



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Detección molecular de Coronavirus en primates no
humanos incautados y hallados por el Servicio
Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) en
Lima, Perú, 2020-2021**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo, Microbióloga,
Parasitóloga

AUTOR

Carol Alexandra SÁNCHEZ CHICANA

ASESORES

Dr. Juan Atilio JIMÉNEZ CHUNGA

Dr. Luis Antonio GÓMEZ PUERTA (Coasesor)

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sánchez, C. (2023). *Detección molecular de Coronavirus en primates no humanos incautados y hallados por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) en Lima, Perú, 2020-2021*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Carol Alexandra Sánchez Chicana
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	73085287
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4886-2390
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Juan Atilio Jiménez Chunga
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06281952
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-0128-3028
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Luis Antonio Gómez Puerta
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10810335
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-7909-979X
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Miguel Angel Francisco Talledo Rivera
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25625144
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Priscilla Rosse Mamani Zapana

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43058540
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Oscar Diego Evangelista Vargas
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	46626302
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.3.1. Salud Pública B.1.4.1. Zoonosis
Grupo de investigación	Ateneo Abocado a Responder Amenazas y Oportunidades del Sector Pecuario (ATENEO)
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa De Proyectos De Investigación Multidisciplinarios 2020. RR-N.º016238-2020; Código A2008006m
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Epidemiología y Economía Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Latitud: -12.0815915 Longitud: -76.9877331
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2020 - 2022
URL de disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.00 Salud pública, Salud ambiental https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.05



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA
MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA**

(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN PRESENCIAL DE TESIS)

Siendo a las *12:03* horas del 15 de junio del 2023, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **CAROL ALEXANDRA SÁNCHEZ CHICANA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20230021022, la titulando expuso su tesis: **DETECCIÓN MOLECULAR DE CORONAVIRUS EN PRIMATES NO HUMANOS INCAUTADOS Y HALLADOS POR EL SERVICIO NACIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE (SERFOR) EN LIMA, PERÚ, 2020-2021**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota *19* calificado: *Aprobado con máximos honores.*

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **CAROL ALEXANDRA SÁNCHEZ CHICANA** y se eleva lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título conforme a ley.

Siendo las *13:20* horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 15 de junio de 2023.

Mg. MIGUEL ANGEL TALLEDO RIVERA
(PRESIDENTE)

Dr. JUAN ATILIO JIMENEZ CHUNGA
(ASESOR)

Mg. PRISCILA ROSSE MAMANI ZAPANA
(MIEMBRO)

Mg. OSCAR DIEGO EVANGELISTA VARGAS
(MIEMBRO)



INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

DIRECTOR E.P DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA	: Dr. TITO LIBIO SÁNCHEZ ROJAS
OPERADOR DEL PROGRAMA INFORMÁTICO DE SIMILITUDES	: Dra. Liz Erika Cruz Pio
DOCUMENTO EVALUADO *	: Detección molecular de Coronavirus en primates no humanos incautados y hallados por el Servicio Nacional Forestal y Fauna Silvestre (SERFOR) en Lima, Perú, 2020-2021
AUTOR (A) DEL DOCUMENTO **	: Bach. Carol Alexandra Sánchez Chicana
FECHA DE RECEPCIÓN	: 21/05/23
FECHA APLICACIÓN DEL SISTEMA INFORMÁTICO	: 21/05/23
SOFTWARE UTILIZADO	: TURNITIN (X) ITHENTICATE () OTRO (especificar)
CONFIGURACIÓN DEL PROGRAMA DETECTOR DE SIMILITUDES	: Excluye textos encomillados (x) : Excluye bibliografía (x) : Excluye cadenas menores a 40 palabras (x) : Otro criterio (especificar)
PORCENTAJE DE SIMILITUDES ***	: Cinco por ciento (5%)
FUENTES ORIGINALES DE LAS SIMILITUDES ENCONTRADAS	: cybertesis.unmsm.edu.pe (1%) Documentop.com (1%) hdl.handle.net (1%) https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000832822 (< 1%) https://1library.co/document/zgw2genny-diversidad-genetica-filogenia-bacterias-perteneientes-bacillus-tolerantes-laevigata.html?cv=1 (< 1%) HernándezEstiven_2020_EfectoVirucidaVoacangina.pdf (udea.edu.co) (< 1%)
OBSERVACIONES:	
CALIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD	- Documento cumple criterio de originalidad sin observaciones (X) - Documento cumple criterio de originalidad con observaciones () - Documento no cumple criterios de originalidad ()

Ciudad universitaria, 24 de mayo de 2023



Firmado digitalmente por CRUZ PIO
Liz Erika FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 24.05.2023 13:46:35 -05:00

Dra. Liz Erika Cruz Pio
Evaluador



Firmado digitalmente por SANCHEZ
ROJAS Tito Libio FAU 20148092282
soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 24.05.2023 04:26:57 +02:00

Dr. Tito Libio Sánchez Rojas
Director EPMP

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Juan Jiménez por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto y guiarme incondicionalmente a lo largo de mi carrera universitaria.

Al Dr. Luis Gómez por el apoyo desde el inicio de mi tesis, la paciencia en su enseñanza y haberme recibido dentro del laboratorio del Laboratorio de Epidemiología y Economía Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria.

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el financiamiento a través del Programa de Proyecto de Investigación Multidisciplinarios con RR-016238-2020 con código de proyecto A2008006m.

A mi familia, ya que sin su ayuda no hubiera tenido el honor de terminar mis estudios universitarios. Un agradecimiento especial a mi madre Maritza por todo el esfuerzo y sacrificios que ha realizado para siempre darnos lo mejor a mi hermano y a mí.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	1
LISTA DE TABLAS	3
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE ANEXOS	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Introducción.....	8
1.2. Descripción de la realidad problemática	9
1.3. Definición del problema	11
1.4 Objetivos.....	12
1.4.1. Objetivo general:.....	12
1.4.2. Objetivos específicos:	12
1.5. Justificación e importancia de la investigación	12
1.6. Limitaciones de la investigación	13
2. REVISIÓN LITERARIA.....	15
2.1. Marco teórico	15
2.1.1. Estructura	15
2.1.2. Taxonomía y Clasificación	16
2.1.3 Genoma de los coronavirus	19
2.1.4. Rol de los animales en la transmisión de coronavirus	21
2.1.5. Pruebas moleculares	23

2.1.5.1. RT-PCR	23
2.1.5.2. Técnica de PCR “nested” o anidada.....	25
2.1.5.3. PCR “semi-nested” o semianidada.....	26
2.2. Antecedentes del estudio	27
2.3. Bases teóricas	32
2.3.1. Secuenciamiento de ADN.....	32
2.3.2. BLAST.....	32
2.3.3. Árboles filogenéticos.....	33
2.3.4. Método “Neighbor-Joining”	34
2.3.5. Método de Máxima Verosimilitud.....	34
2.4 Definición de categorías de análisis	35
3. HIPÓTESIS Y VARIABLES	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1. Enfoque de la investigación	35
4.2. Tipo de investigación.....	36
4.3. Diseño de investigación.....	36
4.4. Credibilidad de la investigación	36
4.5 Sujetos de estudio.....	36
4.5.1. Material biológico.....	36
4.6. Procedimientos. Técnicas e instrumentos de recolección de información	36
4.6.1. Extracción de ARN.....	36
4.6.2. RT-PCR	37

4.6.3. PCR anidada.....	37
4.6.4. Electroforesis	38
4.6.5. Secuenciamiento	38
4.6.6. Comité de ética	38
4.7 Análisis de datos.....	38
5. RESULTADOS	39
5.1. Identificación de las especies de primates no humanos que actúan como reservorios para el SARS-CoV-2 y otros Betacoronavirus y Alfacoronavirus.	39
5.2. Detección de los coronavirus aislados a partir de hisopado traqueal y rectal de primates no humanos incautados por el SERFOR durante 2020-2021 en Lima, Perú.	41
5.3. Relaciones filogenéticas de los coronavirus identificados en primates no humanos incautados por el SERFOR en Lima, Perú.....	45
6. DISCUSIÓN.....	49
7. CONCLUSIONES	55
8. RECOMENDACIONES.....	56
9. BIBLIOGRAFÍA.....	57
ANEXOS	73

ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario

ARNss: virus ARN monocatenario positivo

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BCoV: coronavirus bovino

BtCoV: coronavirus del murciélago *Rousettus*

CamelCoV: Alfacoronavirus del camello

CCoV: coronavirus canino

COVID-19: enfermedad por coronavirus SARS-CoV-2

dNTPs: desoxirribonucleótido trifosfato

DCCoV: coronavirus del camello dromedario

FCoV: coronavirus felino

FECV: coronavirus entérico felino

FIPV: virus de la peritonitis infecciosa felina

FPIV: virus de la peritonitis infecciosa felina

HCoV: coronavirus Humano

MCoV: coronavirus del visón

MERS-CoV: coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio

ML: maximum likelihood o máxima verosimilitud

NJ: Neighbor Joining

Nsp: proteínas no estructurales

PDCoV: Deltacoronavirus del porcino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEDV: virus de la diarrea epidémica porcina

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

SADS-CoV: coronavirus del síndrome de diarrea aguda porcina

SARS-CoV: coronavirus relacionado con el síndrome respiratorio agudo severo

SARS-CoV-2: síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2

SERFOR: Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Los Coronavirus y las especies a las que infectan.	18
Tabla 2.	Datos generales del material biológico muestreado.	40
Tabla 3	Identificación de Coronavirus mediante el uso de base de datos GenBank.	42

