para la Obtención de Sueros Post-pandemia.....	29
3.3.1. Materiales de trabajo.....	29
3.3.2. Materiales Biológicos.....	30
3.3.3. Materiales Químicos.....	30
3.3.4. Pasos.....	30
3.4. Segunda fase: Obtención de Suero Sanguíneo de las Muestras de Sangre.....	30
3.4.1. Materiales Físicos y Equipos.....	30
3.4.2. Materiales Biológicos.....	30
3.4.3. Materiales Químicos.....	31
3.4.4. Pasos.....	31
3.5. Tercera Fase: Ensayo de ELISA Indirecto.....	31
3.5.1 Materiales Físicos y Equipos.....	31
3.5.2. Materiales Biológicos.....	31
3.5.3. Materiales Químicos.....	32
3.5.4. Pasos Para Ensayo ELISA.....	32
3.6. Cuarta Fase: Ensayo de Western Blot.....	33
3.6.1. Materiales Físicos y Equipos.....	33
3.6.2. Materiales biológicos.....	33
3.6.3. Materiales químicos.....	33
3.6.4. Pasos.....	35
3.7. Análisis estadístico.....	39
Resultados.....	40
4.1. ELISA Indirecto.....	40
4.2. Western Blot.....	41
4.3 Prueba estadística: Prueba de McNemar.....	42
Discusión.....	44
Conclusiones.....	47
Recomendaciones.....	48
Referencias.....	49
Anexos.....	59

Índice de figuras

Figura 1: Representación del SARS-CoV-2.....	18
Figura 2: Posible origen, transmisión e infección del SARS-CoV-2.....	20
Figura 3: Replicación de SARS-CoV-2.....	22
Figura 4: Resultados del ensayo ELISA Indirecto.....	40
Figura 5: Resultados del ensayo Western Blot.....	41

Índice de tablas

Tabla 1: Reactivos resolución del péptido D+E (L ²³⁰ -A ⁴¹⁹) recombinante	35
Tabla 2: Reactivos para la preparación del gel concentrador	36
Tabla 3: Resultados de la prueba estadística de McNemar para la comparación entre Elisa indirecto y Western Blot aplicados a las muestras serológicas en gatos domésticos tomadas antes de la pandemia.....	42
Tabla 4: Resultados de la prueba estadística de McNemar para la comparación entre Elisa indirecto y Western Blot aplicados a las muestras serológicas en gatos domésticos tomadas después de la pandemia.	43

Dedicatoria

Trabajo de titulación dedicado especialmente a mis padres Magdalena y Clever, por todo el apoyo que me brindaron no solo en mi carrera si no a la largo de la vida, gracias por creer en mis capacidades y aportarme todas las herramientas necesarias para crecer como persona y profesionalmente, sobre todo a mi madre quién me apoyó siempre incondicionalmente a pesar de las adversidades y jamás permitió que me faltase nada, la quiero.

A mis hermanos Kenia, Vanesa y Diego, quienes aportaron su granito de arena a lo largo de toda mi vida académica, quienes siempre estuvieron y me ayudaron a cumplir mis metas y jamás dudaron de mis capacidades.

A mi sobrina Danna y Dániel, los cuales son el amor más puro que pude conocer y me llenaron de momentos de ternura y alegría.

A mi esposo Luis, quien me acompañó y supo guiarme a lo largo de los años, gracias por todos los buenos momentos y consejos que me ayudaron a salir adelante.

Finalmente, dedico mi tesis a mi querido hijo Mikel, quien no solo me cambió la vida, sino también me motiva a seguir superándome cada minuto de mi vida, gracias por existir y gracias por elegirme como mamá, te amo.

Agradecimientos

Principalmente, agradezco a toda mi familia por todo el apoyo incondicional que supieron darme durante toda la vida personal y académica.

A la Universidad de Cuenca por haberme dado la oportunidad de crecer y superarme a nivel profesional, además de permitirme estudiar y valorar cada una de mis capacidades académicas.

A los profesores de la Universidad de Cuenca, quienes supieron guiarme y motivarme a convertirme en una excelente profesional además de brindar sus conocimientos y crear espacios agradables de aprendizaje.

Al Dr. Antonio Vallecillo por guiar y brindar su ayuda y experticia que facilitaron la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Omar Andrade, asesor del trabajo de titulación, por compartir sus conocimientos, acompañarme, dirigir y motivarme durante todo el trabajo de titulación.

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ACE-2	enzima convertidora de angiotensina-2
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNsg	ácido ribonucleico subgenómico
ARNss+	ARN monocatenario con polaridad positiva
BSA	albúmina sérica bovina
CCoV	alfacoronavirus entérico
CDK	complejo ciclina
CoV	coronavirus
COVID-19	coronavirus de 2019
DO's	densidades ópticas
ELISA	ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
F.CC. AA	Facultad de Ciencias Agropecuarias
FCoV	coronavirus felino
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogeno
HCoV 229E	coronavirus humano 229E
HCoV-HKU1	coronavirus humano HKU1
HCoV-NL63	coronavirus humano NL63
HCoV-OC43	coronavirus humano OC43
HE	hemaglutinina-esterasa
HRP	horseradish peroxidase, peroxidasa de rábano
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
kb	kilobases
KCl	cloruro de potasio
KH ₂ PO ₄	fosfato monopotásico
LAMP-RT	amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa
MERS-CoV	síndrome respiratorio de Oriente Medio por coronavirus
N	Nucleoproteína
Na ₂ CO ₃	carbonato de sodio
NaCl	cloruro de sodio
NaH ₂ PO ₄	fosfato monosódico
nsp	proteínas no estructurales
NS	neutralización sérica
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	open reading frame- Marco abierto de lectura
Pp1a, pp1ab	poliproteínas 1a, 1ab
PBS	solución buferada de fosfatos
PCR-TR	reacción en cadena de polimerasa con transcripción inversa
pH	potencial de hidrógeno
RBD	dominio de unión al receptor
RBD-S	dominio de unión al receptor espiga
RTC	complejo replicasa-transcriptasa
SARS	síndrome respiratorio agudo severo
SARS-CoV	síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus
SARS-CoV-2	síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus tipo 2
SDRA	síndrome de Distrés Respiratorio Agudo
SDS	sodium dodecyl sulfate- dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGET	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TEMED	tetrametiletilendiamina
TGI	tracto gastrointestinal
TMPRRS2	serina proteasa celular de transmembrana 2
VNT	neutralización viral
WAHIS	Sistema Mundial de Información Zoonositaria
WHO	Organización Mundial de la Salud
WOAH	Organización Mundial de la Sanidad Animal
°C	grados centígrados
g	gramo
mg	miligramo
min	minuto
h	hora
ml	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
ng	nanogramo
nm	nanómetro
v/v	volumen a volumen
xg	gravedad
µg	microgramo
µl	microlitro

Introducción

El Síndrome Respiratorio Agudo Severo por Coronavirus tipo 2 conocido como SARS-CoV-2, actuó como responsable de una neumonía inusual en humanos que tuvo su origen en Wuhan, China, en diciembre del año 2019, la misma que se propagó bastante rápido no solo a nivel nacional, sino que traspasó las barreras fronterizas (Jian *et al.*, 2020) y llegó a declararse pandemia el 11 de marzo del 2020 por la Organización Mundial de la Salud (OMS). El SARS-CoV-2 es un betacoronavirus que está estrechamente relacionado con el Síndrome Respiratorio Agudo (SARS-CoV), el mismo que fue responsable de la epidemia del 2002-2003 en China y el Síndrome Respiratorio de Medio Oriente (MERS-CoV) que se reportó en el 2012 en Arabia Saudita, ambos altamente patógenos y cuyo origen fueron los murciélagos (Li *et al.*, 2020). Sin embargo, aún se especula sobre la transmisión a humanos, ya que el virus podría haberse transmitido de manera directa o quizás a través de una previa adaptación en algún huésped intermediario (Lorusso *et al.*, 2020).

Existen investigaciones que demuestran que el SARS-CoV-2 utiliza un receptor de entrada celular similar al SARS-CoV, por lo tanto, se cree que tienen el mismo rango de huéspedes (Zhang *et al.*, 2020), esto es importante, ya que desde la aparición del SARS-CoV, se han reportado varias especies que son susceptibles a la infección de este virus, es el ejemplo de los hurones y los gatos, los cuales de manera experimental no solo contraían la enfermedad de manera activa, con excreciones y cambios pulmonares parecidos a los cuadros clínicos en humanos, sino que también eran capaces de transmitir eficientemente el virus a otros animales sanos que convivían en el mismo lugar (Martina *et al.*, 2003).

Los estudios serológicos son métodos adecuados para detectar la presencia de anticuerpos contra el SARS-CoV en animales (Reusken *et al.*, 2013), sin embargo, a diferencia de los humanos, actualmente a nivel nacional no existe un método accesible para detectar anticuerpos en contra del SARS-CoV-2 en animales de compañía, no obstante, en un estudio realizado por Zhang *et al.* (2020), se detectó la presencia de estos anticuerpos en gatos de Wuhan utilizando los ensayos de ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas), VNT (Neutralización viral) y Western Blot, lo cual permitió demostrar que el virus del SARS-CoV-2 infectó a gatos durante el brote inicial, por lo tanto, el riesgo puede ocurrir en cualquier otro lugar del mundo donde se hayan presentado brotes.

El uso de estos ensayos se ha determinado debido a la respuesta de los anticuerpos contra algunos componentes antigénicos del SARS-CoV-2, haciendo énfasis en el dominio de unión al receptor (RBD) de dos proteínas virales; Spike (S) y la nucleoproteína (Np), que son las más inmunogénicas del virus, en particular en la fase temprana de la infección, los mismos se utilizarán como estándares de referencia, puesto que el desarrollo de las pruebas debe ser específico para la especie que se va a evaluar, ya que tanto perros como gatos pueden

tener una posible reacción cruzada a sus propios coronavirus (Colitti *et al.*, 2022). Sin embargo, la técnica de ELISA indirecto, sería empleado para valorar si existen reservorios de SARS-CoV-2 en animales de compañía, y aún más después de establecer las campañas de vacunación masivas en humanos (Dan *et al.*, 2021; Fenwick *et al.*, 2021).

De acuerdo al último informe epidemiológico emitido por la WOAHA el 10 de marzo de 2023, se han notificado más de 676 millones de casos en humanos y de estos, son más de 6,9 millones de personas que han fallecido a causa de la infección por el SARS-CoV-2, además de las infecciones derivadas de animales por un contacto estrecho con ellos. La situación global a día de hoy con respecto a la transmisión deja al humano como el principal medio de propagación de la enfermedad, sin embargo, los casos de infección por este virus en animales siguen aumentando y llegan a más de 775 brotes a nivel internacional, con 36 países y 29 especies afectadas. (WOAHA, 2023)

La falta de investigaciones a nivel del país y la necesidad de evidencia científica que respalde la presencia de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 en animales de compañía, especialmente perros y gatos, que son los que tienen un contacto más estrecho con la población humana, aún cuando ya se ha demostrado la infección en animales de otras regiones, plantea este proyecto que pretende usar un péptido recombinante D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 (Colitti *et al.*, 2022) y demostrar que felinos domésticos potencialmente expuestos al SARS-CoV-2 presentan anticuerpos detectables, a través de los ensayos de ELISA Indirecto y Western Blot, contrastando los resultados con pruebas serológicas de muestras de gatos tomadas antes del inicio de la pandemia y con ello valorar la frecuencia y capacidad trasmisora del virus de humanos hacia felinos domésticos (*Felis silvestris catus*).

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General

Evaluar el uso del péptido recombinante D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la nucleoproteína del virus SARS-CoV-2 para la detección de anticuerpos en felinos domésticos (*Felis catus*) potencialmente expuestos al COVID-19.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Implementar los ensayos de ELISA indirecto y Western Blot con el péptido recombinante D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 para la detección de anticuerpos en felinos domésticos (*Felis catus*).
- Comparar la capacidad de los ensayos de ELISA indirecto y Western Blot para identificar la presencia de anticuerpos anti-péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 en felinos domésticos (*Felis catus*).

1.2. Pregunta de la Investigación

¿El péptido recombinante D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 producido en un modelo de expresión bacteriano es capaz de permitir la detección de anticuerpos en felinos domésticos (*Felis catus*) potencialmente expuestos a la COVID-19?

Revisión de la literatura

2.1. Historia

2.1.1. Aislamiento de los Coronavirus en 1930

Los coronavirus se aislaron por primera vez en 1930 en aves debido a una infección respiratoria aguda en pollos, ahora conocida como bronquitis infecciosa, a su vez se dieron a conocer como los agentes responsables de la gastroenteritis transmisible en porcinos y de enfermedades hepáticas y neurológicas en ratones (Cheever *et al.*, 1949; Masters & Perlman, 2013), (Cortés, 2020).

2.1.2. Primeros Coronavirus en Humanos, Década de 1960

En la década de 1960 se descubrieron los primeros coronavirus humanos; se agruparon por su característica morfológica más notable, una franja de púas proyectadas desde la superficie del virión que daban una forma similar a una corona solar (Almeida *et al.*, 1968). Desde entonces, esta familia de virus fue la responsable de diversas enfermedades de tipo respiratorio y gastrointestinal que cobraron importancia debido a su patogenia y al daño económico que causaron en animales agrícolas y de compañía (Maclachlan & Dubovi, 2010).

2.1.3. Aparición del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS) en 2002

Por otra parte, los únicos coronavirus que se describieron que circulaban estacionalmente y causaban resfriados comunes en los humanos incluían a las cepas HCoV-NL63 (coronavirus humano NL63), HCoV-229E (coronavirus humano 229E), HCoV-OC43 (coronavirus humano OC43) y HCoV-HKU1 (coronavirus humano HKU1) (Stouta *et al.*, 2020), en el 2002 se manifestó la aparición de un nuevo coronavirus en la provincia de Guangdong (China), el SARS-CoV fue el causante de brotes significativos en humanos en China, con 916 muertes y más de 8.098 casos confirmados en 29 países cuyo huésped intermediario fue la civeta de palma enmascarada/mapaches (World Health Organization, 2004).

2.1.4. Brote de 2012 en Oriente Medio

Años más tarde (2012) la OMS reportó 2.254 casos de MERS-CoV en oriente medio, con aproximadamente 800 muertes en 27 países, sin embargo, este virus tuvo como huésped intermediario al dromedario (Bennett *et al.*, 2019).