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Morfología de los coronavirus	16
Figura 2. Relaciones filogenéticas en la subfamilia Coronavirinae	18
Figura 3. Esquema de la evolución de los coronavirus	22
Figura 4. Proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	25
Figura 5. Diagrama general de PCR “ <i>nested</i> ” o anidada	26
Figura 6. Comparación entre las técnicas de PCR anidada y PCR semianidada.	27
Figura 7. Corrida electroforética de productos de PCR.	41
Figura 8. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas PEDV (78-2021), PEDV (84-2021), PEDV (92-2021), PEDV (20-2020) y PEDV (22-2020) con secuencias del GenBank.	43
Figura 9. Alineamiento de la secuencia nucleotídica FCoV (23-2020) con secuencias del GenBank.	44
Figura 10. Relaciones evolutivas de los taxones mediante el método “ <i>Neighbor-Joining</i> ”	46
Figura 11. Análisis evolutivo por el método de Máxima Verosimilitud	48

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Protocolo para la extracción de ARN con el “ <i>kit</i> ” Purelink Viral RNA/DNA	74
Anexo 2. Características y resultados de los 54 primates muestreados	76
Anexo 3. Lista de secuencias empleadas para construir la filogenia	82
Anexo 4. Espécimen de <i>Saimiri</i> sp. colectado del SERFOR	84
Anexo 5. Espécimen de <i>Cebus</i> sp. colectado del SERFOR	85
Anexo 6. Constancia de Autorización Ética de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos	86

RESUMEN

Los Coronavirus reúnen a un gran número de virus de animales y humanos con una amplia variedad de hospedadores. En los últimos años, han supuesto una amenaza global para la salud pública. El tráfico ilegal de fauna silvestre es uno de los factores que impulsa la aparición de enfermedades emergentes en nuevas regiones de población humana y en animales susceptibles. El trabajo de investigación tuvo como objetivo detectar Coronavirus en los primates no humanos incautados por el SERFOR (Servicio Nacional de Forestal y de Fauna Silvestre) en 2020-2021 a partir de hisopados traqueales y rectales mediante RT-PCR y PCR para amplificar el gen ORF1. Los resultados obtenidos fueron que en ningún hisopado rectal se detectaron coronavirus. En cambio, los primates no humanos: *Cebus* sp. (n=3), *Saimiri sciureus* (n=2) y *Aotus* sp. (n=1) fueron positivos para coronavirus en los hisopados traqueales. Al comparar las secuencias nucleotídicas con la base de datos del GenBank se comprobó que pertenecían al género Alfacoronavirus, uno de ellos compartía una similitud de 98.01% con el virus de la diarrea epidémica del porcino (PEDV) y el otro, un 95.52% con el virus felino (FCoV). Esto representa el primer reporte de primates no humanos infectados con estos Alfacoronavirus y, por ende, el papel de estos animales como nuevos portadores. Es esencial vigilar y tomar medidas preventivas para proteger la salud de estos primates no humanos, animales domésticos y seres humanos, ya que los coronavirus tienen una gran capacidad infecciosa y es posible que esto conlleve a enfermedades infecciosas emergentes o con potencial zoonótico.

Palabras claves: coronavirus, primates, zoonosis, PCR, tráfico ilegal de fauna silvestre, Alfacoronavirus

ABSTRACT

Coronaviruses gather a substantial number of animal and human viruses with a wide range of hosts. In the past few years, they have represented a global threat to public health. Illegal wildlife trade is a driving cause of the outbreak of emerging diseases in new regions of the human population and susceptible animals. The aim of the investigation was to detect Coronavirus in non-human primates collected by SERFOR (National Forestry and Wildlife Service) in 2020-2021 from tracheal and rectal swabs, using RT-PCR and PCR to amplify the ORF1 gene. The results showed that no coronavirus was detected in any rectal swab. In contrast, non-human primates: *Cebus* sp. (n=3), *Saimiri sciureus* (n=2) and *Aotus* sp. (n=1) were positive for coronavirus in tracheal swabs. A comparison of these nucleotide sequences with the GenBank database showed indicated that they belonged to the genus Alphacoronavirus, the first one shared 98.01% similarity to porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and the second shared 95.52% similarity to feline coronavirus (FCoV). This is the first report of non-human primates infected with these Alphacoronaviruses and therefore, the role of these animals acting as new hosts. It is critical to be vigilant and adopt preventive measures to safeguard the health of these non-human primates, domestic animals, and humans, due to the fact that coronaviruses have a high infectious capacity and can lead to emerging infectious diseases or with zoonotic potential.

Keywords: coronavirus, primates, zoonosis, PCR, illegal wildlife trade, Alfacoronavirus

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción

Los coronavirus (CoV) son una familia de virus tipo ARN (ARN ss+) que atacan a humanos y animales y causan principalmente enfermedades respiratorias o entéricas por lo que son de importancia médica y veterinaria. Los Coronavirus emergen cada cierto tiempo y de modo imprevisible, se propagan con facilidad y provocan enfermedades infecciosas graves, con lo que se constituyen en una permanente amenaza para la salud humana (Masters, 2006).

Tras el brote de síndrome respiratorio agudo severo (SARS) ocurrido en 2002 y 2003 en China, el coronavirus ha pasado a ser un potencial patógeno humano (Drosten *et al.*, 2003; Ksiazek *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2003). El SARS lo provoca un Betacoronavirus altamente patógeno y transmisible. Aparentemente, este coronavirus se originó en los murciélagos y se extendió a los humanos desde la provincia de Guangdong, en China. Al causar una enfermedad respiratoria grave en humanos, el virus adquirió el nombre de SARS-CoV (Ksiazek *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003). Después, para 2012, otro coronavirus se transmitió desde los camellos a los humanos en Arabia Saudita, y produjo una enfermedad similar al SARS que tomó el nombre de MERS-CoV (Assiri *et al.*, 2013; Zaki *et al.*, 2012). A partir de la emergencia de estas enfermedades, varios estudios han contribuido sobre la biología de los coronavirus y su transmisión de animales a humanos. En estos estudios se ha llegado a la conclusión de que animales salvajes tales como los murciélagos son los mayores reservorios de coronavirus (Lau *et al.*, 2013; Woo *et al.*, 2009; Woo *et al.*, 2012; Yuen *et al.*, 2012).

Por su parte, los mamíferos silvestres son importantes hospedadores intermediarios. Dentro de ellos el virus se desarrolla, facilitando su transmisión del hospedador natural al ser humano. No sólo los coronavirus transmitidos por murciélagos causan infecciones en humanos, los propios animales domésticos o salvajes se pueden

infectar por estos virus, pudiendo sufrir alguna enfermedad, o actuar como hospedadores intermediarios o reservorios (Huang *et al.*, 2013; Simas *et al.*, 2015).

La diversidad de animales silvestres en el Perú está entre las más abundantes del mundo y, por desgracia, el tráfico ilegal de muchas especies silvestres es una práctica frecuente en todo el territorio nacional (Daut *et al.*, 2016). El tráfico de fauna silvestre se encuentra entre los comercios ilícitos más lucrativos del mundo e implica la captura, la caza furtiva y el contrabando (South y Wyatt, 2011). Por lo tanto, en este lugar podrían darse brotes de coronavirus en especies nunca detectadas y el virus podría transmitirse de una especie a otra debido al alto grado de contacto, por la estrecha interacción de los animales salvajes con los domésticos y los humanos.

Por lo expuesto, la finalidad de este trabajo es detectar Coronavirus en los primates no humanos incautados por el SERFOR ATFFS-Lima (Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre-Administraciones Técnicas Forestal y de Fauna Silvestre) durante el periodo 2020-2021 utilizando la técnica de RT-PCR y PCR anidada para la amplificación del gen ORF1 que codifica a la proteína ARN polimerasa ARN-dependiente (RdRp). Las muestras PCR-positivas se secuenciaron y se compararon con la base de datos del GenBank para identificar el virus.

1.2. Descripción de la realidad problemática

El tráfico de vida silvestre se encuentra en el tercer lugar de negocios ilícitos más rentables del mundo, puesto que repercute en la biodiversidad, en la introducción de especies exóticas y es un riesgo para la salud pública debido a la transmisión de enfermedades zoonóticas (Bezerra *et al.*, 2021). Los puntos críticos en los que es más evidente la comercialización ilegal de animales silvestres son los mercados (Nijman, 2021). Estos lugares se caracterizan por tener malas prácticas de manipulación y mantenimiento de animales silvestres. Algunos ejemplos de condiciones críticas son el hacinamiento, la falta de lavado de manos, la venta indiscriminada con otros productos

frescos y estructuras no desinfectadas, la falta de alimento y agua, la aglomeración de animales en ambientes y jaulas demasiado pequeñas, así como la mezcla de especies domésticas con silvestres nativas y exóticas en una misma jaula (Bezerra *et al.*, 2021). Según el SERFOR (2017), en estos lugares entre los mamíferos, predomina la venta de los primates no humanos, como *Sciurus stramineus*, *Saimiri macrodon*, *Leontocebus fuscicollis*, y *Cebuella pygmaea* (Mendoza y Murillo, 2015). La captura y transporte también se da en condiciones que no alcanzan estándares mínimos de bioseguridad y bienestar animal, lo que conlleva a que estos animales transporten consigo potenciales patógenos que pueden ser introducidos a nuevas áreas geográficas. De esta manera, el tráfico de fauna silvestre podría estar funcionando como un impulsor de enfermedades emergentes en nuevas regiones con población humana y animales susceptibles (SERFOR, 2017).

En definitiva, las enfermedades infecciosas emergentes representan una gran amenaza para la salud humana, de estas aproximadamente el 75% son zoonóticas y dentro de este tipo, el 71.8% tienen su origen en animales silvestres (Hilderink y De Winter, 2021). En animales, las infecciones por coronavirus están vinculadas con enfermedades respiratorias y entéricas, teniendo un impacto económico en la industria ganadera. Un ejemplo de estos son el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) que ocasiona síntomas gastrointestinales en porcino y el coronavirus bovino que causa tanto diarrea como enfermedades respiratorias. En el hombre, las infecciones son en su mayoría respiratorias y también impactan sobre la economía dado que disminuyen la productividad del personal (Jonsdottir y Dijkman, 2016).

Aquí se puede incluir a la enfermedad COVID-19, causada por el virus SARS-CoV-2, cuyo origen se propone que tuvo lugar en el mercado de Wuhan, China, donde mapaches, serpientes, murciélagos, puercoespines, primates, entre otros estaban en contacto directo con vendedores y consumidores (Ortiz, 2020). Por consiguiente, el virus probablemente se propagó a los humanos a través de un hospedero intermedio

desconocido que podría ser el pangolín, debido a que se ha encontrado que el coronavirus del pangolín tiene un 91% de similitud con el SARS-CoV-2 y con el coronavirus del murciélago RaTG13 (Doody *et al.*, 2021; Hilderink y De Winter, 2021; Ortiz, 2020). De igual manera, se ha demostrado que todas las infecciones humanas por coronavirus humanos conocidos son de carácter zoonótico; mientras que, los coronavirus animales resultan ser epidemiológicamente perjudiciales para la salud a causa de su gran capacidad de transmisión entre especies y de su replicación y recombinación (Donnik *et al.*, 2021).

Por lo tanto, los animales silvestres juegan un papel importante en la transmisión de enfermedades como las causadas por los coronavirus. Muchos de estos animales pueden ser reservorios u hospederos intermediarios que al estar en contacto con personas pueden significar un riesgo para la salud.

1.3. Definición del problema

El tráfico ilegal mantiene un estrecho vínculo entre los animales, sean domésticos o salvajes, y las personas, en particular en los almacenes y lugares en que se comercializan, como los mercados. La participación de los animales silvestres, como los primates no humanos, es evidente en la propagación de los coronavirus; por ejemplo, SARS-CoV o MERS-CoV, más aún cuando nuestro país cuenta con una extraordinaria diversidad de especies animales que motiva el comercio ilegal de fauna silvestre, constituyendo un serio problema. Por tanto, esta actividad es un factor clave que impulsa la aparición de enfermedades infecciosas y puede conducir a la circulación a través de grandes distancias y la emergencia de virus en áreas diferentes a las de su entorno habitual, siendo introducidos a partir de la fauna que es transportada inadvertidamente (Daszak *et al.*, 2007).

Ello conduce a plantear las siguientes preguntas de investigación: ¿Son los primates no humanos incautados en el tráfico ilegal por SERFOR-ATFFS-Lima durante

2020-2021 posibles reservorios de coronavirus? ¿Cuáles son los coronavirus que están presentes en los primates no humanos incautados por el SERFOR-ATFFS-Lima?

1.4 Objetivos

1.4.1. Objetivo general:

- Determinar la ocurrencia de Coronavirus en primates no humanos incautados por el Servicio Nacional de Flora y Fauna (SERFOR) en Lima, Perú durante 2020-2021 en Lima, Perú.

1.4.2. Objetivos específicos:

- Identificar las especies de primates no humanos incautados por el SERFOR en Lima, Perú durante 2020-2021 que actúan como reservorios para coronavirus mediante hisopados traqueal y rectal usando RT-PCR y PCR anidada.
- Detectar mediante RT-PCR y PCR anidada los coronavirus aislados a partir de hisopado traqueal y rectal de primates no humanos incautados por el SERFOR durante 2020-2021 en Lima, Perú.
- Determinar las relaciones filogenéticas de los coronavirus identificados en primates no humanos incautados por el SERFOR durante 2020-2021 en Lima, Perú.

1.5. Justificación e importancia de la investigación

En nuestro país, en el periodo 2009-2012 se han decomisado alrededor de 13 033 animales vivos, y solamente en el año 2014, se incautaron cerca de 4 000 especímenes (SERFOR, 2017). Por otra parte, los coronavirus son patógenos de gran importancia para los humanos y vertebrados, ya que pueden infectar el sistema respiratorio, gastrointestinal, hepático y nervioso central de humanos, animales silvestres que son traficados ilegalmente como aves, camellos, primates, murciélagos, ratones, y animales domésticos como perros y gatos (Costagliola *et al.*, 2021). Es así como las enfermedades zoonóticas afectan a nivel de salud, social y económico. Tal es

el caso del costo de controlar la transmisión de nuevos patógenos zoonóticos de la vida silvestre a los humanos en los bosques tropicales, que sería entre 22 200 - 30 700 millones de dólares anuales en todo el mundo. Asimismo, en el 2003 el SARS impactó en la economía global por un monto de 40 000 millones de dólares; en tanto que, es probable que debido a la pandemia de COVID-19, la economía mundial pierda entre 8.1 y 15.8 billones de dólares en tratamiento, desarrollo de vacunas y enfoques reactivos para controlar y erradicar la enfermedad; sin embargo, las estrategias globales para prevenir pandemias son mucho más baratas (Rush *et al.*, 2021).

Para actuar rápidamente frente a la aparición de brotes de emergencia, es necesario describir los coronavirus que circulan en animales silvestres. Además, el identificar los tipos de coronavirus presentes en estos animales, puede ser útil para estudios futuros sobre vigilancia epidemiológica del coronavirus. Al conocer las posibles especies de primates no humanos incautados que actúan como reservorios en el Perú de Beta y Alfacoronavirus, se podrá comprender el posible papel en la transmisión de enfermedades zoonóticas por estos virus y establecer medidas preventivas. Por otro lado, las secuencias genómicas obtenidas en este trabajo pueden contribuir en la creación de un banco de datos abierto a nivel molecular. Así mismo, la información genómica y las herramientas epidemiológicas podrán ayudar a dilucidar la dinámica de la transmisión y evolución de estos virus, y así tomar decisiones rápidas (Romero *et al.*, 2021).

1.6. Limitaciones de la investigación

Una de las limitantes del trabajo consiste en que solo se evaluó la detección en los primates no humanos que fueron incautados en Lima, mas no en otras regiones. Para seguir un muestreo estratégico se puede acudir a un mapa de rutas de tráfico de fauna como el de Salazar (2022). Aquí se pueden incluir a ciudades como Chiclayo, Pucallpa, Moyobamba, Puerto Maldonado, entre otros.

De igual manera, el bajo tamaño de la muestra puede ser una limitante. No obstante, hay que destacar que el número de estos primates no humanos que son incautados por el SERFOR no es un número alto por sí mismo.

2. REVISIÓN LITERARIA

2.1. Marco teórico

2.1.1. Estructura

Los coronavirus son una familia de virus ARN monocatenario de sentido positivo (ARNss+) cuyo tamaño es de aproximadamente 125 nm de diámetro y longitud del genoma lineal se encuentra entre 26 y 32 kb (Wang *et al.*, 2020). Dentro de su estructura cuenta con proteínas en forma de proyecciones conocidas como espigas o “*Spike*” (S) que asemejan a una corona. En la envoltura del virus abunda la proteína de membrana (M) que ayuda y fortalece la forma que adopta el virión. Por otro lado, la nucleocápside (N) tubular con simetría helicoidal interactúa con el material genético viral para formar ribonucleoproteínas y eventualmente empaquetar el genoma viral dentro de la cápside. La proteína de cubierta (E) se encarga del ensamblaje, liberación de los viriones, pero en algunos coronavirus puede participar en la patogénesis como en SARS-CoV. Solo en un grupo de los Betacoronavirus se halla la hemaglutinina esterasa (HE) cuya actividad acetil esterasa mejora la entrada de células mediada por proteína S y la propagación viral a través de la mucosa (Beig *et al.*, 2021; Asrani *et al.*, 2020).

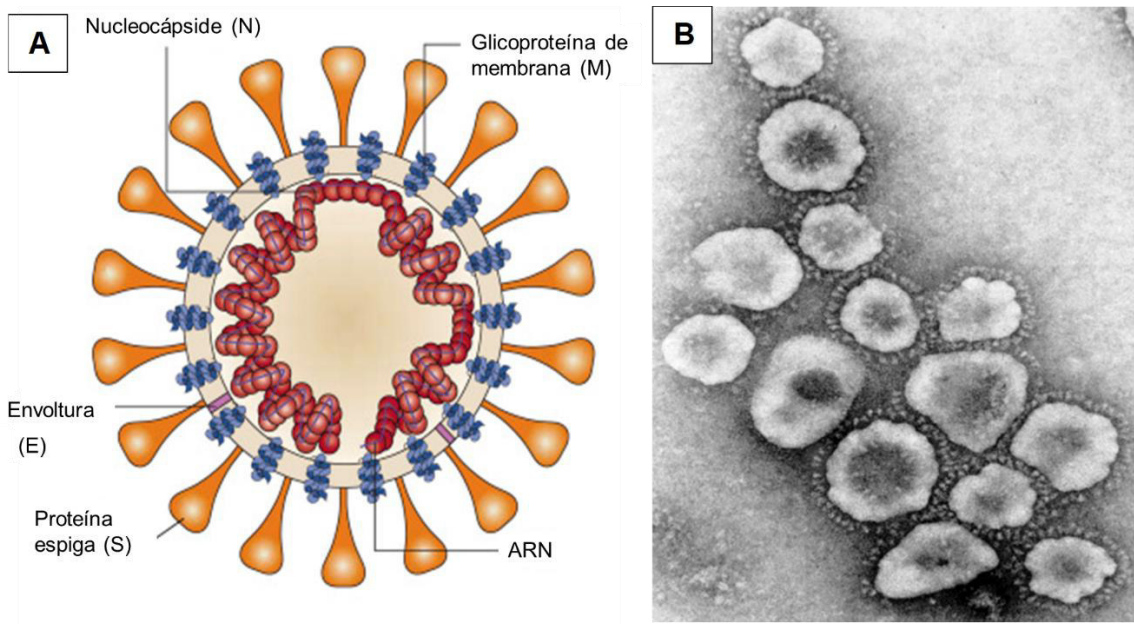


Figura 1. Morfología de los coronavirus. (A) Esquema de estructura de virión de coronavirus y sus proteínas estructurales, muestra las glicoproteínas de espiga, envoltura y membrana ancladas a la bicapa lipídica y la nucleocápside superenrollada que se une al ARN genómico. (B) Microscopía electrónica de contraste negativo de SARS-CoV, denota las proyecciones superficiales en forma de picos o espigas (Modificado de Burrel *et al.*, 2017).