2.1.5. Aparición del COVID-19 (coronavirus de 2019)

A finales del 2019 se detectó el SARS-CoV-2 en China, un nuevo patógeno zoonótico perteneciente al género de los Betacoronavirus cuya filogenia se aproxima bastante al SARS-

CoV(Tan *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2019). La infección por esta nueva variante cursa en humanos con presentaciones desde asintomáticas y leves, hasta graves con neumonías atípicas e incluso la muerte y su ritmo de propagación es bastante rápido, por lo que esta enfermedad, conocida como COVID-19 se manifestó como Emergencia de Salud Pública de Preocupación Internacional por la OMS, ya en enero del 2020 y en solo dos meses más fue declarada pandemia (WHO, 2020). Se relacionó al SARS-CoV-2 con un probable contacto con animales silvestres que se comerciaban en mercados mayoristas de animales exóticos y mariscos en Huanan, Wuhan, en la provincia de Hubei en China (WHO, 2020).

2.1.6. COVID-19 en Ecuador

Se estima que de manera directa e indirecta la pandemia causó alrededor de 15 millones de muertes en todo el mundo (OIE, 2022). En Ecuador hasta el 5 de marzo del 2024 se contabilizaron 1.066.945 casos confirmados y 36.002 fallecidos en el transcurso de la pandemia (Observatorio Social del Ecuador, 2022). Solo en Azuay los al 12 de septiembre de 2022 se confirmaron con pruebas PCR 50.865 casos de covid-19 (Observatorio Social del Ecuador, 2022).

2.1.7. COVID-19 en la Actualidad

Todos los virus, incluyendo el SARS-CoV-2, cambian con el tiempo. Algunos cambios pueden afectar las propiedades del virus, como la facilidad con la que se propaga y la gravedad de la enfermedad ((World Health Organization - Technical Advisory Group on SARS-CoV-2 Virus Evolution, 2023). Desde la pandemia en 2020 se han clasificado algunas variantes de COVID-19, clasificadas como variantes de interés, alfa, beta, gama, delta, lambda, ómicron; (Link-Gelles *et al.*, 2024). Hasta la fecha, la pandemia de COVID-19 continúa impulsada por la transmisión de persona a persona. Igualmente, se ha detectado el virus en un centenar de animales, como tigres, leones, leopardos, gorilas, nutrias hienas, etc. No hay evidencia científica de que los perros y gatos puedan transmitir el SARS-CoV-2 a sus dueños (Salajegheh Tazerji *et al.*, 2024), (Hernández *et al.*, 2023).

En el último informe epidemiológico emitido por la WOAHA el 10 de marzo de 2023, se notificaron más de 676 millones de casos en humanos y más de 6,9 millones de personas que han fallecido a causa de la infección por el SARS-CoV-2. Las infecciones derivadas de animales por un contacto estrecho con ellos siguen aumentando y llegan a más de 775 brotes a nivel internacional, con 36 países y 29 especies afectadas. La detección de la enfermedad en animales depende en gran medida del nivel de vigilancia de cada país, en consecuencia, es probable que estas cifras estén subestimadas, por ello la WOAHA recomienda a sus

miembros que informen a través de WAHIS (Sistema Mundial de Información Zoonosanitaria) la aparición de cualquier caso en animales (WOAH, 2023).

2.2. Etiología

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) en febrero del 2020 definió como agente causal a un nuevo coronavirus, SARS-CoV-2, del cual derivó en la enfermedad que la OMS denominó COVID-19 (Errecalde et al., 2020).

2.2.1. Taxonomía

Los coronavirus (CoV) pertenecen al orden Nidovirales, familia *Coronaviridae* y subfamilia *Orthocoronavirinae*, esta última se ha dividido en cuatro géneros de acuerdo a las características genéticas y evolutivas: los Alpha, Beta, Gamma y Deltacoronavirus (Masters & Perlman, 2013). Esta familia se caracteriza por tener envoltura y un genoma de ARN (ácido ribonucleico) monocatenario, de sentido positivo que rondan las 26 a 32 kilobases (kb) con un diámetro de 80 a 120 nm (nanómetros), por lo que hasta el momento son los virus con genomas de ARN con mayor longitud descritos (De Moraes et al., 2020).

El SARS-CoV-2 es el séptimo miembro de la familia *Coronaviridae* que causan infecciones respiratorias en humanos, este pertenece al grupo de los betacoronavirus al igual que el SARS-CoV y el MERS-CoV, de la misma manera que el SARS-CoV, el SARS-CoV-2 se une a la enzima convertidora de angiotensina-2 (ACE-2) debido al dominio de unión al receptor que posee en la proteína S (Hoffmann et al., 2020).

2.2.2. Morfología del Virión SARSCoV-2

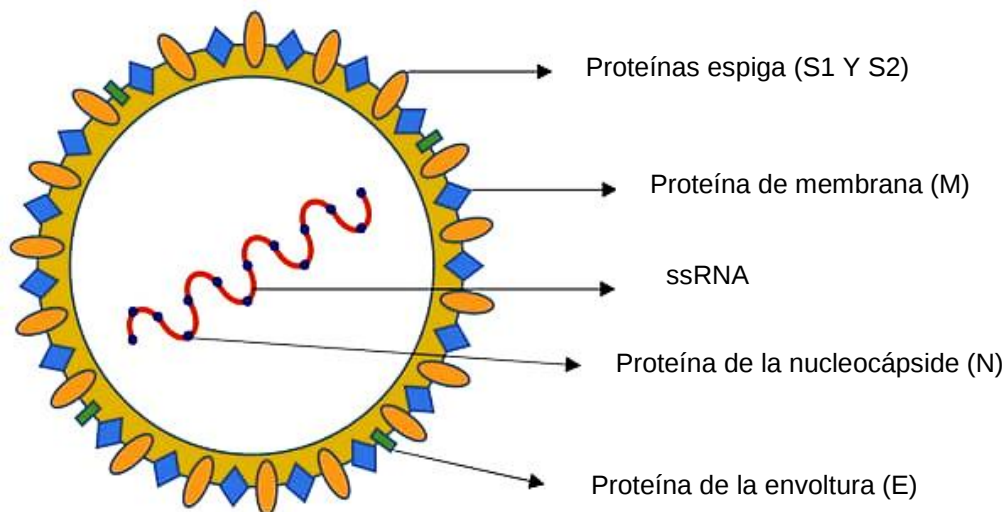
Es similar al resto de coronavirus, tiene una forma esférica un poco pleomórfica, su diámetro varía de 60 a 140 nm, posee picos característicos de unos 8 a 12 nm de longitud, tiene una cola poliadenilada y un capuchón metilado en el extremo 3' y 5', respectivamente, por lo que la estructura del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) es semejante al de las células eucariotas (Pastrian-Soto, 2020), su genoma tiene 29,891 nucleótidos de longitud, codifica casi 10 mil aminoácidos y contiene un 38% de G+C, con 15 ORF (Zhou et al., 2020). A dos tercios cerca del extremo 5' los ORF1a y ORF1b codifican las poliproteínas 1a y 1ab, las mismas que tras su clivaje dan origen a las proteínas no estructurales, mientras que cerca del tercio del extremo 3' se visualizan los ORFs que codifican las proteínas S, E, M y N y los ORFs que codifican las proteínas accesorias (Srinivasan et al., 2020).

Los CoV se han identificado en diferentes especies animales, en los cuales la organización y expresión genómica es semejante, en tanto que se ha descrito de 15 a 16 proteínas no estructurales codificadas por ORF1ab (marco abierto de lectura) en el extremo

5' del genoma y clasificadas de nsp1 a nsp16, excepto en los Gammacoronavirus que no poseen la nsp1; de 4 a 6 proteínas estructurales conocidas como hemaglutinina-esterasa (HE) la misma que solo forma parte de algunos Betacoronavirus, la proteína espiga (S), la cubierta (E), la membrana (M) y la nucleoproteína (N), las cuales se codificaron por ORF en el extremo 3' (Su *et al.*, 2016); y 8 proteínas accesorias denominadas como marcos de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) clasificadas como ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b y ORF14 (Ceraolo & Giorgi, 2020).

Dos proteínas destacan, la proteína S, que forma parte de las proteínas estructurales, se encuentra en la superficie del virión y su función es reconocer y unirse a los receptores específicos de la superficie de la célula huésped, lo que facilita la entrada del patógeno y en consecuencia la infección (Wang *et al.*, 2020) y la proteína N, la cual se asocia al ARN viral, y se cree que le da estabilidad, además se ha demostrado que su función inhibidora del complejo ciclina-CDK impide la progresión de la fase S en el ciclo celular, así mismo también se sobreexpresa en la fase infectiva en tanto que provoca un aumento considerable de anticuerpos por lo que es un antígeno ideal para desarrollar vacunas o pruebas serológicas (Rikhtegaran *et al.*, 2020); cabe recordar que esta última se encuentra dentro del virión, mientras que las otras tres se asocian a la envuelta viral (Yoshimoto, 2020).

Figura 1: Representación del SARS-CoV-2



Nota: Representación del SARS-CoV-2: proteínas de espiga (S), membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N), están involucrados en la morfogénesis, ensamblaje viral, infección del huésped y la fusión de membranas. **Fuente:** (Santaniello *et al.*, 2023).

2.2.3. Nucleoproteína

La nucleoproteína del SARS-CoV-2 (N) es un cofactor esencial de la maquinaria de replicación, ya que encapsida el genoma viral, brinda protección contra el entorno de la célula

huésped y desempeña un papel esencial en la regulación de la transcripción genética. La N se produce en niveles elevados en las células infectadas, por ello lo convierte en un marcador importante de infección, también se ha relacionado con la perturbación de numerosos procesos del huésped. N se colocaliza en el RTC (complejo de replicación-transcripción) en los betacoronavirus, aunque la base molecular de su papel en la regulación de la replicación y la transcripción sigue siendo poco conocida (Bessa et al., 2022).

2.3. Transmisión

En general, se ha demostrado que los CoV en humanos se transmiten principalmente a través de gotículas respiratorias, aerosoles, contacto directo con superficies contaminadas y también contaminación fecal-oral (Yu et al., 2004).

2.3.1. Horizontal Directa

Los primeros y la mayoría de pacientes infectados con el SARS-CoV-2 de los que se tiene informes de tos, opacidades pulmonares y progresión a neumonía se evidenció una transmisión a través de la vía respiratoria (Zhou et al., 2020). La eliminación del virus a través de la vía respiratoria es responsable de la transmisión directa que se refuerza con la capacidad que tiene el SARS-CoV-2 de replicarse tanto en el tracto respiratorio superior como en el inferior, además de los numerosos reportes de la propagación persona a persona que exhiben tos activa (The COVID-19 Research Team, 2020).

La tos, al igual que al hablar o estornudar, son responsables de la producción de gotículas que pueden llegar a permanecer de manera temporal en el aire hasta por un radio de 4 metros y causar infecciones en personas susceptibles tras su inhalación (Jiang et al., 2020).

2.3.2. Horizontal Indirecta

Se debe principalmente a que estas gotículas respiratorias se depositan en diferentes superficies que pasan de las manos a las membranas mucosas de las cavidades tanto oral, como nasal, oftálmica, etc. (General Directorate of the National Health Commission, 2020).

2.3.3. Fecal-Oral

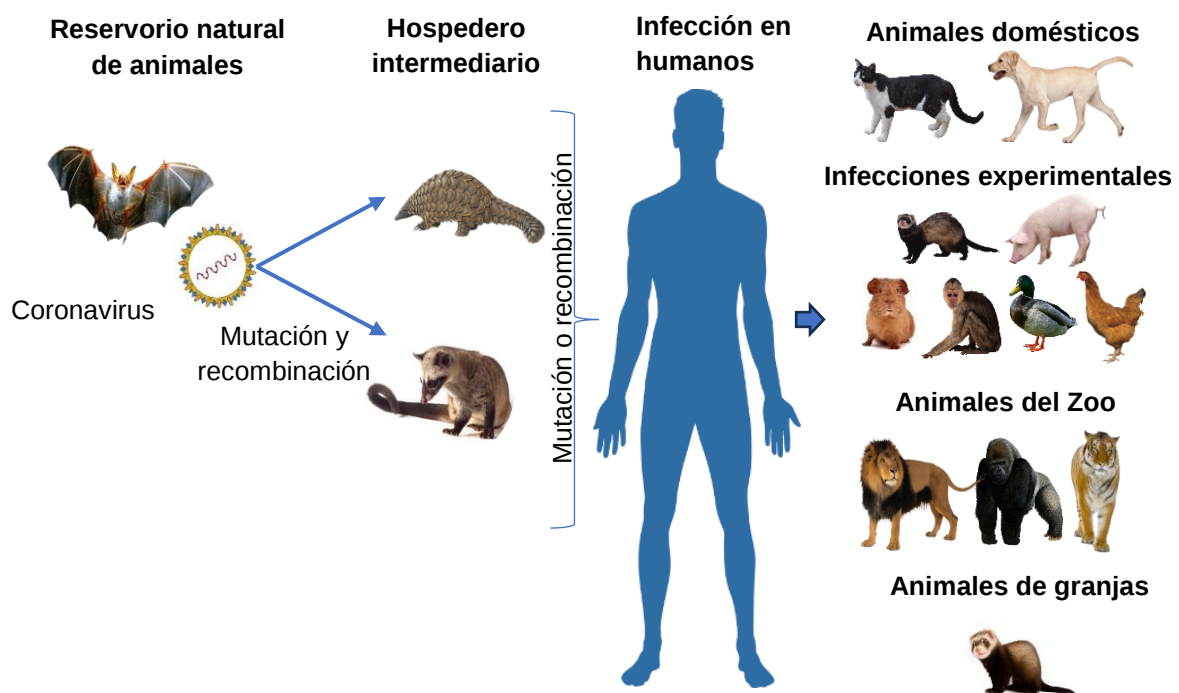
También se presume una transmisión de tipo fecal-oral debido a los hallazgos del SARS-CoV-2 en el tracto gastrointestinal (TGI) e inclusive en las heces de personas infectadas (Pan et al., 2020).

2.3.4. Otras Vías de Transmisión

Además, se ha descrito la transmisión de madre a hijo, con el SARS-CoV y el MERS-CoV se pudo comprobar que estos podían causar graves complicaciones durante la gestación (Wong *et al.*, 2004), no obstante, Chen *et al.* (2020) en su estudio indicó que no hay evidencia de que el SARS-CoV-2 tenga capacidad de ocasionar alguna alteración grave en el feto o neonato.