2.1.2. Taxonomía y Clasificación

Orden Nidovirales

Suborden Cornidovirineae

Familia Coronaviridae

Subfamilia Orthocoronavirinae

Anteriormente, los coronavirus eran clasificados tradicionalmente en tres grupos. El primer y segundo grupo correspondían a aquellos que infectan a mamíferos y el tercer grupo a aquellos coronavirus aviáres. El Comité Internacional de Taxonomía de Virus propuso la clasificación en los siguientes géneros: Alfacoronavirus, Betacoronavirus, Deltacoronavirus y Gammacoronavirus (ICTV, 2009) (Figura 2). Dentro del orden

Nidovirales, el suborden Coronidovirineae contiene la mayor cantidad de virus epidémicos. La familia Coronaviridae alberga a la subfamilia Orthocoronaviridae con cuatro géneros Alfacoronavirus (14 subgéneros y 19 especies), Betacoronavirus (5 subgéneros y 14 especies), Deltacoronavirus (3 subgéneros y 7 especies) y Gammacoronavirus (3 subgéneros y 5 especies) (Zhou *et al.*, 2021).

Los Alfa y Betacoronavirus infectan solo a mamíferos y en humanos causan enfermedades respiratorias agudas con síntomas leves de resfriado; mientras que, en animales provocan gastroenteritis. Además, estos dos géneros pueden constituyen una amenaza para el ganado, aquí destacan el virus de la diarrea entérica porcina (PEDV) y el coronavirus del síndrome de diarrea aguda porcina (SADS-CoV) (Cui *et al.*, 2019; Kirichenko *et al.*, 2022). Los Betacoronavirus incluyen a los Embecovirus (antiguo subgénero A), Sarbecovirus (antiguo subgénero B), Merbecovirus (antiguo subgénero C), Nobecovirus (antiguo subgénero D) y el subgénero Hibecovirus (Li *et al.*, 2019).

En cuanto a los Gamma y Deltacoronavirus, estos infectan una gran variedad de aves y unos pocos a los mamíferos. Por ejemplo, el Deltacoronavirus porcino (PDCoV) es uno de los patógenos más importantes en los cerdos en los últimos años (Li *et al.*, 2014). Se informó que 3 niños de Haití que presentaban enfermedad febril aguda indiferenciada dieron positivo para Deltacoronavirus porcino (PDCoV), que es el primer reporte de este género en humanos. Considerando la cercanía en la que se encuentran los seres humanos y animales domésticos con los cerdos, es posible la transmisión entre especies de Deltacoronavirus a los humanos (Lednicky *et al.*, 2021).

A parte del porcino, otros mamíferos susceptibles a infección son el gato leopardo asiático y tejón hurón chino. Este género se encuentra bastante disperso en la población aviar incluidos el gorrión, la urraca petirrojo, la garza nocturna, el silbón europeo, el halcón, la paloma, el codorniz, entre otros. Es por ello por lo que las aves pueden servir como reservorio naturales de los Deltacoronavirus donde dan lugar a recombinación genética, además que las aves pueden cumplir el papel de huéspedes

intermedios ya que al migrar de un lugar a otro pueden poner en contacto los virus con humanos y/o animales domésticos (Wang *et al.*, 2021).

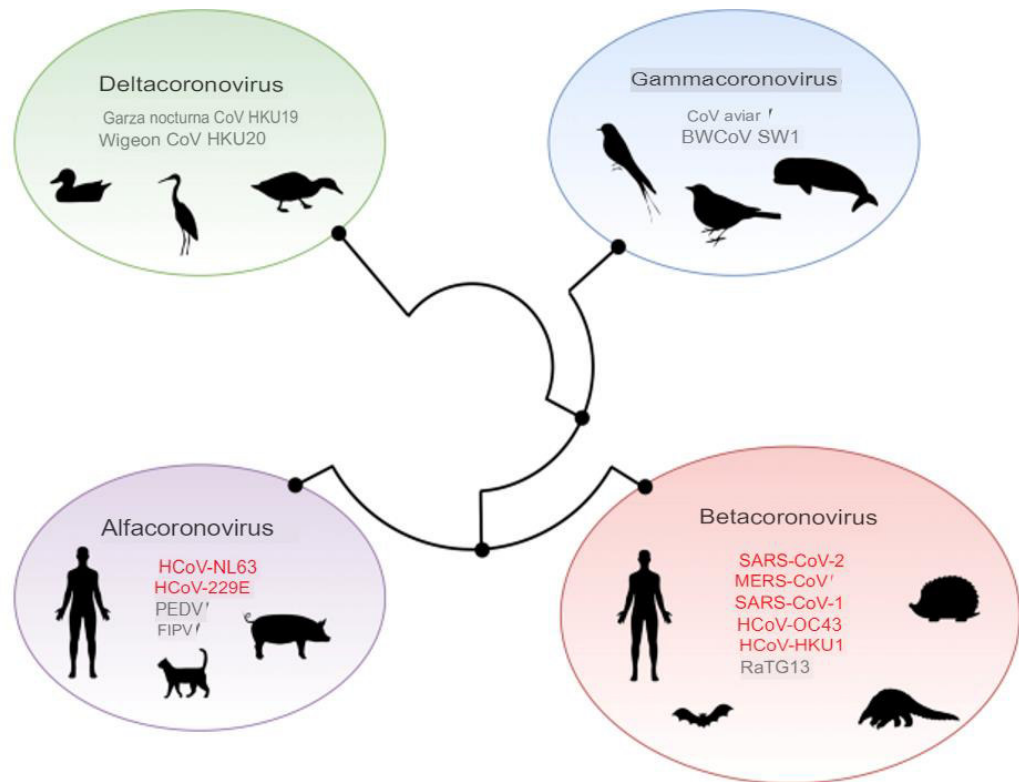


Figura 2. Relaciones filogenéticas en la subfamilia Coronavirinae (Modificado de Singh *et al.*, 2021).

Tabla 1.

Los Coronavirus y las especies que infectan.

Género	Virus	Especies infectadas
	Coronavirus felinos (FCoV) tipos I y II	Gatos (domésticos y salvajes)
	Coronavirus caninos (CCoV) tipos I y II	perros
<i>Alfacoronavirus</i>	Hurón coronavirus (FRECV y FRSCV)	hurones
	Virus de la gastroenteritis transmisible (TEGV)	cerdos
	Coronavirus humano NL63 (HCoV-NL63)	humanos

Género	Virus	Especies infectadas
	Coronavirus humano 229E (HCoV-229E)	humanos
	Diarrea epidémica porcina (PEDV)	cerdos
	Mink coronavirus (MCoV)	visón
	Coronavirus bovino (BCoV)	ganado
	Coronavirus humano OC43 (HCoV-OC43)	humanos
	Coronavirus respiratorio canino (CRCoV)	perros
	Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus (SARS-CoV)	humanos
<i>Betacoronavirus</i>	Síndrome respiratorio por coronavirus de Oriente Medio (MERS-CoV)	humanos
	Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2)	humanos
	Coronavirus equino (ECoV)	caballos
	Coronavirus humano HKU1 (HCoV-HKU1)	humanos
<i>Gammacoronavirus</i>	Virus de la bronquitis infecciosa (IBV)	aves de corral
	Turquía coronavirus	pavos
<i>Deltacoronavirus</i>	Deltacoronavirus porcino (PDCoV)	cerdos

Nota. Datos tomados de Stout *et al.* (2020)

2.1.3 Genoma de los coronavirus

Entre los virus de ARN, los coronavirus tienen los genomas más grandes (hasta 32 kb en el coronavirus de ballena beluga). Este amplio genoma le ha conferido la capacidad de adquirir y mantener genes que codifican distintas proteínas accesorias que pueden facilitar la adaptación del virus a determinados huéspedes (Forni *et al.*, 2017; Mihindukulasuriya *et al.*, 2008). Asimismo, poseen genomas no segmentados con una organización similar. Siguiendo el sentido 5'-3' el orden es el siguiente: dos grandes marcos de lectura abiertos superpuestos (ORF1a y ORF1b) que dan origen a proteínas

no estructurales, y los genes espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleoproteína (N) (Forni *et al.*, 2017).

En los primeros dos tercios del genoma viral se encuentra el ORF1ab que codifican las dos poliproteínas pp1a y pp1ab, las cuales a su vez se cortan en sitios de escisión consenso por proteasas auto codificadas en 16 proteínas no estructurales (nsps) conocidas como nsp1-nsp16 que participan en la replicación del genoma. Parte de estas proteínas no estructurales codifican proteínas importantes, como la PL pro (nsp3), la 3CL pro (nsp5), la ARN polimerasa (Pol) dependiente del ARN (nsp12) y la helicasa (nsp13). Debido a que los genes que codifican estas proteínas están conservados, suelen emplearse para análisis filogenéticos (Woo *et al.*, 2010). Entre el gen ORF1ab y S de los Embecovirus, se encuentra el gen de hemaglutinina esterasa (HE) que codifica para una glicoproteína que podría provenir del virus de la influenza C a través de una recombinación en el ancestro de este subgrupo luego de que los Betacoronavirus divergieran en cuatro subgrupos (Luytjes *et al.*, 1988). Por otro lado, el gen "S" tiene una secuencia nucleotídica bastante variable en los coronavirus y sumado al largo genoma, puede que la proteína espiga tenga la facilidad para adaptarse a distintos receptores celulares y permitiendo los saltos de hospederos. Además, la proteína espiga se divide en un dominio S1 variable y S2 conservado, los cuales intervienen en la unión al receptor mediante péptido señal en su superficie (Forni *et al.*, 2017; Woo *et al.*, 2010).