Finalmente, otras posibles vías de transmisión, como través de la vía conjuntival ocular, ya que Xia *et al.* (2020) detectó el virus tanto en lágrimas como en secreciones de la conjuntiva; además de que existen reportes de que también se ha aislado el SARS-CoV-2 de una muestra de orina de un paciente infectado (G. Guo *et al.*, 2020). Actualmente, ya existe evidencia de propagación de personas asintomáticas o presintomáticas, por lo tanto, se refleja la capacidad del virus para colonizar y replicarse eficientemente en las vías aéreas altas, sobre todo en tejidos naso y orofaríngeos (Ferretti *et al.*, 2020).

Figura 2: Posible origen, transmisión e infección del SARS-CoV-2



Fuente: (Hernández *et al.*, 2023).

2.4. Patogenia

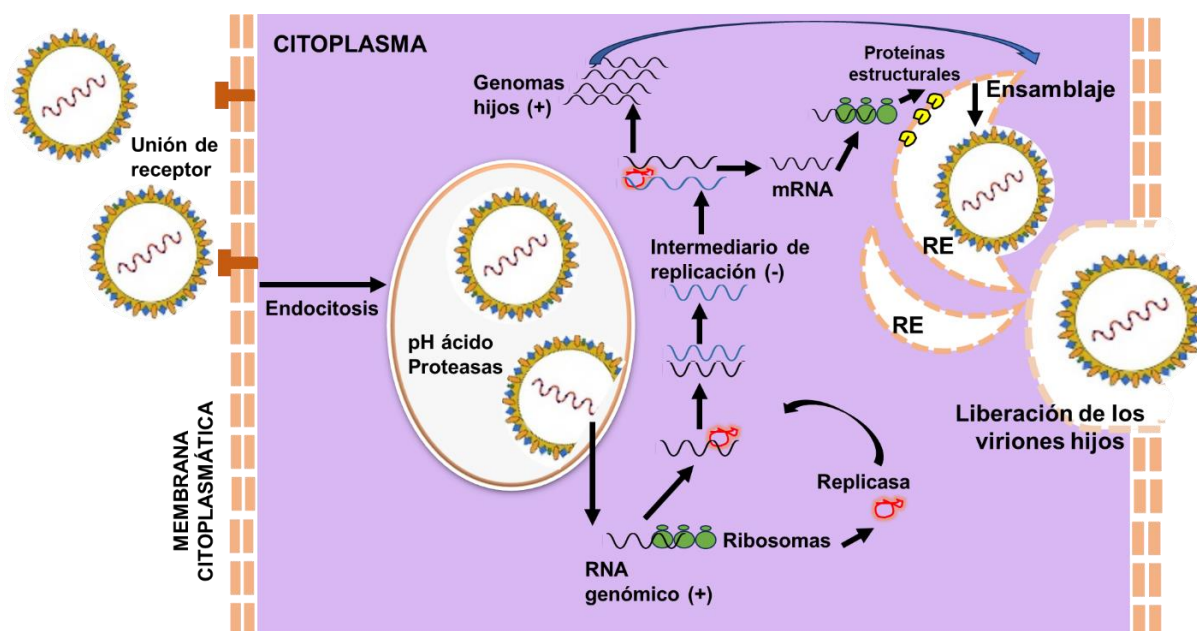
El SARS-CoV-2 tiene tropismo hacia el tejido pulmonar del paciente infectado, cuando los SARS-CoV ingresan al huésped por medio de la vía respiratoria, las células epiteliales alveolares, las células endoteliales vasculares y los macrófagos alveolares son los principales afectados, por lo tanto, la infección y consecuente replicación tiene su origen en las mismas

(Jia *et al.*, 2005). La infección inicia cuando el virus se une a un receptor de la superficie de la célula huésped, específicamente la proteína S del SARS-CoV-2 es la que une a un receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) de la superficie celular, generalmente los receptores de ACE2 se encuentran en el tracto respiratorio inferior, además de en otros tejidos del corazón, estómago, esófago, vejiga, riñón e intestino (Jin *et al.*, 2020), sin embargo, este receptor se expresa en mayor proporción en las células alveolares tipo 2 del pulmón y en las células epiteliales de la cavidad oral (Xu *et al.*, 2020). La proteína S se divide en dos subunidades la S1 y S2, las que se unen al receptor ACE2 a través del RBD y promueven a fusión de la membrana viral con la celular, respectivamente (Guo *et al.*, 2020).

Para que se complete la entrada del virus, una enzima proteasa (TMPRSS2) debe escindir a la proteína S a nivel de dos posiciones de la subunidad S2, lo que provoca la separación de la unión RBD de la subunidad S1 con el receptor ACE2 y en consecuencia la fusión de ambas membranas, lo que permite finalmente el ingreso del virus por endocitosis (Rabaan *et al.*, 2020). Ya dentro del citoplasma (Figura 3), el virus libera su nucleocápside junto con la salida del ARN viral, el mismo que directamente actúa como ARNm y transcribe de primera mano el gen de la replicasa del virus a través de ORF1a y ORF1ab, esto se traduce en las pp1a y pp1ab, las cuales se acaban procesando por proteasas como la quimi tripsina, la proteasa principal y de una a dos proteasas semejantes a la papaína, todo este proceso da lugar a 16 proteínas no estructurales (NSP) que se encargan de formar el complejo replicasa-transcriptasa (RTC), el mismo que se ensambla en vesículas con doble membrana con la ayuda del retículo endoplasmático (Guo *et al.*, 2020).

Casi todas las NPS contribuyen en la replicación y transcripción genómica con su acción proteolítica y otras funciones enzimáticas, esto facilita la replicación y síntesis de un grupo de ARNm subgenómicos (ARNsg) que colaboran con la elaboración de las proteínas estructurales y accesorias (Chen *et al.*, 2020). Al igual que otros CoV, el SARS-CoV-2 se replica utilizando como molde el ARN monocatenario con polaridad positiva (ARNss+) con el fin de sintetizar una copia del mismo pero de polaridad negativa (Li *et al.*, 2020), a partir de la cual se producen las pp1a y pp1ab que a su vez serán procesadas conformando el complejo RTC, este sintetiza una nueva copia de ARNss+ original que se asocia a la proteína N y conforman la nucleocápside, el resto de proteínas estructurales y accesorias se originan en la membrana del retículo endoplasmático, para después transportarse al aparato de Golgi donde se ensamblan con la nucleocápside y finalmente producen nuevas partículas víricas que posteriormente se liberarán de cada célula infectada por exocitosis (Pastrian-Soto, 2020).

Figura 3: Replicación de SARS-CoV-2



Nota: El virión se une por la glicoproteína S (subunidad S1) al receptor celular (ACE-2), ingresa por endocitosis. El pH ácido y las proteasas endosomiales escinden las subunidades S1 y S2 y modifican S2 para que promueva la fusión de la envoltura viral y la membrana de la vesícula endocítica. La traducción parcial del RNA genómico conduce a la síntesis de la RNA polimerasa dependiente de RNA, que fabrica el intermediario de replicación (RNA de polaridad -) que actúa como molde para la síntesis de los RNAs genómicos de los viriones hijos. Se producen mRNAs para la síntesis de las proteínas estructurales. El ensamblaje de los distintos componentes sintetizados produce los viriones hijos, que emergen del retículo endoplásmico (RE) en el interior de vesículas, las cuales se fusionan con la membrana citoplásmica para liberar viriones hijos. **Fuente:** (Ruiz-Bravo & Jimenez-Valera, 2020).

2.5. Animales y SARS-CoV-2

Existen informes que han demostrado que algunas especies animales se han infectado de SARS-CoV-2, además se ha confirmado la transmisión activa de animales a humanos, es el caso de visones en Europa y Estados Unidos, además de la sospecha en otras especies (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, 2023; Hossain et al., 2021). Los visones infectados mostraron síntomas respiratorios y gastrointestinales y se cree que el contagio fue por medio de sus cuidadores ya que resultaron positivos a la enfermedad, en total el 7 de mayo se anunciaron en los Países Bajos 4 granjas de visones con el virus (Oreshkova et al., 2020). Por su parte, Shi et al. (2020) demostró que los hurones y gatos son susceptibles a la infección experimental con cepas del SARS-CoV-2 y que además pueden transmitir el virus por la vía aérea a otros animales sanos si estos conviven cerca. Los hurones

mostraron sintomatología respiratoria con presencia del virus en lavados nasales, saliva, orina y metería fecal, sin ninguna mortalidad, aun así, la transmisión fue bastante rápida entre hurones infectando a sanos (Kim *et al.*, 2020). En contraparte, los perros resultaron ser menos susceptibles a la infección, mientras que otros animales domésticos como cerdos, pollos, patos, etc. no son susceptibles (Shi *et al.*, 2020).

En cuanto a los felinos, el primer caso de COVID-19 en un tigre ocurrió el 5 de abril del 2020, este mostró un cuadro clínico respiratorio que incluían la tos seca y disminución del apetito, por otro lado, el 15 de abril se reportó un caso positivo en un león del mismo zoológico, para finalmente acabar confirmando que todos los tigres y leones de ese zoológico presentaban ARN viral del SARS-CoV-2 en sus heces (AVMA, 2020). Referente a las infecciones de tipo experimental, estas nos han permitido estimar el período de incubación en animales, el cual es semejante a los humanos, es decir, oscila entre 2 a 14 días (OIE, 2022).

Durante los meses (abril-junio 2023), se han actualizado 4 brotes en (Argentina, Ecuador, Italia) en 4 especies animales (visón americano, armadillo peludo grande, mono araña de cabeza negra, mono lanudo común); en Ecuador (mono araña de cabeza negra y mono choro común); monos en cautiverio con signos clínicos y mortalidad (WOAH, 2023).

2.6. SARS-CoV-2 en Perros y Gatos

Uno de los primeros casos confirmados fue el reportado el 28 de febrero de 2020 en Hong Kong en un perro, seguido por otro de raza pastor alemán que dio positivo a SARS-CoV-2, sin mostrar síntomas clínicos ninguno de los dos y con propietarios cuyo diagnóstico previo fue de COVID-19 (Goumenou *et al.*, 2020). Por otro lado, en los Países Bajos también hubo un caso confirmado en un perro positivo con un dueño que presentaba la infección con el SARS-CoV-2. En cuanto a gatos, el primer caso confirmado fue el de una mascota en Bélgica perteneciente a un paciente con antecedentes de la enfermedad que había viajado al norte de Italia, sin embargo, en esta ocasión se logró evidenciar síntomas de tipo gastrointestinales y niveles elevados de ARN del virus tanto en heces como en vómitos, además de sintomatología respiratoria (Hossain *et al.*, 2021).

También se ha podido detectar el virus en muestras de la cavidad oral, nasal y rectal de un gato en Hong Kong que no mostraba ninguna sintomatología, pero que también coincidía en tener un propietario que padecía la infección, de igual manera, el 21 de abril de 2020 se confirmó dos gatos positivos en Nueva York, esta vez ambos presentaban sintomatología respiratoria (AVMA, 2020). En 2020, otros tres gatos dieron positivo en Holanda, lo curioso fue que estos gatos convivían en una granja de visones, los mismos que ya habían sido confirmados como positivos al SARS-CoV-2 (Oreshkova *et al.*, 2020).

Profundizando más en la infección en la especie felina, sobre todo en los gatos domésticos, como ya mencionamos, tanto natural como experimentalmente son bastantes susceptibles a contraer la infección por el SARS-CoV-2, la mayoría de veces con un cuadro clínico asintomático y autolimitado que se localiza fundamentalmente en la vías respiratorias altas, infectando sin dificultad a otros gatos cercanos, además de desarrollar una respuesta inmune bastante fuerte que al parecer les protege de reinfecciones a corto plazo (Meekins *et al.*, 2021).

Son diversas las investigaciones experimentales que valoran la susceptibilidad que tiene los gatos al virus, generalmente podemos encontrar estudios donde se ha utilizado diferentes dosis virales o vías de inoculación, todo esto en gatos tanto juveniles como adultos, y en todos se ha presenciado una infección productiva del SARS-CoV-2 (Bao *et al.*, 2021; Bosco-Lauth *et al.*, 2020; Gaudreault *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2020). Cabe recalcar que tan solo 1 día después del experimento ya se pudo aislar el virus de hisopos nasales y orofaríngeos, continuando la diseminación por 6 días más, también se pudo detectar ARN viral más allá de este lapso de tiempo, inclusive en muestras fecales (Bao *et al.*, 2021; Gaudreault *et al.*, 2020).

A pesar de lo manifiesto, en gran parte de estos estudios los gatos casi no mostraron sintomatología, no obstante, Bao *et al.* (2021) observó signos clínicos en gatos de 8 a 18 meses de edad que consistían en espalda arqueada, baja de peso de menos del 10% y diarrea. En contraparte, en todos los casos se pudo evidenciar cambios histopatológicos de leves a moderados en el tejido del tracto respiratorio superior e inferior, generalmente en la fase aguda de la infección, pero llegando a permanecer hasta por un mes (Bosco-Lauth *et al.*, 2020; Chiba *et al.*, 2021). Entonces, es posible sugerir que los gatos jóvenes son menos susceptibles al virus y a la presentación grave de la infección, y que siempre habrá cambios histopatológicos que pueden llegar a afectar otros tejidos tales como los ganglios linfáticos, el bazo, el hígado, bulbo olfatorio, corazón y riñones, lo que demuestra que su distribución es de tipo sistémica (Shi *et al.*, 2020). Sorprendentemente, cuando las transmisiones se dan en serie hasta 4 veces, el virus se va atenuando tanto en su propagación como en las lesiones histopatológicas, al contrario que en humanos (Bao *et al.*, 2021).

Asia, Europa y el continente americano ya han reportado y demostrado la infección natural de humanos a gatos domésticos, generalmente mascotas de propietarios infectados con el SARS-CoV-2 (OIE, 2022), por lo que existe la posibilidad de que este virus se convierta en endémico dentro de la población de gatos u otros animales domésticos, así que podrían ser un modelo preclínico adecuado para valorar y comprender la patogenia del SARS-CoV-2 y con ellos contribuir en el desarrollo de terapias y vacunas (Meekins *et al.*, 2021).

Zhang *et al.* (2020) en su investigación evidenció la presencia de 15 gatos de 102 que resultaron seropositivos al SARS-CoV-2 en Wuhan en China después del brote inicial y los

comparó con muestras provenientes de un banco de sueros pre-pandemia del mismo lugar, los mismos que dieron negativo al patógeno, por lo tanto, se presume que los gatos son susceptibles a la infección natural del virus.

2.7. Diagnóstico en Animales

2.7.1. Diagnóstico Clínico

Como ya se mencionó en el apartado anterior, las manifestaciones clínicas en animales se limitan a un porcentaje bajo y poco representativo, ya que la mayoría de animales que adquieren de manera natural el virus suelen ser asintomáticos, sin embargo, en los pocos casos que se han reportado signos clínicos estos parecen ser semejantes a los observados en humanos, como lo son la fiebre, tos, dificultad respiratoria, letargia, estornudos, secreciones nasales o conjuntivales y en casos excepcionales sintomatología gastrointestinal como diarrea y vómito (AVMA, 2020).

2.7.2. Diagnóstico Diferencial

Los perros y gatos tienen sus propios coronavirus, en cuanto a los perros se conoce al alfacoronavirus entérico (CCoV), que tiene dos genotipos el CCoV-I y II, mientras que los gatos se ven afectados por el coronavirus felino (FCoV) con dos genotipos el FCoV-I y II que poseen dos patotipos diferentes, el CoV entérico felino, que causa infecciones asintomáticas o leves; y el virus responsable de la peritonitis infecciosa felina, la cual se caracteriza por ser sistémica y mortal, no obstante todos estos CoV difieren tanto genética como biológicamente del SARS-CoV-2 por lo que no pueden afectar a los humanos (Lorusso *et al.*, 2020), sin embargo, hay que tenerlos presentes, así como a otras enfermedades que cursen con sintomatología respiratoria y gastrointestinal y valorar cualquier vínculo epidemiológico de una infección confirmada en sus cuidadores u otros animales del hogar (OIE, 2022).

2.7.3. Diagnóstico de Laboratorio

Antes de someter a pruebas para detección de SARS-CoV-2 en animales de compañía se debe informar las autoridades competentes de salud pública. Primeramente, en animales, la obtención de las muestras debe realizarse con el fin de realizar diferentes tipos de pruebas: las que identifican al patógeno y las que detectan anticuerpos. De esto dependerá de qué lugar se tomarán las muestras. Estas pueden ser simples o combinadas y consistir en hisopados de la mucosa nasal, orofaríngea y rectal para detectar ARN viral, mientras que las muestras de sangre servirán para la detección inmunitaria en plasma o suero. Se recomienda

combinar estos hisopados para mayor exactitud, así mismo también se ha descrito la presencia del SARS-CoV-2 en muestras fecales (OIE, 2022).

Para identificar al patógeno se pueden aislar al virus, secuenciar el genoma del mismo, realizar pruebas como PCR-TR (reacción en cadena de polimerasa con transcripción inversa) o LAMP-RT (amplificación isotérmica mediada por bucle mediante transcriptasa inversa). Mientras que para detectar la presencia de anticuerpos son adecuadas los inmunoensayos de ELISA, VNT (neutralización viral), Western Blot (electroinmunotransferencia), etc. (OIE, 2022). Se debe mencionar que las pruebas serológicas son constantemente evaluadas ya que estas deben ser específicas para la finalidad, el patógeno y la especie, con alta especificidad y sensibilidad para evitar posibles reacciones cruzadas, por lo que ya se han perfeccionado algunas pruebas, un ejemplo lo documentó Colitti *et al.* (2022) que realizó el mapeo detallado de epítomos de la proteína N del SARS-CoV-2, facilitando la detección de la región inmunodominante en el fragmento D+E del dominio C terminal de la proteína, tanto en humanos como otras especies susceptibles, lo que contribuyó con el desarrollo de un inmunoensayo de ELISA indirecto experimental basado en doble antígeno con una especificidad del 99,5%.

2.7.4. ELISA Indirecto

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es una técnica para detectar y cuantificar anticuerpos o antígenos adheridos a una superficie sólida. La técnica utiliza un anticuerpo ligado a una enzima que se une a un antígeno adherido a la superficie. Luego, se agrega un sustrato para producir un cambio de color o una señal luminosa que se correlaciona con la cantidad de antígeno presente en la muestra original (Lin, 2015).

En el ELISA indirecto el anticuerpo específico del antígeno primario es reconocido por un anticuerpo conjugado secundario (Aydin, 2015). Una muestra que debe analizarse para detectar un antígeno específico se adhiere a los pocillos de una placa de microtitulación, seguida de una solución de proteína que no reacciona, como la albúmina sérica bovina, para bloquear cualquier área de los pocillos que no esté recubierta con el antígeno. Luego se agrega el anticuerpo primario, que se une específicamente al antígeno, seguido de un anticuerpo secundario conjugado con enzima. Se introduce un sustrato para la enzima para cuantificar el anticuerpo primario mediante un cambio de color. La concentración de anticuerpo primario presente en el suero se correlaciona directamente con la intensidad del color (Gan & Patel, 2013).

2.7.5. Western Blot

La transferencia Western (inmunotransferencia) es una técnica potente y de uso común que es capaz de detectar o semicuantificar una proteína individual a partir de mezclas complejas de proteínas extraídas de células o tejidos (Sule et al., 2023). Esta técnica permite transferir las proteínas de un gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) a soportes de membrana adsorbentes, siendo las proteínas transferidas a la membrana una réplica exacta del gel donde han sido separadas por electroforesis; básicamente la electroforesis en gel se utiliza para separar proteínas nativas o desnaturalizadas. Esta transferencia de gel a membrana supone una gran herramienta para la detección y caracterización de proteínas, especialmente las que están en bajas abundancias (Kurien & Scofield, 2015). Esta membrana es incubada con dos anticuerpos; el anticuerpo primario se une a las proteínas de la membrana, mientras que el anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario. Una vez terminado el tiempo de incubación, se añade un fluoróforo (peroxidasa de rábano) que emitirá una luz que nosotros vemos en forma de bandas (las cuales corresponden a las proteínas) (Jensen, 2012).

2.8. Tratamiento SARS-CoV-2 en Animales

A día de hoy, no existe ninguna terapia antiviral específica para tratar el COVID-19, ni siquiera para tratar infecciones de SARS (Avendano *et al.*, 2003) o MERS (Zumla *et al.*, 2015), las terapias que se aplican son meramente profilácticas con el uso de vacunas, el uso de medicamentos como tratamiento sintomático y terapias de apoyo en pacientes críticos (G. Guo *et al.*, 2020). En cuanto a animales, la OIE nos informa que aún no se ha definido un tratamiento específico para estos.

2.9. Prevención y Control

Aunque no se ha documentado que los animales de compañía contribuyan en la diseminación del SARS-CoV-2, son varios autores los que han demostrado que algunas especies pueden ser susceptibles al virus, por lo que se recomienda más estudios para valorar el potencial que pueden tener las mismas como reservorios o medios de propagación. Además, mientras esto siga en cuestionamiento, se recomienda limitar el contacto entre personas infectadas y sus mascotas, y evitar que estas últimas tengan contacto con otros animales o personas, así mismo instaurar medidas básicas de higiene (Rodríguez-Morales *et al.*, 2020). En el caso de que algún animal de compañía que ha estado expuesto al virus manifieste signos clínicos lo mejor sería someterlo a pruebas de detección del SARS-CoV-2 como medida preventiva (Sentarse *et al.*, 2020).

Es importante comprender el enfoque de una sola salud, esto se logra gracias a la colaboración conjunta desde lo local a lo global de diversos sectores y disciplinas con el fin de precautelar la salud y bienestar públicos, incluyendo humanos, animales y plantas que comparten un mismo entorno (Mushi, 2020). En consecuencia, es imprescindible conocer todo lo posible de este patógeno, sus huéspedes naturales, intermedios y medio ambiente óptimo para su desarrollo, además de valorar la posibilidad de mutaciones, las formas de transmisión entre especies y los saltos interespecie, todo con el objetivo de comprender la patogénesis del SARS-CoV-2 y poder lidiar con su propagación (Hassani & Khan, 2020).

Mientras tanto, la diseminación del virus se puede controlar con el uso de pruebas rápidas de diagnóstico, medidas higiene, aislamiento, cuarentenas, aplicación de vacunas y terapias farmacológicas adecuadas (Bonilla-Aldana *et al.*, 2020), sin olvidarse de la vigilancia a otras especies susceptibles que mantengan contacto estrecho con personas, como lo son los animales en cautiverio, zoológicos, granjas, etc., e incluso animales silvestres que pueden actuar como huéspedes naturales o intermediarios (Dhama *et al.*, 2020).

Materiales y métodos

3.1. Área de Estudio

Para este estudio, el Dr. Antonio J. Vallecillo, responsable del laboratorio de biología molecular, ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, produjo el péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) en un modelo de expresión bacteriano que se utilizó para la detección de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 en 34 sueros sanguíneos de felinos domésticos que fueron potencialmente expuestos al virus debido a su cercanía con personas con antecedentes de haber cursado con el COVID-19, así mismo, se valoraron los resultados y se contrastaron con los obtenidos en muestras provenientes de un biobanco de sueros de gatos que se obtuvieron entre los años 2018 y 2019 por el laboratorio.

3.2. Población en Estudio

En cuanto a las muestras de suero sanguíneo pre-pandemia, estas fueron tomadas de gatos que residían en las parroquias aledañas a la ciudad de Cuenca-Azuay, entre los años 2018 y 2019. Por otro lado, las muestras sanguíneas post-pandemia fueron colectadas en las campañas de esterilización realizadas en parroquias de la misma ciudad y fueron seleccionados para el estudio únicamente los gatos que convivieron estrechamente con personas que cursaron con la COVID-19; no se valoró la raza, edad o sexo.

3.3. Primera fase: Colección y Transporte de Muestras Sanguíneas Para la Obtención de Sueros Post-pandemia

3.3.1. Materiales de trabajo

- Cinta para rotular
- Cofias
- Cooler
- Gel refrigerante
- Guantes de látex desechables
- Jeringas de 3 ml
- Mandil antifluido
- Mascarillas
- Rasuradora
- Rotulador de muestras
- Tijeras
- Torniquetes
- Torundas de algodón con alcohol etílico al 70%
- Tubos sin anticoagulante (tapa roja), agujas y adaptadores para agujas

3.3.2. *Materiales Biológicos*

Pacientes de la especie felina, domésticos y con antecedentes de exposición a personas que cursaron con la infección por SARS-CoV-2, con previa realización de encuesta y consentimiento del responsable de la mascota.

3.3.3. *Materiales Químicos*

- Alcohol etílico al 70%

3.3.4. *Pasos*

Primero: Una vez sujeto de manera adecuada la mascota, se procedió a rasurar y la asepsia de la zona correspondiente a la vena yugular con Etanol al 70%.

Segundo: Se extrajo la sangre de la vena yugular, al menos 2 ml de sangre de cada gato con la ayuda de tubos de tapa roja.

Tercero: Después de obtener las muestras, se colocaron los tubos con la tapa hacia abajo a 25-30 grados de inclinación, a temperatura ambiente, protegidos del sol por 20-30min, con el fin de separar de la muestra el coágulo y el suero.

Cuarto: se conservaron las muestras en un cooler, los tubos fueron colocados en posición vertical con el gel refrigerante.

Quinto: se trasladaron las muestras al laboratorio Biología Molecular de la F.CC.AA. de la Universidad de Cuenca y se conservaron en refrigeración (± 4 °C) por máximo 5 días para la obtención del suero sanguíneo.

3.4. Segunda fase: Obtención de Suero Sanguíneo de las Muestras de Sangre

3.4.1. *Materiales Físicos y Equipos*

- Gradillas
- Marcadores
- Microcentrífuga
- Micropipetas de varios volúmenes y sus puntas
- Palillos de dientes estériles
- Papel absorbente
- Refrigerador (± 4 °C)
- Tubos Eppendorf
- Ultracongelador (-80 °C)

3.4.2. *Materiales Biológicos*

Muestras de sangre colectadas en tubos sin anticoagulante.

3.4.3. Materiales Químicos

– Alcohol etílico al 70%.

3.4.4. Pasos

Primero: Para obtención del suero de las muestras de sangre almacenadas en refrigeración, se procedió a retirar y desechar el coágulo con ayuda de un palillo de dientes estéril (previamente los tubos en posición vertical con la tapa hacia arriba para favorecer la retracción del coagulo y liberación del suero por 1 a 5 días).

Segundo: Se tomó de cada tubo $\pm 500 \mu\text{l}$ de suero sanguíneo y se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml, previamente identificados.

Tercero: Para eliminar lo más posible los glóbulos rojos liberados del coagulo, las muestras de suero sanguíneo fueron centrifugadas a $4,500 \times g$, por 10 min a temperatura ambiente ($\pm 23^\circ\text{C}$).

Cuarto: Posteriormente, se tomó $\pm 400 \mu\text{l}$ de cada muestra de suero sanguíneo se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml, previamente rotulados.

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

3.5. Tercera Fase: Ensayo de ELISA Indirecto

3.5.1 Materiales Físicos y Equipos

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

3.5.2. Materiales Biológicos

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

3.5.3. Materiales Químicos

- Solución para la sensibilización de las placas de ELISA (Nunc MaxiSorp flat-bottom plate, Invitrogen, No. cat.: 442404), consiste 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 0.1 μg por pozo (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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 H_2O_2 al 30% (Fisher, No. cat H325-4)

3.5.4. Pasos Para Ensayo ELISA

Primero: se procedió a la sensibilización de las placas, para ello se colocó 50 μl de la solución de sensibilización del péptido recombinante D+E ($\text{L}^{230}\text{-A}^{419}$) por cada pocillo. Las placas se incubaron en estático toda la noche (± 14 h) a 4 °C (refrigeración).

Segundo: 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, e ingresaron a incubación por 2 horas a una temperatura de 23 a 25 °C (Ambiente) en estático.

Tercero: concluida 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).

Cuarto: Las placas con las muestras de suero se incubaron por 1 hora, en agitación constante a temperatura ambiente. Concluida la incubación se realizaron 3 lavados, de 5 min con la solución de lavado.

Quinto: posterior a los lavados, se adicionó 50 µl de la Solución con la Proteína A-HRP, y se incubó por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante.

Sexto: concluida la incubación con la Solución de proteína A-HRP, se realizó 3 lavados, de 5 min con la Solución de lavado.

Séptimo: concluidos los lavados se adicionó de 50 µl de la Solución del sustrato, y se incubó las placas por 15 min a temperatura ambiente, en estático y protegida de la luz.

Octavo: 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.

Noveno: 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 la media de las lecturas del blanco de cada placa.

3.6. Cuarta Fase: Ensayo de Western Blot

3.6.1. Materiales Físicos y Equipos

- Agitador orbital
- Balanza analítica
- Cámara de electroforesis para la electotransferencia de las proteínas
- Cámara de electroforesis para SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
- Computadora
- Escáner
- Fuente de poder
- Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas
- Potenciómetro (pHmetro)
- Recipientes de vidrio para la preparación de soluciones.