Otra proteína estructural es la nucleocápside, dicho gen que la codifica tiene una secuencia conservada que se puede aprovechar para hacer filogenética y gracias a su inmunogenicidad suele ser usado especialmente para la producción de antígenos recombinantes. En contraste, los genes de la proteína E de la envoltura y M de la membrana no están bien conservados en todos los coronavirus y se tratan de secuencias de pocos nucleótidos (Woo *et al.*, 2010). Una diferencia que se puede encontrar en el genoma de coronavirus es que en los Alfa y Betacoronavirus existen

múltiples genes S y E que cumplen una misma función; no obstante, en los Deltacoronavirus esto no existe por lo tanto su genoma suele ser más pequeño que los otros géneros (Brian y Baric, 2005). En algunos linajes, existen ORF adicionales algunos con función desconocida. Otros ORF pequeños como el ORF8 en el SARSr-CoV humano ayudarían en la explicación del origen del virus. El ORF8 podría haber tenido un papel crucial en el cambio de huésped del SARSr-CoV de la civeta al humano puesto que ambos comparten una alta identidad en esta región (Wu *et al.*, 2016).

2.1.4. Rol de los animales en la transmisión de coronavirus

Debido a la gran plasticidad del genoma y a los errores que existen en la replicación, los coronavirus pueden vencer la barrera entre especies e infectar a diferentes animales. Aquellos que están mayormente involucrados en brotes de infección zoonóticas en animales y humanos, son los miembros del Orden Chiroptera. El Virus del Ébola, Marburg, Nipah y el CoV son ejemplos de virus que infectan humanos cuyos ancestros han sido hallados en estos mamíferos (Donnik *et al.*, 2021). Además, en este último género, Coronavirus, hay más de 30 especies incluidas que tienen de reservorio natural a Chiroptera (Wong *et al.*, 2019).

Lo que favorece la gran cantidad de virus zoonótico es la diversidad de más de 1300 especies de Chiroptera y, por consiguiente, un elevado número de células y receptores que pueden interaccionar con las partículas virales (Donnik *et al.*, 2021). Otro factor importante es que estos mamíferos suelen transportar a nuevos virus de manera asintomática ya que muestran una baja respuesta inflamatoria a la infección, a diferencia de otros organismos que si activan citocinas proinflamatorias y desencadenan una enfermedad más agresiva (Collins *et al.*, 2014). Según Zhang *et al.* (2013), la respuesta inmune antiviral de los murciélagos mediada por IFN produce una insuficiente reacción inflamatoria para causar daño celular, persistiendo con la infección.

Son los murciélagos y las aves los animales en los que se encuentra mayor diversidad de coronavirus ya que existe una variedad de especies, tienen la capacidad

de volar y de agruparse en bandadas. Los coronavirus de murciélagos representan el patrimonio genético de los coronavirus de los grupos 1 y 2. En tanto que, los coronavirus aviáres son el acervo genético del grupo 3. La hipótesis es que el coronavirus de murciélagos dio el salto a otra especie de murciélago, lo que dio lugar a coronavirus del grupo 1 y del grupo 2. Estos dos coronavirus de murciélagos, a su vez, saltaron a otras especies de murciélagos y a nuevos mamíferos, incluidos los humanos. Por otro lado, los coronavirus de las aves saltaron a otras especies de aves y, en ocasiones, a algunas especies específicas de mamíferos, como la ballena y el gato leopardo asiático, con cada salto interespecífico evolucionando de forma dicotómica, dando lugar a los coronavirus del grupo 3 (Figura 3) (Woo *et al.*, 2009).

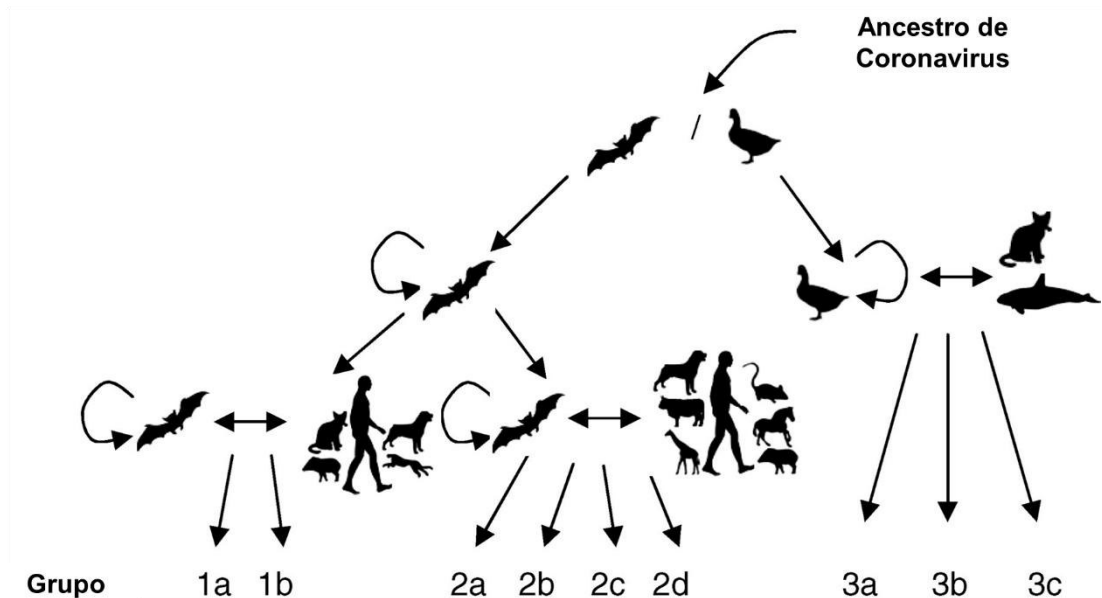


Figura 3. Esquema de la evolución de los coronavirus. Los murciélagos y aves constituyen reservas de genes para los coronavirus de los grupos 1 y 2 y los coronavirus del grupo 3, respectivamente (Modificado de Woo *et al.*, 2009).

A pesar de ser reservorio de diversidad de coronavirus, la transmisión directa entre murciélagos y humanos no es tan probable puesto que el contacto con estos es bajo. En la transmisión de coronavirus a humanos interviene otro animal portador como hospedero intermediario completando la infección interespecífica (Donnik *et al.*, 2021).

Los camélidos también son reservorios importantes en la zoonosis puesto que en regiones del medio oriente son criados para obtener leche, carne y fibra y con el aumento de las sequías, estos dromedarios se han vuelto la opción más favorable para crianza. Se ha reportado que casi la mitad de las infecciones zoonóticas que pueden transmitir son de origen viral (Zhu *et al.*, 2019). Los coronavirus CoV-HKU4, CoV-HKU5 y CoV-HKU25 comparten una homología entre 75-87% por MERS-CoV, en tanto que este virus aislado de *Camelus dromedarius* es 100% homólogo al virus aislado de humanos. Por ende, se hipotetiza que MERS-CoV esta más alejado de los coronavirus de murciélagos y que transcurrió un largo tiempo desde la transmisión del antecesor de los coronavirus en quiróptera hacia los camélidos (Raj *et al.*, 2014).

De igual modo, los rumiantes de granja pueden participar en la cadena de transmisión de los coronavirus. Al haber alta densidad de ganado dentro de un espacio limitado se crea un entorno favorable para la transmisión vía fecal-oral o aérea de enfermedades zoonóticas. A la fecha los animales de compañía no han sido asociados como hospederos intermediarios en infecciones por coronavirus; sin embargo, se debe considerar que cualquier animal que se encuentre estrechamente relacionado con el hombre puede significar un riesgo en la aparición de nuevas enfermedades virales (Donnik *et al.*, 2021).

2.1.5. Pruebas moleculares

2.1.5.1. RT-PCR

Dentro del laboratorio, cultivar coronavirus en un medio celular es una tarea muy difícil que toma bastante tiempo. Se han podido aislar cepas de HCoV-OC43 en cultivos de epitelio nasal y también se han reportado la posibilidad de aislar en líneas fibroblásticas de pulmón o intestino embrionario humano; no obstante, el RT-PCR (*Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*) es la prueba estándar de oro para la detección de coronavirus por su confiabilidad y rentabilidad (Burrel *et al.*, 2017).

En el transcurso de la epidemia de SARS-CoV, el diagnóstico rápido se realizó mediante RT-PCR empleando “*primers*” o cebadores específicos, derivados del gen N. La técnica se realiza a partir de muestras de frotis faríngeos nasales o muestras fecales durante la segunda semana de la enfermedad, asimismo los sueros también se pueden emplear para hallar ARN viral en la primera semana de la enfermedad. El sistema de reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (qRT-PCR) consiste en amplificaciones cuantitativas luego de una extracción del ARN a partir de las muestras ya mencionadas. En seguida, se realiza un paso de transcripción inversa para llevar el ARN viral a ADN complementario (ADNc) que pasará por “n” ciclos de amplificación. En la pandemia de COVID-19, esta técnica significó el estándar de oro para la confirmación de la enfermedad y así controlar la propagación de la enfermedad de manera más rápida. Para ello, se ha adicionado a esta prueba sondas fluorescentes que detectan e hibridan con los productos de la amplificación lo que incrementa la especificidad del ensayo (Oliveira *et al.*, 2020).