3.6.2. Materiales biológicos

- Muestras de suero sanguíneo
- Solución con el péptido recombinante D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la Nucleoproteína del SARS-CoV-2 del Laboratorio de Biología Molecular de la F.CC.AA. de la Universidad de Cuenca.

3.6.3. Materiales químicos

3.6.3.1. Para la resolución de las proteínas mediante SDS-PAGE.

- Agua destilada estéril
- Alcohol etílico (Sigma, No. cat.: E7023)

- Marcador de peso molecular para proteínas (SDS-PAGE molecular weight standards-Low range (Bio-Rad, Cat. no.: 161-0304))
- Membranas PVDF (Thermo scientific, No. cat.: 88520)

3.6.3.2. Para la electrotransferencia de las proteínas a la membrana PVDF.

- Solución al 10% de Persulfato de amonio (0.1 g/ml de Persulfato de amonio (Sigma, No. cat.: A3678)
- Solución boadding 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))
- 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)
- 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 de acrilamida/bis-acrilamida 29:1 al 30 % (Bio-Rad, No. cat.: 161015)
- Solución resolving buffer 4X (1,500 mM de Tris-HCl, pH 8.8 (Sigma, No. cat.: T4661, Fisher, Cat. nó.: 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. nó.: 7647-01-0), 0.4 % de SDS (Sigma, No. cat.: 71725)
- Solución TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletano-1,2-diamina (Bio-Rad, No. cat 161-08.01)

3.6.3.3. 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 destañir 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))

3.6.3.4. Para la inmunodetección de los anticuerpos.

- Solución del sustrato para la peroxidasa (500 μ g/ml de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) en PBS-T0.05 (Sigma, No. cat D5637)
- Solución para destañir 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))
- Solución para el bloqueo de las membranas (PBS-T0.05-BSA3) (10 mM de NaH_2PO_4 ; 1.8 mM de KH_2PO_4 ; 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 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 para la dilución de los sueros sanguíneos (PBS-T0.05-BSA3)
- 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)).

3.6.4. Pasos

Para el ensayo Western Blot se disuelve el D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) 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.

3.6.4.1. Para resolución del péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) recombinante mediante SDS-PAGE.

Primero: Para resolver o disolver el péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) se preparó un gel discontinuo desnaturizante de poliacrilamida al 12 %, para el gel resolutivo (Resolving) se colocó en un recipiente limpio (Tubo Falcon de 50 ml) los siguientes reactivos, previo al armado de las placas con los aditamentos para formar el gel (Gel casting system):

Tabla 1: Reactivos resolución del péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) recombinante

Reactivo:	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

Segundo: 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 un poco 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.

Tercero: Una vez que a polimerizado 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 2: Reactivos para la preparación del gel concentrador

Reactivo:	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

Cuarto: Se mezclaron los reactivos con excepción del TEMED. Se procedió a retirar el agua adicionado al gel resolutivo, se colocó los peines para forma los pozos en un formato de gel preparativo. Se adicionó al gel concentrador el TEMED, mezclar de forma cuidadosa para evitar la formación de espuma, cuidadosa y rápidamente se transfirió 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.

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

Sexto: El péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) (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.

Séptimo: Se cargó el péptido recombinante y el Marcador de peso molecular para proteínas en sus respectivos pozos.

Octavo: Se procedió a la resolución con la aplicación de 60 Voltios hasta que las muestras lleguen 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.

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

3.6.4.2. Para electrotransferencia del péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) recombinante resuelto mediante SDS-PAGE.

Primero: Una vez resuelto el péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) mediante SDS-PAGE, se procedió a desarmar la cámara de electroforesis y retirar los geles de los moldes.

Segundo; 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.

Tercero: Se adicionó en la cámara de electrotransferencia la solución buffer de transferencia fría ($\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se colocó el adaptador de las carcassas de los “sandwich” de la transferencia.

Cuarto; Para el armado de los “sandwich” de la transferencia, se colocó en un recipiente amplio cantidad suficiente de la Solución buffer de transferencia, se introdujo la porción de la carcassa para el “sandwich” 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 la otra porción de la carcassa (Color rojo). Cuidadosamente se retiró del recipiente y se colocó en la cámara de electrotransferencia.

Quinto: Para la transferencia se completó el armado de la cámara y se aplicó un voltaje de 60 Voltios por 1 hora.

Sexto: Una vez concluida la electrotransferencia se desarmó la cámara y se retiró la membrana del “sandwich” y se secó a temperatura ambiente, si son visibles las bandas de las proteínas se marcaron con ayuda de un lápiz.

3.6.4.3. Para la tinción del péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) transferido a la membrana de PVDF con Azul de Coomassie.

Primero: Para verificar la resolución de las proteínas y la electrotransferencia del péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) a las membranas se seccionará una porción de la membrana de ambos extremos, intentando incluir una parte de las bandas de las proteínas resueltas y se teñirá con Azul de Coomassie. El resto de la membrana se seccionará en tiras no mayores a 2 mm de grosor y se almacenarán a temperatura ambiente, protegidas de la luz y el polvo.

Segundo: Para la tinción de las porciones de las membranas, éstas serán sumergidas por 20 a 30 s en la Solución colorante para la tinción de azul de Coomassie, agitándolas para favorecer el contacto con el colorante.

Tercero: Inmediatamente se retirará la Solución colorante para la tinción de azul de Coomassie, se adicionará cantidad suficiente de la Solución para desteñir las membranas teñidas con la tinción de azul de Coomassie, se agitará constantemente hasta observar las bandas teñidas del Marcador de peso molecular, la del péptido D+E (L^{230} - A^{419}). Secar las membranas y guardarlas para su posterior uso.

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

Primero: Para la detección del posible reconocimiento de los anticuerpos de los gatos hacia el péptido D+E (L^{230} - A^{419}) recombinante se procedió a realizar el bloqueo de las membranas, para lo cual serán sumergidas en la solución de bloqueo durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente ($\pm 23^\circ\text{C}$).

Segundo: 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.

Tercero: 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 se incubaron por 1 hora en agitación constante.

Cuarto: 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.

Quinto: 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. Una vez concluida la incubación se procedió a realizar 3 lavados con cantidad suficiente de la Solución de lavado, por 5 min cada lavado en agitación constante.

Sexto: 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.

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

Octavo: Las membranas lavadas se secaron a temperatura ambiente, se ordenaron y fijaron a un soporte de papel (Cartulina) y se foto documentaron con ayuda de un escáner.

Noveno: 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.

Décimo: 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.

3.7. Análisis estadístico

Nuestro estudio valoró los resultados obtenidos a la presencia de anticuerpos anti-péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la Nucleoproteína de SARS-CoV-2 en gatos domésticos con antecedentes de exposición a COVID-19 mediante la aplicación de los ensayos de ELISA indirecto y Western Blot, por lo que de acuerdo a las variables implicadas la estadística que se aplicó es de tipo descriptiva, más específicamente se realizó una comparación de proporciones, es decir, se comparó los resultados de las muestras de suero que se analizaron mediante ELISA con las analizadas mediante Western Blot, tanto las obtenidas antes de la pandemia, como después de la pandemia (cuatro grupos). Para observar el comportamiento de los datos generados se usó la prueba estadística de McNemar, ya que se trataba de muestras relacionadas y cuyos resultados se definieron mediante una variable nominal dicotómica (positivo/negativo).

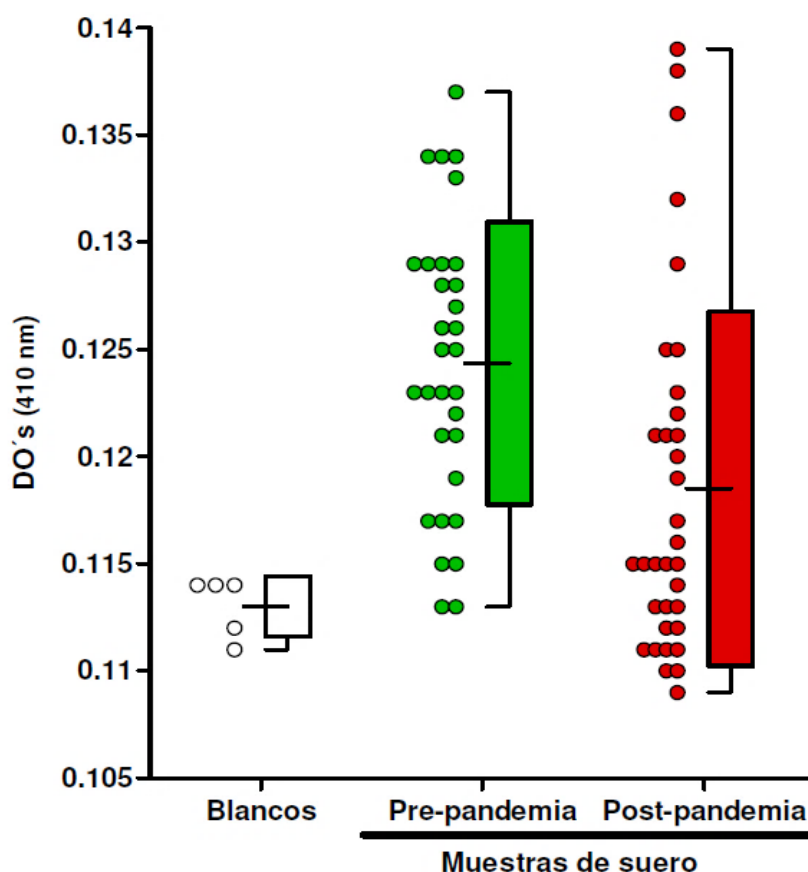
El presente trabajo de investigación optó por el uso de la prueba estadística no paramétrica de McNemar, ya que esta permite conocer si existe alguna diferencia significativa (y que no se deba al azar) en la distribución de proporciones entre dos mediciones de una variable dicotómica, por lo que compara proporciones de dos muestras relacionadas (Guerra & Gonzáles, 2013).

RESULTADOS

4.1. ELISA Indirecto

Para el ensayo de ELISA indirecto se utilizaron 65 muestras de suero sanguíneo de gatos domésticos, las cuales se dividían en 31 muestras tomadas antes de la pandemia y 34 muestras después de la pandemia, junto a estas se utilizaron 5 pozos sin suero como control (Blancos), en total se analizaron 70 pocillos usando el péptido recombinante D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2. Para la valoración de los resultados se consideraron como positivas a la presencia de anticuerpos anti-péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) a todas las muestras que dieron una lectura de densidades ópticas (DO's) mayor a la media de las lecturas de los pozos blancos más dos desviaciones estándar de la media de los mismos, es decir se consideraron como positivas todas las lecturas mayores a 0,115 DO's.

Figura 4: Resultados del ensayo ELISA Indirecto

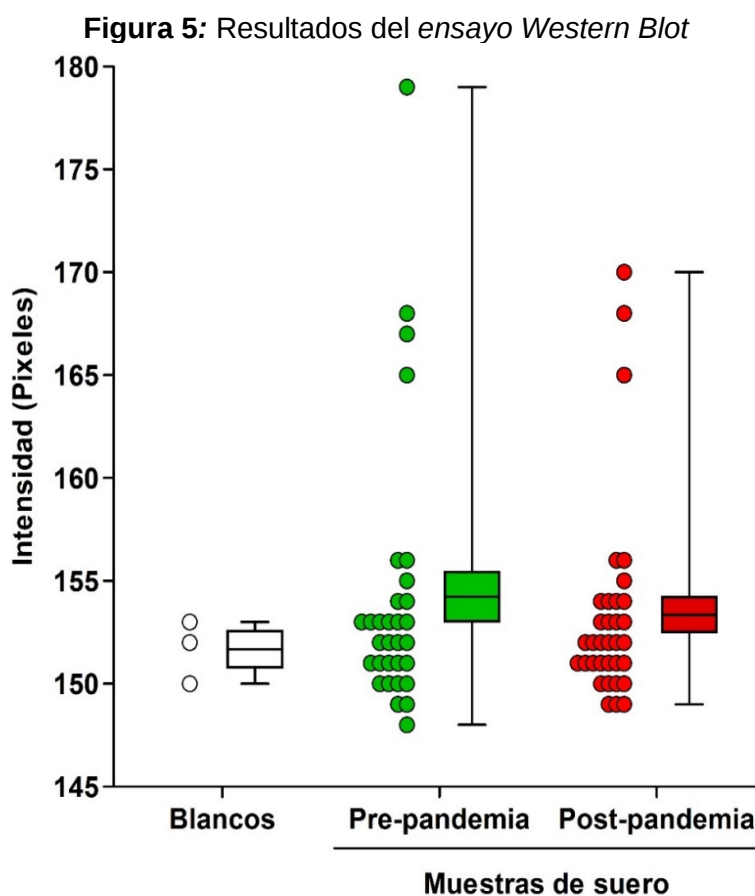


Nota: A través del ensayo de ELISA indirecto se usó el péptido recombinante D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 para detectar anticuerpos del virus en gatos domésticos (*felis catus*) potencialmente expuestos a COVID-19, los valores obtenidos de las muestras pre-pandemia (verde), post-pandemia (rojos) y los pozos control (blancos), se midieron en densidades ópticas (DO's).

La **Figura 4**, nos muestra que mediante la aplicación del ensayo de ELISA indirecto se obtuvieron 29 resultados positivos de 31 muestras pre-pandemia y en contraparte dentro de las muestras post-pandemia resultaron positivas 21 de un total de 34 muestras analizadas. Todos los resultados positivos indican que hubo la presencia anticuerpos reactivos frente a la nucleoproteína del SARS-CoV-2, más específicamente al dominio de su extremo carboxi-terminal.

4.2. Western Blot

Para el ensayo de Western Blot se utilizaron las mismas 65 muestras de suero sanguíneo de gatos domésticos, 31 muestras tomadas antes de la pandemia y 34 muestras después de la pandemia, junto a estas se utilizaron 3 ensayos sin suero como control (Blancos). Para la valoración de los resultados se consideraron como positivas a la presencia de anticuerpos anti-péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) a todas las muestras que dieron una lectura de la intensidad de la señal expresada en pixeles mayor a la media de las lecturas de los blancos más dos desviaciones estándar de la media de los blancos, es decir se consideraron como positivas todas las lecturas mayores a 154,72 pixeles.