Se sugiere que las muestras provenientes del tracto respiratorio superior; es decir, secreciones nasofaríngeas y orofaríngeas, son óptimas ya que albergan un elevado número de copias virales; en cambio, en el tracto gastrointestinal y en sangre los niveles de ARN que se detectan suelen ser bajos (Burrell *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2020). Según Munne *et al.* (2021), la sensibilidad de la prueba oscila del 70 al 98% y su especificidad es de alrededor de 95%. Una de las limitaciones que se presentan son los falsos positivos, falsos negativos y resultados inconcluyentes cuando se está en las primeras etapas de la infección. Además, se conoce que una incorrecta toma de muestra, recogida y procesamiento afecta el resultado de la prueba puesto que degrada el ARN. Por lo que se recomienda que una vez hecho el hisopado, estos se sumerjan en el medio de transporte conteniendo una solución salina estéril o un tampón de lisis. La temperatura de almacenamiento debe ser a 2-8°C hasta 72 horas post muestreo. Si se van a procesar en un periodo largo de tiempo, la temperatura debe ser por lo menos

de -80°C. Otras dificultades son la falta de reactivos y el déficit de laboratorios bien acondicionados con personal calificado. Para mejorar el rendimiento, considerar una recolección y transporte adecuado, seguir un protocolo estandarizado, así como buenas normas de control de calidad, asegurarse también que los kits de extracción de ARN estén en buen estado y que los cebadores sean lo más específicos posibles (Oliveira *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020).

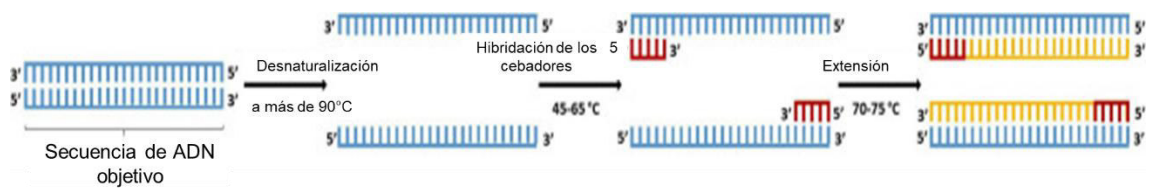


Figura 4. Proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Modificado de Shabani *et al.*, 2021).

2.1.5.2. Técnica de PCR “nested” o anidada

La técnica de PCR “*nested*” o anidada se caracteriza por su mayor sensibilidad y especificidad a comparación del PCR tradicional. La principal diferencia de esta técnica es que se usan dos pares de cebadores y dos rondas consecutivas de PCR. En la primera ronda se emplea un par de cebadores y el número de ciclos varía entre 15-30. El producto de esta primera etapa luego es usado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores distintos que se hibridan con una secuencia interna dentro del primer producto amplificado por el primer par de cebadores (Figura 5). Así, resulta un nuevo amplicón de menor tamaño dentro del producto inicial (Shen, 2019; Pacheco *et al.*, 2013).

Su alta sensibilidad se debe al número total de ciclos que se emplean. Por otro lado, la alta especificidad que brinda es debido a que el segundo par de cebadores solo se unen en un sitio específico dentro del amplicón obtenido en la primera ronda, resultando en una única banda (Pacheco *et al.*, 2013).

Un inconveniente que presenta la PCR anidada es el potencial riesgo de contaminación cuando se transfieren los productos de la primera ronda al tubo donde se llevará a cabo la segunda ronda. Una manera de corregir esto es separando el “mix” de la primera y segunda amplificación con una capa de aceite o cera (Shen, 2019).

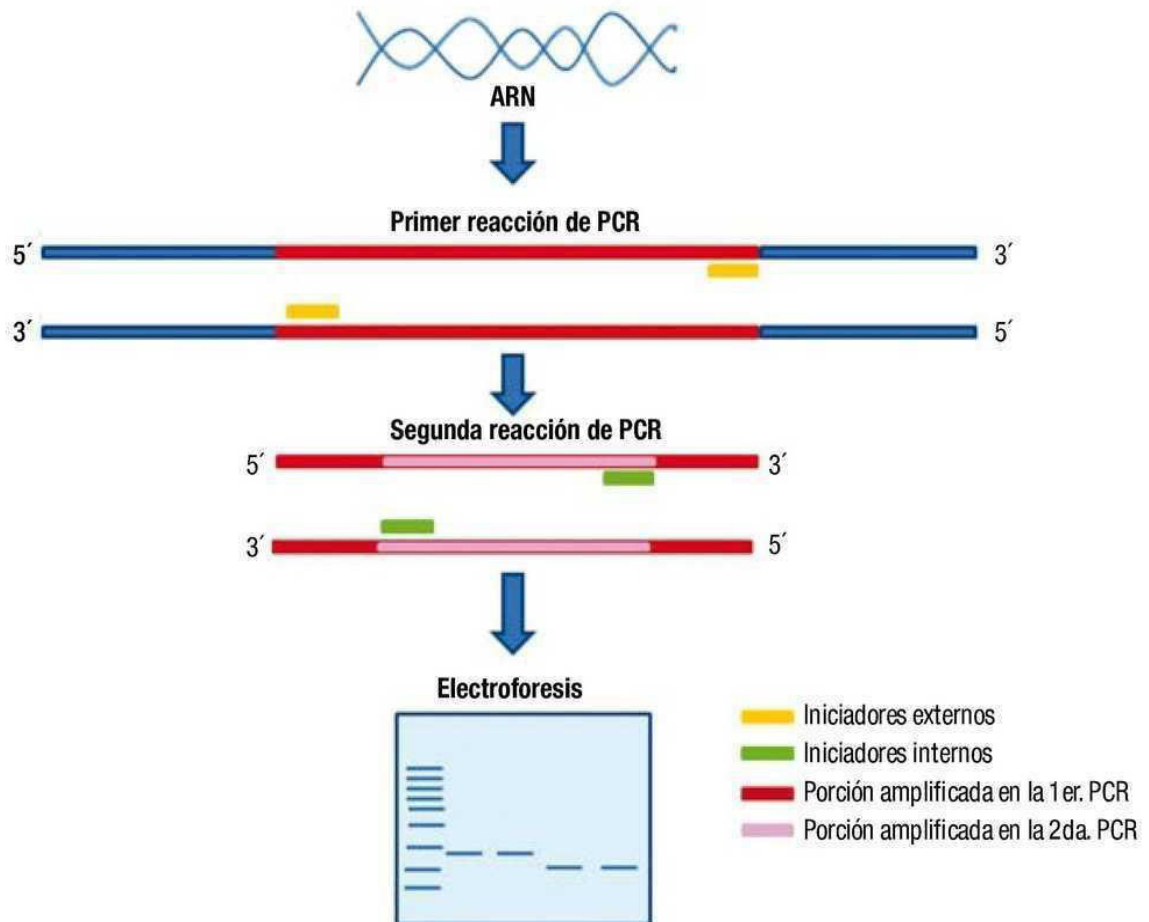


Figura 5. Diagrama general de PCR “nested” o anidada (Pacheco *et al.*, 2013).

2.1.5.3. PCR “semi-nested” o semianidada

Similar a la PCR anidada, la PCR semianidada emplea un par inicial de cebadores externos que resulta en un amplicón primario. En la segunda ronda, uno de los cebadores, ya sea el directo o el reverso, es el mismo que el de la primera ronda. Al final, se obtiene un producto que tiene un extremo interno idéntico al amplicón inicial (Figura 6) (Levin *et al.*, 2018).

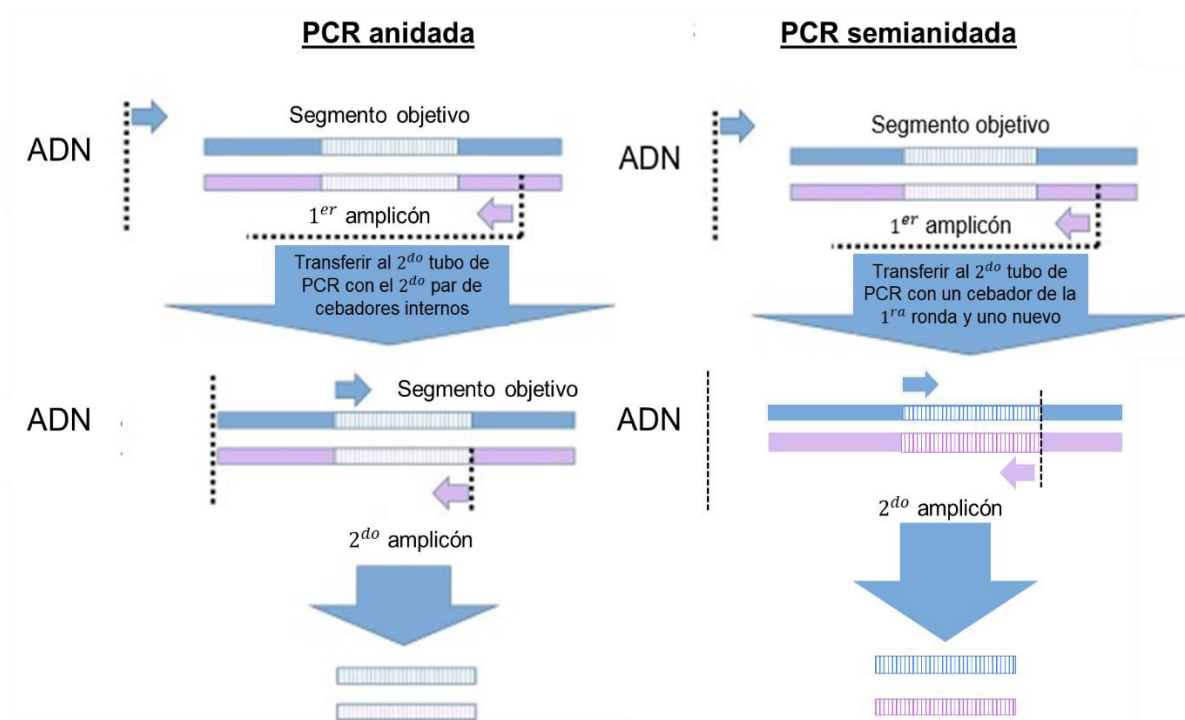


Figura 6. Comparación entre las técnicas de PCR anidada y PCR semianidada (Modificado de Shen, 2019).