Nota: A través del ensayo de Western Blot se usó el péptido recombinante D+E (L230-A419) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 para detectar anticuerpos del virus en gatos

domésticos (*Felis catus*) potencialmente expuestos a COVID-19, los valores obtenidos de las muestras pre-pandemia (verde), post-pandemia (rojos) y los pozos control (blancos), los valores de intensidad de la señal se midieron en píxeles.

La **Figura 5**, nos muestra que mediante la aplicación del ensayo de Western Blot se obtuvieron 7 resultados positivos de 31 muestras pre-pandemia y dentro de las muestras post-pandemia resultaron positivas 7 de un total de 34 muestras analizadas. Todos los resultados positivos indican que hubo la presencia anticuerpos reactivos frente a la nucleoproteína del SARS-CoV-2, más específicamente al dominio de su extremo carboxi-terminal.

4.3 Prueba estadística: Prueba de McNemar

De acuerdo a la **Tabla 3**, en los resultados se aprecia que los ensayos implementados con las muestras tomadas antes de la pandemia apenas coinciden, ya que, de 31 muestras totales, solo el 22,6% coinciden positivamente, por lo que en nuestro estudio podemos afirmar que los métodos utilizados no coincidieron y por lo tanto su comportamiento no es similar ya que difieren significativamente ($p= 0.001$).

Tabla 3: Resultados de la prueba estadística de McNemar para la comparación entre ELISA indirecto y Western Blot aplicados a las muestras serológicas en gatos domésticos tomadas antes de la pandemia.

Frecuencias	Negativo		Positivo		Total, ELISA I	
	Absolutas (Fi)	Relativas (fi)	Absolutas (Fi)	Relativas (fi)	Absolutas (Fi)	Relativas (fi)
Negativo	4	12.90%	0	0.00%	4	12.90%
Positivo	20	64.50%	7	22.60%	27	87.1%
Total, WB	24	77.40%	7	22.60%	31	100.00%

Nota: El valor de Chi cuadrado correspondiente al período de pre-pandemia fue de $p=0.001$, así que afirmamos que existen diferencias significativas entre los métodos utilizados, se rechaza la hipótesis nula.

De acuerdo a la **Tabla 4**, en los resultados se aprecia que los ensayos implementados con las muestras tomadas después de la pandemia tampoco coinciden, ya que, de 34 muestras totales, solo el 8.82% coinciden positivamente, por lo que los métodos utilizados no tampoco coincidieron y por lo tanto su comportamiento no es similar ya que difieren significativamente ($p= 0.0490$).

Tabla 4: Resultados de la prueba estadística de McNemar para la comparación entre ELISA indirecto y Western Blot aplicados a las muestras serológicas en gatos domésticos tomadas después de la pandemia.

Frecuencias	Negativo		Positivo		Total, ELISA I	
	Absolutas (Fi)	Relativas (fi)	Absolutas (Fi)	Relativas (fi)	Absolutas (Fi)	Relativas (fi)
Negativo	14	41.18%	4	11.76%	18	52.94%
Positivo	13	38.24%	3	8.82%	16	47.06%
Total, WB	27	79.41%	7	20.59%	34	100.00%

Nota: El valor de Chi cuadrado correspondiente al período de post-pandemia fue de $p=0.0490$, así que afirmamos que existen diferencias significativas entre los métodos utilizados, se rechaza la hipótesis nula.

Discusión

En nuestro experimento se usó el fragmento D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la nucleoproteína de SARS-CoV-2 descrito anteriormente por Colitti et al., (2022), en dicha investigación se afirmó la alta especificidad de hasta el 99,5% de este segmento que aparentemente era inmunodominante en sueros de mascotas que residían en áreas urbanas, sin embargo, en nuestro estudio se detectaron sueros positivos tanto de las muestras tomadas antes de la pandemia como de las posteriores a la pandemia, por lo tanto, concuerda con otros estudios en dónde se demuestra la baja especificidad de la nucleoproteína, y en consecuencia la de este péptido recombinante usado en los ensayos de ELISA indirecto y WB para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 en felinos domésticos. Cabe recalcar que el estudio realizado por Colitti et al., usó muestras de mascotas que residían en una zona urbana de Italia, lo que podría también explicar la diferencia con nuestros resultados, ya que en nuestra metodología usamos sueros de gatos que vivían principalmente en zonas rurales de diferentes parroquias de la ciudad de Cuenca, por lo tanto, la mayoría carecían de los cuidados sanitarios necesarios y por lo tanto estaban más expuestos a contraer cualquier infección.

Esta exposición a contraer enfermedades y el déficit de cuidados sanitarios de la mayor parte de la población de gatos domésticos que reside en áreas rurales de la ciudad de Cuenca pudo haber contribuido a la infección de los mismos por otros coronavirus endémicos de la especie, ya que estudios anteriores ya afirmaron la existencia de una reactividad cruzada entre el SARS-CoV-1 y los FCoV, sobre todo a la nucleoproteína de estos virus (Vlasova et al., 2007) . Entonces se sugiere que los resultados obtenidos en nuestro estudio mediante el ensayo de ELISA indirecto y Western Blot pudo haber una reacción cruzada con el FCoV, ya que existen investigaciones que demuestran que la proteína N del SARS-CoV-2 se ha asociado a reacciones cruzadas con otros coronavirus como el FCoV y el CCoV, debido a que comparten epítomos antigénicos comunes (Barua et al., 2021). Un estudio más actualizado realizado por Diezma-Díaz et al., (2023) se evaluó la especificidad analítica de varios tipos de ensayos, entre ellos ELISA y Western Blot, los mismos que utilizaron el fragmento RBD de la proteína S (RBD-S) y el fragmento N-terminal de la nucleoproteína para valorar seropositividad frente al SARS-CoV-2 y con ello determinar cuál tiene mejor rendimiento diagnóstico, también se analizaron sueros prepandémicos, además de sueros de animales infectados o vacunados contra otros coronavirus. Los resultados demostraron que los ensayos que usaron el fragmento RBD-S fueron los que tuvieron mayor rendimiento diagnóstico, siendo las pruebas realizadas en gatos más precisas que las de los perros, por lo que concuerda con otros estudios donde también descartan el uso de la proteína N para el diagnóstico de SARS-CoV-2 en mascotas, además de que las muestras analizadas mediante

el ensayo de Western Blot demostraron mayor especificidad analítica que el ELISA (Barua et al., 2021; Zhao et al., 2021).

Normalmente la mayoría de inmunoensayos que se han implementado en animales han utilizado la RDB-S o la proteína N (Zhao et al., 2021), la diferencia entre estas dos es su estructura y función, se conoce que la proteína S es escindida por las proteasas del huésped en S1 y S2, la primera posee una región única llamada RBD, por donde el virus ingresa a las células del huésped, esto es importante porque ya se ha descrito la elevada variabilidad de este dominio entre los distintos coronavirus, por lo tanto la especificidad de los ensayos que utilizan esta proteína es muy alta. En contra parte, el dominio N-terminal de la nucleoproteína no se une a ningún receptor, siendo esta proteína de las más conservadas en los distintos coronavirus, por lo que existen epítomos con reacción cruzada antigénica bastante significativa, por lo tanto, existe una reactividad cruzada entre la nucleoproteína del SARS-CoV-2 y las nucleoproteínas del coronavirus felino, y los coronavirus entéricos y respiratorios caninos (Diezma-Díaz et al., 2023; Zhao et al., 2021). Sin embargo, existe un estudio donde se obtuvieron elevadas tasas de seropositivos a la proteína S en sueros de mascotas obtenidos antes de la pandemia, por lo que se resalta la importancia de más investigaciones para comprender la prevalencia y potencial cruce de los coronavirus endémicos de cada lugar (Hancock et al., 2022).

Debido a la extensión de la pandemia, a nivel mundial se reportaron múltiples informes de animales de compañía contagiados de manera natural por el SARS-CoV-2, la mayoría de ellos se relacionaban a propietarios con antecedentes de haber cursado la enfermedad (Jarrah et al., 2022). Actualmente, es reducida la cantidad de pruebas serológicas utilizadas para detectar anticuerpos IgG específicos contra el SARS-CoV-2 en animales domésticos, dentro de estos se consideran de mayor importancia a perros y gatos, por el potencial zoonótico inverso debido a su cercanía con la población humana, además Jian et al., (2020) demostraron que los gatos eran más susceptibles a la enfermedad que los perros, de hecho los primeros estudios a gran escala demuestran esta susceptibilidad, tenemos el ejemplo de un estudio realizado en Italia (Patterson et al., 2020) donde se demostró la presencia de anticuerpos neutralizantes en un 3,3% de perros y un 5,8% de gatos muestreados, por otro lado, en Texas se obtuvo un 17,6% de positivos en gatos y tan solo un 1,7% de positivos en perros mediante la prueba de PCR-TR, mientras que los anticuerpos neutralizantes se presentaron en un 43,8% en gatos y en un 11,9% en perros (Hamer et al., 2021).

Así mismo, en un estudio realizado por Jarrah et al., (2023) en Mato Grosso, centro de Brasil, una de las ciudades con la segunda tasa de mortalidad más alta de Brasil por COVID-19, entre los meses de noviembre de 2020 y julio de 2021, se recolectaron muestras de suero de 762 perros y 182 gatos de los cuales de manera similar a nuestro estudio no hubo restricciones en lo referente a la edad, raza, sexo, historial médico, etc., las mismas fueron analizadas mediante ELISA de igual manera para detectar anticuerpos contra la nucleoproteína (N), además para este estudio también se realizó el ensayo de neutralización sérica (NS). Los resultados obtenidos mediante ELISA revelaron que de la población de muestras caninas hubo un 4,3% de positivos (33/762), mientras que en gatos los positivos comprendieron el 2,2% (4/182), sin embargo, la NS dio como resultado un 0,39% de perros positivos (3/762) y un 1,64% de gatos positivos (3/182). Se observa que no hubo concordancia con los resultados obtenidos sobre todo en la población canina, los autores asumen esta diferencia a las reacciones cruzadas con otros coronavirus endémicos en estas especies (Laidoudi et al., 2021). Go et al. (2023) en su estudio también afirman una discordancia existente entre el uso de ELISA y las pruebas de neutralización, aun habiendo utilizado como antígeno el RBD de la proteína S, e indican mayor reactividad cruzada con el ensayo de ELISA indirecto.

Finalmente, nuestro trabajo de investigación se realizó simultáneamente por otros estudiantes, pero con muestras de la especie canina, el mismo en donde se evidenció hasta el 96.55% de resultados positivos dentro de las muestras tomadas antes de la pandemia, indicando mayor reactividad cruzada. De forma similar, el péptido recombinante de la nucleoproteína D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) del SARS-CoV-2 no resultó útil para detectar anticuerpos en caninos (*Canis lupus familiaris*) potencialmente expuestos a COVID-19, además se especificó que en su estudio el ensayo de Western Blot fue el de mayor especificidad analítica, con un valor de $p=0.001$ y de $p=0.0001$ en las muestras pre-pandemia y post-pandemia respectivamente (Cuichán Bautista & Jiménez Ávila, 2023).

Conclusiones

La capacidad del uso del péptido recombinante D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la Nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2 para detectar anticuerpos en gatos domésticos (*Felis catus*) potencialmente expuestos a COVID-19 es reducida, ya que se evidenció resultados positivos tanto en las muestras de suero tomadas antes de la pandemia como después de la pandemia por lo que se determina que este péptido no resulta eficaz.

A pesar de que el péptido no resultó útil, se pudo demostrar que el ensayo de ELISA indirecto y Western Blot difieren entre sí significativamente, ya que se determinó una baja coincidencia entre los mismos, evidenciándose de acuerdo a los resultados mayor cantidad de positivos con el ensayo de ELISA indirecto e inclusive mayor cantidad de seropositivos en la etapa prepandémica, por ende, se reconoce una menor especificidad y mayor reacción cruzada con otros coronavirus.

Recomendaciones

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se sugiere, en el caso de que se empleen pruebas serológicas, el uso de otros antígenos virales como la porción RBD de la proteína S, la cual ha demostrado resultados exitosos para la detección de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 con escasa reacción cruzada a otros coronavirus, además del uso de pruebas serológicas más específicas y de mayor sensibilidad al antígeno como es la electroinmunotransferencia o VNT.

Para concluir se recomienda y resalta la importancia de realizar más investigaciones para comprender la prevalencia y potencial cruce de los coronavirus endémicos de cada lugar, además de mantener la vigilancia del SARS-CoV-2 y sus variedades debido a su potencial zoonótico y el contacto estrecho que tienen los humanos a las diferentes especies domésticas ya afectadas por esta enfermedad.

Referencias

- (World Health Organization - Technical Advisory Group on SARS-CoV-2 Virus Evolution. (2023). Updated working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants. *Who*, 6(04 October 2023), 821–823. <https://www.who.int/publications/m/item/updated-working-definitions-and-primary-actions-for--sars-cov-2-variants>
- Almeida, J., Berry, D., & Cunningham, C. (1968). Coronaviruses. *Nature*, 220, 209–222.
- Avendano, M., Derkach, P., & Swan, S. (2003). Clinical course and management of SARS in health care workers in Toronto: a case series. *Canadian Medical Association Journal*, 168(13), 1649–1660. <https://www.cmaj.ca/content/168/13/1649.short>
- AVMA. (2020). *SARS-CoV-2 in animals, including pets*. American Veterinary Medical Association. <https://www.avma.org/resources-tools/animal-health-and-welfare/covid-19/sars-cov-2-animals-incluyendo-mascotas> 2020
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Bao, L., Zhiqi, S., Xue, J., Gao, H., Liu, J., Wang, J., Guo, Q., Zhao, bin bin, Qu, Y., Lv, Q., Li, D., Han, Y., Zhao, W., Deng, S., Liu, Y., Xiang, Z., Yang, B., Deng, W., Yu, H., ... Qin, C. (2021). Susceptibility and Attenuated Transmissibility of SARS-CoV-2 in Domestic Cats. *The Journal of Infection Diseases*, 203(8), 1313–1321. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab104>
- 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. *Emerging Microbes & Infections*, 10(1), 1669–1674. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1967101>
- Bennett, J. E., Dolin, R., & Blaser, M. J. (2019). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Elsevier Inc.
- Bessa, L. M., Guseva, S., Camacho-Zarco, A. R., Salvi, N., Maurin, D., Perez, L. M., Botova, M., Malki, A., Nanao, M., Jensen, M. R., Ruigrok, R. W. H., & Blackledge, M. (2022). The intrinsically disordered SARS-CoV-2 nucleoprotein in dynamic complex with its viral partner nsp3a. *Science Advances*, 8(3), eabm4034. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm4034>
- Bonilla-Aldana, K., Dhama, K., & Rodriguez-Morales, A. J. (2020). Revisiting the One Health Approach in the Context of COVID-19: A Look into the Ecology of this Emerging Disease. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 8(3), 234–237. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2020/8.3.234.237>
- 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. *National Academy of Sciences*.

<https://doi.org/10.1073/pnas.2013102117>

Centros para el Control y Prevención de Enfermedades. (2023). *Animales y COVID-19*. <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/daily-life-coping/animals.html#:~:text=No hay evidencia de que,pero esto no es frecuente>.

Ceraolo, C., & Giorgi, F. M. (2020). Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus. *Journal of Medical Virology*, 92, 522–528. <https://doi.org/10.1002/jmv.25700>

Cheever, S., Daniels, J. B., Pappenheimer, A. M., & Bailey, O. T. (1949). A MURINE VIRUS (JHM) CAUSING DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS WITH EXTENSIVE MYELIN DESTRUCTION. *Journal of Experimental Medicine*, 90(3), 181–210. <https://doi.org/https://doi.org/10.1084/jem.90.3.181>

Chen, H., Guo, J., Wang, C., Luo, F., Yu, X., Zhang, W., Li, J., Zhao, D., Xu, D., Gong, Q., Liao, J., Yang, H., Hou, W., & Zhang, Y. (2020). Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30360-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30360-3)

Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 418–423. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>

Chiba, S., Halfmann, P. J., Hatta, M., Maemura, T., Fan, S., Armbrust, T., Swartley, O. M., Crawford, L. K., & Kawaoka, Y. (2021). Protective Immunity and Persistent Lung Sequelae in Domestic Cats after SARS-CoV-2 Infection. *Emerging Infectious Diseases*, 17(2), 660–663. <https://doi.org/10.3201/eid2702.203884>

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. *Veterinary Science*, 145, 81–87.

Cortés, M. E. (2020). Los coronavirus, enemigos antiguos pero con atuendos diferentes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 39(4), 10–13. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002020000400022&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Cuichán Bautista, A. N., & Jiménez Ávila, C. P. (2023). *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* [Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/42470>

Dan, J. M., Mateus, J., Kato, Y., Hastie, K. M., Dawen, E., Faliti, C. E., Grifoni, A., Ramirez, S. I., Haupt, S., Frazier, A., Catherine, N. V. R., Stephen A. Rawlings, Bjoern Peters, Florian Krammer, Viviana Simon, E. O. S., & Davey M. Smith, Daniela Weiskopf†, Alessandro Sette†, S. C. (2021). Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*, 371(6529).

<https://doi.org/10.1126/science.abf4063>

- De Moraes, H. A., Dos Santos, A. P., do Nascimento, N. C., Kmetiuk, L. B., Barbosa, D. S., Brandão, P. E., Guimarães, A. M. S., Biondo, C. P.-B., & Welker, A. (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. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.591216>
- Dhama, K., Patel, S. K., Sharun, K., Pathak, M., Tiwari, R., Yatoo, M. I., Malik, Y. S., Sah, R., Rabaan, A. A., Panwar, P. K., Singh, K. P., Michalak, I., Chaicumpa, W., Martinez-Pulgarin, D. F., Bonilla-Aldana, K., & Rodriguez-Morales, A. J. (2020). SARS-CoV-2 jumping the species barrier: Zoonotic lessons from SARS, MERS and recent advances to combat this pandemic virus. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 37. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101830>
- Diezma-Díaz, C., Álvarez-García, G., Regidor-Cerrillo, J., Miró, G., Villanueva-Saz, S., Dolores Pérez, M., Verde, M. T., Galán-Malo, P., Brun, A., Moreno, S., Checa, R., Montoya, A., Van Voorhis, W. C., & Ortega-Mora, L. M. (2023). A comparative study of eight serological methods shows that spike protein-based ELISAs are the most accurate tests for serodiagnosing SARS-CoV-2 infections in cats and dogs. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1121935>
- Errecalde, J., Edd, C., & Marin, G. (2020). *Covid-19: Etiología, Patogenia, Inmunología, diagnóstico y tratamiento*. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/117811/CONICET_Digital_Nro.d3f3b77e-d466-4cdf-985b-9be1831616b5_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Fenwick, C., Croxatto, A., Coste, A. ., Pojer, F., Andre, C., Pellaton, C., Farina, A., Campos, J., Hacker, D., Lau, K., Bosch, B.-J., Gonseth Nussle, S., Bochud, M., & D'Acremont, V., Trono, D., Greub, G., Pantaleo, G. (2021). Changes in SARS-CoV-2 spike versus nucleoprotein antibody responses impact the estimates of infections in population-based seroprevalence studies. *Journal of Virology*, 95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/jvi.01828-20>
- Ferretti, L., WYMANT, R., KENDALL, M., ZHAO, L., NURTAY, A., ABELER-DÖRNER, L., PARKER, M., BONSALL, D., & FRASER, C. (2020). Quantification of SARS-CoV-2 transmission suggests epidemic control with digital contact tracing. *Science*, 368(6491). <https://doi.org/10.1126/ciencia.abb6936>
- Fritz, M., Rosolen, B., Krafft, E., Becquart, P., Elguero, E., Vratskikh, O., Denolly, S., Boson, B., Vanhomwegen, J., Gouilh, M. A., Kodjo, A., Chirouze, C., Rosolen, S. G., Legros, V., & Leroy, E. M. (2020). High prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in pets from COVID-19+ households. *One Health*, 11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100192>
- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), e12. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>

- Gaudreault, N. N., Trujillo, J. D., Carossino, M., Meekins, D. A., Morozov, I., Madden, D. W., Indran, S. V., Bold, D., Balaraman, V., Kwon, T., Artiaga, B. L., Cool, K., García-Sastre, A., Ma, W., Wilson, W. C., Henningson, J., Balasuriya, U. B. R., & Richt, J. A. (2020). SARS-CoV-2 infection, disease and transmission in domestic cats. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 2322–2332. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1833687>
- General Directorate of the National Health Commission. (2020). *Diagnosis and Treatment Protocol for Novel Coronavirus Pneumonia (Test Version 6) [Online]*. http://www.gov.cn/zhuanti/2020-02/19/content_5480948.html
- Go, Y. Y., Carrai, M., Choi, Y. R., Brackman, C. J., Tam, K. W. S., Law, P. Y. T., Woodhouse, F., Gray, J., Kim, J. H., Park, J., Jeon, C. W., Jang, H., Magouras, I., Decaro, N., Cheng, S. M. S., Peiris, M., Beatty, J. A., & Barrs, V. R. (2023). Low Prevalence of SARS-CoV-2 Antibodies in Canine and Feline Serum Samples Collected during the COVID-19 Pandemic in Hong Kong and Korea. *Viruses*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/v15020582>
- Goumenou, M., Demetrios, S., & Aristidis, T. (2020). Possibility of transmission through dogs being a contributing factor to the extreme Covid-19 outbreak in North Italy. *Molecular Medicine REPORTS*, 21, 2293–2295. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11037>
- Guerra, A., & Gonzáles, Y. C. (2013). Algunas consideraciones sobre el uso de la prueba de Mc Nemar en las intervenciones educativas. *MEDISAN*, 17(11). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192013001100019&lng=es
- Guo, G., Ye, L., Pan, K., Chen, Y., Xing, D., Yan, K., Chen, Z., Ding, N., Li, W., Huang, H., Zhang, L., Li, X., & Xue, X. (2020). New insights into emerging SARS-CoV-2: epidemiology, etiology, clinical features, clinical treatment, and prevention. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(410). <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00410>
- 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. *Military Medical Research*, 7(11). <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0>
- Hamer, S. A., Pauvolid-Corrêa, A., Zecca, I. B., Davila, E., Auckland, L. D., Roundy, C. M., Tang, W., Torchetti, M. K., Killian, M. L., Jenkins-Moore, M., Mazingo, K., Akpalu, Y., Ghai, R. R., Spengler, J. R., Barton Behravesh, C., Fischer, R. S. B., & Hamer, G. L. (2021). SARS-CoV-2 Infections and Viral Isolations among Serially Tested Cats and Dogs in Households with Infected Owners in Texas, USA. *Viruses*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/v13050938>
- Hancock, T. J., Hickman, P., Kazerooni, N., Kennedy, M., Kania, S. A., Dennis, M., Szafranski, N., Gerhold, R., Su, C., Masi, T., Smith, S., & Sparer, T. E. (2022). Possible Cross-Reactivity of Feline and White-Tailed Deer Antibodies against the SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain. *Journal of Virology*, 96(8), e00250-22. <https://doi.org/10.1128/jvi.00250-22>

- Hassani, A., & Khan, G. (2020). Human-Animal Interaction and the Emergence of SARS-CoV-2. *JMIR Public Health and Surveillance*, 6(4). <https://doi.org/10.2196/22117>
- Hernández, E., Valdivia, A., Ávila, M., Ortiz, R., & Quezada, T. (2023). *Revisión: Infección natural por SARS-CoV-2 en animales*. 1–26.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Kruger, N., Muller, M., Drosten, C., & Pohlmann, S. (2020). The 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 to enter target cells. *Cell*, 181(2), 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hossain, G., Javed, A., Akter, S., & Sahaa, S. (2021). Host diversity of SARS-CoV-2: an update on natural infections and experimental evidence. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 54(2), 175–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.06.006>
- Jarrah, S. A., Kmetiuk, L. B., de Carvalho, O. V., de Sousa, A. T. H. I., Souza, V. R. F., Nakazato, L., Colodel, E. M., Dos Santos, A. P., Pettan-Brewer, C., Hahn, R. C., Silhessarenko, R. D., Ubiali, D. G., Pereira, A. H. B., de Moraes, H. A., Biondo, A. W., & Dutra, V. (2022). Persistent SARS-CoV-2 antigen presence in multiple organs of a naturally infected cat from Brazil. In *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases* (Vol. 28, p. e20210074). <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2021-0074>
- Jarrah, S. A., Kmetiuk, L. B., Valleriani, F., Bonfini, B., Lorusso, A., Vasinioti, V., Decaro, N., dos Santos, M. T., Spohr, K. A. H., Pratelli, A., Serroni, A., Capista, S., Sousa, V. R. F., Biondo, A. W., Nakazato, L., & Dutra, V. (2023). SARS-CoV-2 antibodies in dogs and cats in a highly infected area of Brazil during the pandemic. *Frontiers in Veterinary Science*, 10(4). <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1111728>
- Jensen, E. C. (2012). The Basics of Western Blotting. *Anatomical Record*, 295(3), 369–371. <https://doi.org/10.1002/ar.22424>
- Jia, H. P., Look, D. C., Shi, L., Hickey, M., Pewe, L., Netland, J., Farzan, M., Wohlford-Lenane, C., Perlman, S., & McCray, P. B. (2005). ACE2 Receptor Expression and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Depend on Differentiation of Human Airway Epithelia. *Journal of Virology*, 79(23), 14614–14621. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14614-14621.2005>
- Jian, Z. S., Zhiyuan, W., Gongxun, Z., Huanliang, Y., Chong, W., Baoying, H., Renqiang, L., Xijun, H., Lei, S., Ziruo, S., Yubo, Z., Peipei, L., Libin, L., Pengfei, C., Jinliang, W., Xianfeng, Z., Yuntao, G., Wenjie, T., Guizhen, W., ... Zhigao, B. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs and other domestic animals to SARS-coronavirus 2. *Science*, 368(6494), 1016–1020.
- Jiang, Y., Wang, H., Chen, Y., He, J., Chen, L., Liu, Y., Hu, X., Li, A., Liu, S., Zhang, P., Zou, H., & Hua, S. (2020). Clinical data on hospital environmental hygiene monitoring and protection of medical staff during the coronavirus disease 2019 outbreak. *MedRxiv*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.02.25.20028043>

- Jin, Y., Yang, H., Ji, W., Wu, W., Chen, S., Zhang, W., & Duan, G. (2020). Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses*, 12(4), 372. <https://doi.org/10.3390/v12040372>.
- Kim, Y.-I., Kim, S.-G., Kim, S.-M., Webby, R. J., Jung, J. U., & Choi, Y. K. (2020). Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. *Cell Host & Microbe*, 27, 704–709. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.023>
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2015). Western blotting: an introduction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1312, 17–30. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_5
- Laidoudi, Y., Sereme, Y., Medkour, H., Watier-Grillot, S., Scandola, P., Ginesta, J., Andréo, V., Labarde, C., Comtet, L., Pourquier, P., Raoult, D., Marié, J. Lou, & Davoust, B. (2021). SARS-CoV-2 antibodies seroprevalence in dogs from France using ELISA and an automated western blotting assay. *One Health*, 13(July), 19–21. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100293>
- Li, G., Yaohua, A., Lai, Y., Tiantian, H., Zonghui-li, Zhou, P., Sarten, S., Wang, W., Hu, D., Liu, X., Zhang, Q., & Wu, J. (2020). Coronavirus infections and immune responses. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 424–432. <https://doi.org/10.1002/jmv.25685>
- Lin, A. V. (2015). Indirect ELISA. In R. Hnasko (Ed.), *ELISA: Methods and Protocols* (pp. 51–59). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_5
- Link-Gelles, R., Ciesla, A. A., Mak, J., Miller, J. D., Silk, B. J., Lambrou, A. S., Paden, C. R., Shirk, P., Britton, A., Smith, Z. R., & Fleming-Dutra, K. E. (2024). Early Estimates of Updated 2023–2024 (Monovalent XBB.1.5) COVID-19 Vaccine Effectiveness Against Symptomatic SARS-CoV-2 Infection Attributable to Co-Circulating Omicron Variants Among Immunocompetent Adults — Increasing Community Access to Testing Program. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 73(4), 77–83. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7304a2>
- Lorusso, A., Calistri, P., Petrini, A., Sabini, G., & Decaro, N. (2020). Novel coronavirus (SARS-CoV-2) epidemic: a veterinary perspective. *Veterinary Italian*, 56(1), 5–10. <https://doi.org/10.12834/VetIt.2173.11599.1>
- Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (2010). *Fenner's Veterinary, Virology* (Cuarta). Academic Press. https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=TYFqIYO9eE4C&oi=fnd&pg=PP1&ots=TPWoPIGM7-&sig=o1D_NiBPY3vxAsYzfugn6rWxTVk&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Martina, B., Haagmans, B., Kuiken, T., Fouchier, R., Rimmelzwaan, G., Van, G., Peiris, J., Lim, W., & Osterhaus, A. (2003). Virology: SARS virus infection in cats and ferrets. *Nature*, 425(915).
- Masters, P. S., & Perlman, S. (2013). Coronaviridae. In D. M. Knipe & P. Howley (Eds.), *Fields Virology* (Sexta, pp. 825–858). Lippincott Williams & Wilkins. https://www.umassmed.edu/globalassets/ambros-lab/meetings/rna-biology-club-2019_20/masters-and-perlman-2013-in-fields-virology_1.pdf