2.2. Antecedentes del estudio

Los coronavirus no han sido considerados graves patógenos para los humanos, debido a que solamente causaban infecciones leves en personas inmunocomprometidas. Sin embargo, desde el brote del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) en los años 2002 y 2003 en China, este coronavirus es considerado un patógeno potencial para humanos (Drosten *et al.*, 2003; Ksiazek *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2003). El SARS es causado por un Betacoronavirus altamente patógeno y trasmisible. Aparentemente, este coronavirus se originó en murciélagos y luego se propagó a humanos en la provincia de Guangdong en el sur de China. El virus causó en humanos una enfermedad respiratoria severa y tomó el nombre de SARS-CoV (Ksiazek *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003). Más adelante en el 2012, otro Betacoronavirus se propagó de camellos a humanos en Arabia Saudita, causando una enfermedad similar al SARS donde el virus recibió el nombre de MERS-CoV (Assiri *et al.*, 2013; Zaki *et al.*, 2012). Desde la aparición de estas enfermedades, se han realizado diversos estudios

que han ayudado a entender la biología del coronavirus y la transmisión desde los animales a humanos. Estos estudios también han indicado que los animales silvestres, como los murciélagos, actúan como los principales reservorios de los Betacoronavirus; y se ha llegado a descubrir nuevos coronavirus de murciélagos alrededor del mundo (Lau *et al.*, 2013; Woo *et al.*, 2009; Woo *et al.*, 2012; Yuen *et al.*, 2012).

Los mamíferos silvestres pueden tener papeles importantes como portadores de los Betacoronavirus. En ellos se desarrolla el virus permitiendo su transmisión desde el hospedero natural hacia los humanos. Además, no solo los coronavirus transmitidos por murciélagos ocasionan infecciones en humanos, si no, los propios animales domésticos o silvestres pueden sufrir algún contagio por parte de ellos, ocasionándoles alguna enfermedad, o actuando como hospederos intermediarios o reservorios (Huang *et al.*, 2013; Simas *et al.*, 2015).

En diciembre de 2019, aparecieron casos de neumonía en personas de Wuhan en China, a causa de un nuevo Betacoronavirus, actualmente nombrado SARS-CoV-2 por el Comité Internacional del Grupo de Estudio de Coronavirus (CSG). Asimismo, la enfermedad ocasionada por este virus fue nombrada por la OMS como COVID-19. Los científicos lograron aislar y analizar molecularmente al virus, logrando obtener la secuencia del genoma del SARS-CoV-2 rápidamente (Lu *et al.*, 2020).

Posterior a esto, se logró aislar un coronavirus de murciélago de Yunnan en China, el cual fue denominado bat-CoV-RaTG13, y al analizar su secuencia genómica completa resultó 96% idéntica a la secuencia genómica del SARS-CoV-2. Luego, otro coronavirus se aisló de pangolines de malaya, y toda la secuencia genómica mostró una identidad de 91.02% y 90.55% con los coronavirus SARS-CoV-2 y bat-CoV-RaTG13, respectivamente (Zhang *et al.*, 2020). Aunque la secuencia bat-CoV-RaTG13 fue más cercana a la del SARS-CoV-2 (96% de similitud), el dominio de unión al receptor de la proteína “*Spike*” (S) del pangolín-CoV fue más similar a la del SARS-CoV-2. Estos hallazgos sugieren que el SARS-CoV-2 puede haber evolucionado en el pangolín y

haberse adaptado a los humanos a través de la selección natural (Andersen *et al.*, 2020).

Por otro lado, los seres humanos tienen un fuerte vínculo con perros y gatos, los cuales son criados como mascotas. Estudios recientes han demostrado la susceptibilidad de gatos domésticos al SARS-CoV-2 (Halfmann *et al.*, 2020) y la infección de dos perros domésticos que vivían con pacientes humanos infectados con SARS-CoV-2, también se detectó a través de RT-PCR, serología y secuenciación del genoma viral, lo que indicó una infección activa (Sit *et al.*, 2020). A diferencia de los perros, los gatos son más susceptibles al SARS-CoV-2 y pueden manifestar signos clínicos que incluyen vómito, diarrea y problemas respiratorios, además de que pueden transmitir el virus vía aerosoles (Shi *et al.*, 2020). Los reportes científicos también han demostrado la capacidad que tienen SARS-CoV-2 para infectar animales de vida silvestre, tal es el caso lo que sucedió en el zoológico del Bronx en la ciudad de Nueva York, donde seis leones africanos (*Panthera leo*), dos tigres de Amur (*Panthera tigris altaica*) y un tigre de Sumatra (*Panthera tigris sumatrae*) fueron susceptibles a la infección mostrando signos clínicos asociados con la enfermedad (Gollakner y Capua, 2020). En enero del presente año, se reportó que la población en cautiverio de gorilas del zoológico de San Diego, en EE. UU., arrojó positivo a infecciones de SARS-CoV-2 por medio de un diagnóstico de PCR. De igual forma, se registró un caso de transmisión de animales a humanos del SARS-CoV-2, donde dos empleados de una granja de visones se infectaron con el virus, el cual después apareció en la comunidad humana local y mediante análisis filogenético se corroboró la transmisión del virus en los visones a humanos ya que las secuencias derivadas de las personas y los visones infectados se agruparon en un mismo clado (Oude *et al.*, 2020). Cabe destacar que, si la evolución del virus persiste en los potenciales reservorios animales, los contagios a los humanos (zoonosis) pueden representar un gran riesgo para la salud pública (Murphy y Ly, 2021).

Por otra parte, estudios experimentales han demostrado la capacidad infectiva de SARS-CoV-2 en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*), hurones y primates no humanos del Viejo Mundo (Cohen, 2020). De todos ellos, el virus pudo replicarse con éxito en hurones y en los primates no humanos, logrando producir la enfermedad en alguno de ellos (Kim *et al.*, 2020; Munster *et al.*, 2020). Asimismo, otro estudio caracterizó al SARS-CoV-2 en tres especies de primates no humanos: *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis* y *Callithrix jacchus*, detectando el genoma viral en muestras de hisopado nasal y anal y sangre de todos los animales. *M. mulatta* mostró una respuesta inmune más fuerte al SARS-CoV-2, incluyendo la expresión de citoquinas proinflamatorias y cambios patológicos en los tejidos pulmonares (Lu *et al.*, 2020). Esto indicaría que algunas especies de animales silvestres pueden tener una participación como hospederos para SARS-CoV-2 (Zhang *et al.*, 2020). Otro estudio sugiere que los monos africanos del Viejo Mundo (*Papio cynocephalus*, *Lophocebus albigena*, *Chlorocebus aethiops*, *Cercopithecus ascanius* y *Cercopithecus nictitans*) representan un alto potencial para la circulación de virus entre los primates y humanos. El macaco Rhesus asiático es la especie de primate con el mayor número de infecciones virales registradas. Junto con los humanos, constituyen los animales de mayor distribución geográfica del planeta, desde Afganistán hasta la costa china del Océano Pacífico y, hacia el sur, Myanmar, Tailandia, Laos y Vietnam. La amplia extensión de las especies de macacos implica un elevado riesgo de propagación del virus entre los seres humanos y los macacos. Como se ha informado de la presencia de coronavirus en macacos y otros primates, los esfuerzos para estudiar el virus no sólo deben dirigirse en primera línea a estas especies, a fin de detectar coronavirus ya conocidos en estas poblaciones, sino también para encontrar nuevas cepas con gran potencial zoonótico (Liu *et al.*, 2021).

Algunos coronavirus también pueden transmitirse a través de alimentos o agua contaminados, como los Alfacoronavirus 229E y NL63. Si la infección llega a través del

agua contaminada puede ser vía aspiración, inhalación de gotas de aerosol, penetración por la piel o las membranas mucosas, así como por la ingesta (Natarajan y Miller, 2017). El tiempo de vida de los coronavirus en agua suele ser de varias semanas y si durante este tiempo entran en contacto con especies acuáticas de vida libre o de granjas pueden transmitirse a humanos u otros mamíferos si estos se alimentan o de los organismos acuáticos infectados; de esta forma se puede dar pase a nuevos brotes de coronavirus. En 1970 se reportó por primera vez un coronavirus en mamíferos marinos luego de que varias focas (*Phoca vitulina*) fallecieron en un acuario en Florida y otros mamíferos acuáticos en otras partes de Estados Unidos. El virus en cuestión fue HSCoV (Coronavirus de foca de puerto), un Alfacoronavirus causante de una neumonía hemorrágica mortal (Núñez *et al.*, 2021). A pesar de estos informes, hasta la fecha no se han encontrado Betacoronavirus en organismos marinos, solo se ha informado de los otros géneros, Gammacoronavirus y Alfacoronavirus (Morales y Tirado, 2022).

Perú tiene una de las mayores diversidades de animales silvestres en el mundo y lamentablemente, el comercio ilegal de muchas especies silvestres es una actividad ilícita común en nuestro país (Daut *et al.*, 2016). El tráfico de vida silvestre está dentro de los comercios ilícitos más lucrativos del mundo e incluye la captura, caza furtiva y contrabando de especies silvestres (South y Wyatt, 2011). En un estudio que evaluó los impactos en el bienestar animal del comercio de vida silvestre, se estimó que el 22% de los animales silvestres son comercializados para usarlos como mascotas (Baker *et al.*, 2013).

Este comercio ilegal se da principalmente en mercados, donde existe una estrecha interacción de los animales silvestres con animales domésticos y el hombre. Los estudios epidemiológicos realizados por el Ministerio de Salud del Perú han indicado prevalencias de hasta 100% para COVID-19 en humanos que laboran en mercados (MINSA, 2020). Por lo tanto, los animales silvestres usados en el comercio ilegal

estarían muy expuestos al SARS-CoV-2, pudiendo transmitirse el patógeno de una especie a otra.