- Meekins, D., Gaudreault, N., & Richt, J. (2021). Natural and Experimental SARS-CoV-2 Infection in Domestic and Wild Animals. *Viruses*, 13(1993). <https://doi.org/10.3390/v13101993>
- Mushi, V. (2020). The holistic way of tackling the COVID-19 pandemic: the one health approach. *Tropical Medicine and Health*, 48(1), 69–73. <https://doi.org/10.1186/s41182-020-00257-0>
- Observatorio Social del Ecuador. (2022). *Monitoreo del coronavirus COVID-19 en Ecuador*. covid19ecuador.org
- OIE. (2022). *INFECCIÓN POR SARS-COV-2 EN ANIMALES*. <https://www.woah.org/app/uploads/2022/04/sars-cov-2-situation-report-11.pdf>
- Oreshkova, N., Molenaar, R. J., Vreman, S., Duro, F., Munnink, B. B. O., Honing, R. W. H. der, Gerhards, N., Tolsma, P., Bowstra, R., Sikkema, reina s, Tacken, M. G., Weesendorp, M. M. de R. E., Engelsma, M., Brusckhe, C. J., Smit, L. A., Koopmans, M., Poel, W. H. van der, & Stegeman, A. (2020). SARS-CoV-2 infection in farmed mink, The Netherlands, April and May 2020. *European Surveillance*, 25(23). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005>.
- Pan, Y., Zhang, D., Yang, P., Poon, L. L. M., & Wang, Q. (2020). Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30113-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30113-4)
- Pastrian-Soto, G. (2020). Genetic and Molecular Basis of COVID-19 (SARS-CoV-2) Mechanisms of Pathogenesis and Immune. *International Journal of Odontostomatology*, 14(3), 7–331. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300331>
- Patterson, E. I., Elia, G., Grassi, A., Giordano, A., Desario, C., Medardo, M., Smith, S. L., Anderson, E. R., Prince, T., Patterson, G. T., Lorusso, E., Lucente, M. S., Lanave, G., Lauzi, S., Bonfanti, U., Stranieri, A., Martella, V., Solari Basano, F., Barrs, V. R., ... Decaro, N. (2020). Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy. *Nature Communications*, 11(1), 6231. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20097-0>
- Rabaan, A. A., Al-Ahmed, S. H., Haque, S., Sah, R., Tiwari, R., Malik, Y. S., Kuldeep, D. de, Yattoo, I., Bonilla, K., & Rodríguez, A. (2020). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: a comparative overview. *Le Infezione En Medicina*, 28(2), 174–184.
- Reusken, C., Haagmans, B., Muller, M., Gutiérrez, C., Godeke, G., Meyer, B., Muth, D., Raj, V., Smits-De Vries, L., & Corman, V. (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus serum antibody neutralization in dromedary camels: a comparative serological study. *Lancet*, 13, 859–866.
- Rikhtegaran, Z., Saadat, S., Saleh, E., Ouyang, X., Constantino, N., DeVico, A. L., Harris, A. D., Lewis, G. K., Kottlil, S., & Sajadi, M. M. (2020). Performance of nucleocapsid and spikebased SARS-CoV-2 serologic assays. *PLoS ONE*, 15(11). <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237828>

- Rodriguez-Morales, A. J., Dhama, K., Sharun, K., Tiwari, R., & Bonilla-Aldana, D. K. (2020). Susceptibility of felids to coronaviruses. *The Veterinary Record*, 186(17). <https://doi.org/10.1136/vr.m1671>. Epub 2020 May 11.
- Ruiz-Bravo, A., & Jimenez-Valera, M. (2020). SARS-CoV-2 and acute respiratory síndrome pandemic (COVID-19). *Ars Pharmaceutica*, 61(2), 63–79.
- Salajegheh Tazerji, S., Gharieb, R., Ardestani, M. M., Akhtardanesh, B., Kabir, F., Vazir, B., Duarte, P. M., Saberi, N., Khaksar, E., Haerian, S., & Fawzy, M. (2024). The risk of pet animals in spreading severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and public health importance: An updated review. *Veterinary Medicine and Science*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/vms3.1320>
- Santaniello, A., Perruolo, G., Cristiano, S., Agognon, A. L., Cabaro, S., Amato, A., Dipineto, L., Borrelli, L., Formisano, P., Fioretti, A., & Oriente, F. (2023). SARS-CoV-2 Affects Both Humans and Animals: What Is the Potential Transmission Risk? A Literature Review. *Microorganisms*, 11(2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020514>
- Sentarse, T. H., Brackman, C. J., Ming, P., Tam, K. W., Pierra, L., Para, E. M., Yu, V. Y., Sims, L. D., Tsang, D. N., Chu, D. K., Perera, R. A., Poon, leo Im, & Peiris, M. (2020). Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature*, 586(7831), 776–778. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2334-5>.
- Shi, J., WEN, H., ZHONG, G., YANG, H., WANG, C., HUANG, B., RENQIANG, L. S., OBU, Z., & LEI, X. H. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs and other domestic animals to SARS-coronavirus 2. *Science*, 368(6494), 1016–1020. <https://doi.org/10.1126/ciencia.abb7015>
- Song, Z., Xu, Y., Bao, L., Zhang, L., Yu, P., Qu, Y., Zhu, H., Zhao, W., Han, Y., & Qin, C. (2019). From SARS to MERS, Thrusting Coronaviruses into the Spotlight. *Viruses*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/v11010059>
- Srinivasan, S., Cui, H., Gao, Z., Liu, M., Lu, S., Narykovl Oleksandr Mkandawire, W., & Korkin, D. (2020). Structural Genomics of SARS-CoV-2 Indicates Evolutionary Conserved Functional Regions of Viral Proteins. *Viruses*, 12(4), 360. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/v12040360>
- Stouta, A. E., Andréa, N. M., Jaimesa, J. A., Milletb, J. K., & Whittaker, G. R. (2020). Coronaviruses in cats and other companion animals: Where does SARS-CoV_2/COVID-19 fit? *Veterinary Microbiology*, 247.
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trend in Microbiology*, 24(6), 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
- Sule, R., Rivera, G., & Gomes, A. V. (2023). Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol and problems. *BioTechniques*, 75(3), 99–114. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0034>
- Tan, W., Zhao, X., Ma, X., Wang, W., Niu, P., Xu, W., Gao, G. F., & Wu, G. (2020). A Novel

Coronavirus Genome Identified in a Cluster of Pneumonia Cases — Wuhan, China 2019–2020. *China CDC Weekly*, 2(4), 61–62. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.017>

The COVID-19 Research Team. (2020). Clinical and virologic characteristics of the first 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States. *Natural Medicine*, 26, 861–868. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0877-5>

Vlasova, A. N., Zhang, X., Hasoksuz, M., Nagesha, H. S., Haynes, L. M., Fang, Y., Lu, S., & Saif, L. J. (2007). Two-way antigenic cross-reactivity between severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and group 1 animal CoVs is mediated through an antigenic site in the N-terminal region of the SARS-CoV nucleoprotein. *Journal of Virology*, 81(24), 13365–13377. <https://doi.org/10.1128/JVI.01169-07>

Wang, W., Tang, J., & Wei, F. (2020). Updated understanding of the outbreak of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in Wuhan, China. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 441–447. <https://doi.org/10.1002/jmv.25689>

WHO. (2020). *WHO Director-General's Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19*. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-openingremarks-at-the-media-briefing-on-covid-19-11-march-2020>

WOAH. (2023). *SARS-COV-2 IN ANIMALS – SITUATION REPORT 22*. <https://www.woah.org/app/uploads/2023/07/sars-cov-2-situation-report-22.pdf>

Wong, C. K., LAM, C. W. K., WU, A. K. L., IP, W. K., LEE, N. L. S., CHAN, I. H. S., LIT, L. C. W., HUI, D. S. C., CHAN, M. H. M., CHUNG, S. S. C., & SUNG, J. J. Y. (2004). Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clinical and Experimental Immunology*, 136(1), 95–103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02415.x>

World Health Organization. (2004). *WHO Guidelines for the Global Surveillance of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)*. Updated Recommendations. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/mers-cov/en/>

Xia, J., Tong, J., Liu, M., Shen, Y., & Guo, D. (2020). Evaluation of coronavirus in tears and conjunctival secretions of patients with SARS-CoV-2 infection. *Journal of Medical Virology*, 92, 589–594. <https://doi.org/10.1002/jmv.25725>

Xu, H., Zhong, L., Deng, J., Peng, J., Dan, H., Zeng, X., Li, T., & Chen, Q. M. (2020). High expression of ACE2 receptor of 2019nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *International Journal of Oral Science*, 12(8). <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>

Yoshimoto, F. K. (2020). The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *Proteins Diary*, 39, 198–216. <https://doi.org/10.1007%2Fs10930-020-09901-4>

Yu, I. T. S., Li, Hy., Wong, T. W., Tam, W., Chan, A. T., Lee, J. H. W., Leung, D. Y. C., & Ho, T. (2004). Evidence of Airborne Transmission of the Severe Acute Respiratory Syndrome Virus. *The New England Journal of Medicine*, 350(17), 1731–1739.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa032867>

- Zhang, Q., Zhang, H., Huang, K., Yang, Y., Hui, X., Gao, J., El, X., Li, C., Gong, W., Zhang, Y., Peng, C., Gao, X., Chen, H., Zou, Z., Shi, Z., & Jin, M. (2020). SARS-CoV-2 neutralizing serum antibodies in cats: a serological investigation. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.01.021196>
- Zhao, S., Schuurman, N., Li, W., Wang, C., Smit, L. A. M., Broens, E. M., Wagenaar, J. A., van Kuppeveld, F. J. M., Bosch, B.-J., & Egberink, H. (2021). Serologic Screening of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection in Cats and Dogs during First Coronavirus Disease Wave, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 27(5), 1362–1370. <https://doi.org/10.3201/eid2705.204055>
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B. Z., Zhang, L., Si, W. H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., Xiao-Shuang Zheng^{1, 3}, Kai Zhao^{1, 3}, Q.-J. C., ... Sh, & Z.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Weifeng Shi, Ph.D., Roujian Lu, M.D., Peihua Niu, Ph.D., Faxian Zhan, P. D., Xuejun Ma, Ph.D., Dayan Wang, Ph.D., Wenbo Xu, M.D., Guizhen Wu, M. D., & George F. Gao, D.Phil., and W. T. (2019). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- Zumla, A., Hui, D. S., & Perlman, S. (2015). Middle East Respiratory Syndrome. *The Lancet*, 386(9997), 995–1007. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60454-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60454-8)

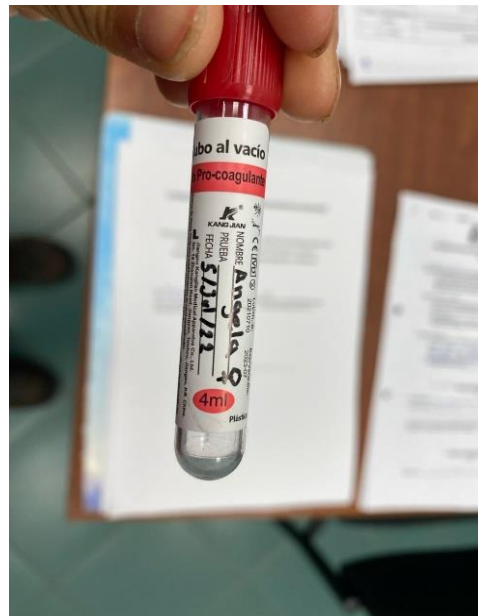
Anexos

Fotografía 1: Toma de muestra sanguínea en especie felina.



Fuente: Autora

Fotografía 2: Recolección de muestras sanguíneas.



Fuente: Autora

Fotografía 3: Sueros sanguíneos de antes y después de la pandemia.



Fuente: Autora

Fotografía 4: Purificación de proteína por IMAC y actividad de Sortasa A.



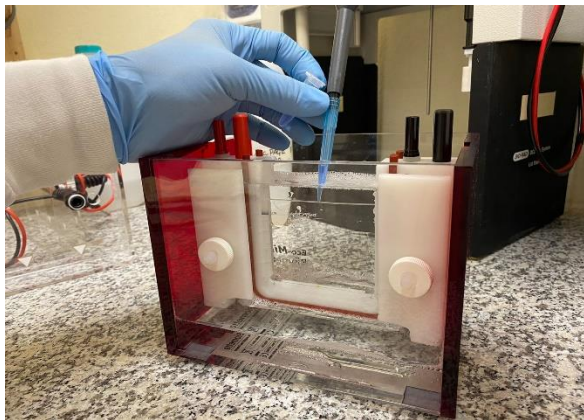
Fuente: Autora



Fotografía 5: péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹) de la nucleoproteína del Virus SARS-CoV-2.

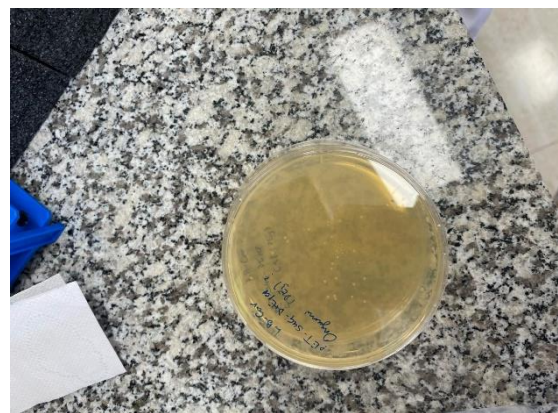
Fuente: Autora

Fotografía 6: Electrotransferencia del péptido mediante SDS-PAGE.



Fuente: Autora

Fotografía 7: Péptido recombinante en modelo de expresión bacteriano.



Fuente: Autora

Fotografía 8: Bandas teñidas con azul de comassie como marcador de peso molecular del péptido D+E (L²³⁰-A⁴¹⁹)



Fuente: Autora

Fotografía 9: Tiras para la detección del reconocimiento de las proteínas recombinantes por los anticuerpos presentes en sueros pre y post-pandemia



Fuente: Autora

Fotografía 10: Lectura de los pocillos analizados mediante ELISA indirecto.

Fuente: Autora