La alta susceptibilidad que tienen los animales silvestres (felinos, hurones y primates no humanos) al SARS-CoV-2, implica un potencial para la aparición de brotes en animales y humanos, en lugares donde ocurre este tráfico de especies silvestres: mercados, zoológicos, centros de rescate y centros de investigación donde usen animales experimentales (felinos y primates no humanos). Por esta razón, es que resulta importante explorar la presencia de SARS-CoV-2, Alfa y otros Betacoronavirus en especies silvestres usadas en el tráfico ilegal en el Perú, con el fin de evaluar su posible papel como hospederos para estos patógenos.

2.3. Bases teóricas

2.3.1. Secuenciamiento de ADN

La secuenciación es la técnica donde se determina la secuencia de nucleótidos de ADN (adenina, timina, citosina y guanina). En la década de 1970, surgieron las tecnologías de secuenciación de primera generación. La más popular fue el método de secuenciación de Sanger, donde se utilizan didesoxinucleótidos (ddA, ddT, ddG y ddC) marcados con fluorescencia. La diferencia con los desoxirribonucleótidos es que carecen de un grupo hidroxilo en 3' de la ribosa; por tanto, se detiene la adición de otro nucleótido y en cada reacción se obtiene fragmentos de distintos tamaños que posteriormente se analizan mediante electroforesis capilar. En la computadora se produce un cromatograma o electroferograma del que se deriva la secuencia de una manera más visual y práctica (Griffiths, 2022; Bautista, 2010).

2.3.2. BLAST

BLAST es el acrónimo de herramienta básica de búsqueda de alineación local, este algoritmo permite comparar una secuencia de nucleótidos o proteínas, llamada "*query*" y secuencias de nucleótidos o proteínas dentro de una base de datos, denominada "*subject*". BLAST busca encontrar un fragmento corto de la secuencia "*query*" que se

alinee con un fragmento de una secuencia “*subject*” encontrada dentro de una base de datos, como por ejemplo el GenBank. Para cada alineamiento, existe una puntuación asignada en base a un valor estadístico conocido como “*e-value*”. Este es la cantidad de veces que se esperaría que ocurriera al azar un alineamiento en la base de datos en la que se buscó. Si el umbral es más alto que el “*e-value*”, entonces es menos estricto; en tanto que, “*e-value*” en el intervalo de 0,001 a 0,0000001 se emplean para limitar los alineamientos a los de alta calidad (Wheeler y Bhagwat, 2007).

Para hacer uso de BLAST, se debe pegar la secuencia a consultar en formato FASTA, que consta de secuencias de letras simples de nucleótidos o aminoácidos, precedidas por el símbolo ">" y que contiene información descriptiva. Una vez que haya cargado el resultado, se puede visualizar a modo de mapa, la región del genoma que mejor coincida. Además, muestra una leyenda de colores para las puntuaciones de los alineamientos, donde el rojo es aquella coincidencia más exacta y el negro la más lejana. En la parte inferior de la página se encuentran todos los alineamientos con su respectivo valor de “*gap*”. Dicho valor se da debido a inserciones, deleciones y sustituciones, influyendo en la puntuación final del alineamiento (Faiza, 2021; Wheeler y Bhagwat, 2007).

2.3.3. Árboles filogenéticos

Un árbol filogenético es un diagrama de las relaciones evolutivas de un conjunto de taxones, sean especies, organismos, genes, etc., desde su ancestro común más reciente. Los árboles se pueden construir a partir de similitudes o diferencias de sus características físicas o genéticas. Dos especies estarán más relacionadas si tienen un ancestro común más reciente y menos emparentadas si tienen un ancestro común menos reciente (Wan, 2013).

Está compuesto por ramas y nodos, al igual que los árboles botánicos. Una rama puede conectar dos nodos y es una representación de la estimación temporal de las relaciones evolutivas entre las unidades taxonómicas. Por otro lado, un nodo es un punto donde

un ancestro se diversificó para dar lugar a dos o más linajes descendientes. Aquellos nodos terminales se les conoce como unidades taxonómicas operativas (OTU) y pueden referirse a especies, géneros, poblaciones, secuencias de genes o proteínas. En cambio, los nodos internos son unidades taxonómicas hipotéticas (HTU), las cuales constituyen el último ancestro en común de los nodos que nacen a partir de ese punto (Supatrim, 2014).

Un clado es una agrupación de un nodo y todos los linajes que se originan de ese nodo. Una característica de un clado es que es monofilético; es decir, engloba a todos los descendientes de un mismo ancestro (Scott y Baum, 2016; Supatrim, 2014).

2.3.4. Método “*Neighbor-Joining*”

La construcción de un árbol filogenético se puede realizar mediante dos métodos: los métodos basados en la distancia y basados en los caracteres. “*Neighbor-Joining*” es el más empleado de los métodos de matriz de distancia. Se parte de un árbol en forma de estrella, donde no existe una raíz de origen. Entonces, las ramas que derivan en OTUs salen de un único nodo interno formando dicho patrón. Seguidamente, se selecciona un par de secuencias, se retiran de la matriz y se une a un segundo nodo interno que está a su vez conectado por una rama al centro de la estrella. Luego de que se ha calculado la longitud de la rama, estas dos secuencias se devuelven a sus posiciones originales y este proceso se repite hasta tomar en cuenta todos los grupos. El objetivo es mostrar la combinación de vecinos que minimice la longitud total del árbol filogenético, lo que se traduce en una mínima evolución necesaria para explicar las divergencias entre las taxa (Supatrim, 2014; Harrison, 2022).

2.3.5. Método de Máxima Verosimilitud

La máxima verosimilitud es un método basado en caracteres, cada carácter es una posición en el alineamiento de la secuencia. Para cada posición del nucleótido, el algoritmo de máxima verosimilitud calcula la probabilidad de que dicho sitio sea un nucleótido en específico, en función así las secuencias ancestrales tenían a ese

nucleótido. Una de sus ventajas es que permite maximizar el uso de la información que está disponible. Asimismo, es robusto, consistente y la verosimilitud mide que tan bien la data concuerda con las hipótesis hechas por el modelo. No obstante, se requiere de un poder computacional alto ya que puede ser demasiado lento (Supatrim, 2014).

2.4 Definición de categorías de análisis

- **Variable:** infección por coronavirus en primates no humanos que han sido incautados (*Saimiri* sp., *Saguinus* sp., *Lagothrix* sp., *Ateles* sp., *Aotus* sp, *Cebus* sp y *Allouata* sp).
- **Definición conceptual:** Una infección vírica consiste en la proliferación de un determinado virus en el organismo.
- **Dimensión:** presencia o ausencia de coronavirus en hisopado.

3. HIPÓTESIS Y VARIABLES

Detección molecular de Coronavirus en primates no humanos incautados y hallados por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) en Lima, Perú, 2020-2021.

H1: Los primates no humanos incautados en el tráfico ilegal por el SERFOR-ATFFS-Lima son portadores de coronavirus, albergando Betacoronavirus y Alfacoronavirus.

Ho: Los primates no humanos incautados en el tráfico ilegal por el SERFOR-ATFFS-Lima son portadores de coronavirus Betacoronavirus y Alfacoronavirus.

Variable: infección por coronavirus en primates no humanos que han sido incautados (*Saimiri* sp., *Saguinus* sp., *Lagothrix* sp., *Ateles* sp., *Aotus* sp, *Cebus* sp y *Allouata* sp).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Enfoque de la investigación

La presente investigación es de tipo cualitativo, abarcando el proceso investigativo desde la toma de muestra, procesamiento molecular, análisis de los resultados.

4.2. Tipo de investigación

El trabajo es de tipo descriptivo no experimental puesto que no se manipula el objeto de estudio, la información que se recolecta es en condiciones naturales.

4.3. Diseño de investigación

El diseño de investigación es transversal, ya que la investigación está centrada en recolectar datos en un momento específico.

4.4. Credibilidad de la investigación

Los hisopados rectales y traqueales se realizaron bajo la supervisión de personal con experiencia, como veterinarios. El RT-PCR se ha demostrado que es una técnica de alta confiabilidad para convertir ARN a ADNc, además el “*kit*” GoScript™ ReverseTranscription System (PROMEGA) posee más de 50 000 citas, reseñas y publicaciones para su uso en investigación. Asimismo, el “*master mix*” GoTaq Green (PROMEGA), presenta una amplificación robusta.

4.5 Sujetos de estudio

4.5.1. Material biológico

Se recibieron un total de 54 especímenes de primates no humanos incautados por el SERFOR-ATFFS-Lima en el periodo 2020-2021.

Las muestras se obtuvieron por hisopado rectal y traqueal haciendo uso de un hisopo estéril. Estos se almacenaron en el medio de transporte universal (UTM-RT™) a -20°C hasta su procesamiento. Posteriormente, se alicuotaron en tubos Eppendorf a un volumen de 200 µL.

4.6. Procedimientos. Técnicas e instrumentos de recolección de información

4.6.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó usando el “*kit*” comercial PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (INVITROGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN extraído fue almacenado a -80°C.

4.6.2. RT-PCR

La síntesis de ADN complementario se realizó con el kit comercial GoScript™ ReverseTranscription System (PROMEGA) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Primero, se preparó el “*master mix*” a un volumen final 10 µL, este incluía agua destilada, 5x RT tampón, MgCl₂ 25mM, dNTPs 10mM, cebador reverso Cor-Rw 20 µM, enzima RT Promega y se agregó 5µL del ARN extraído. El termociclador se usó bajo las siguientes condiciones: hibridación a 25°C por 5 minutos, transcripción reversa (RT) a 42°C por 60 minutos y el paso final de estocar a 4°C.

Los cebadores usados fueron Cor-Forward-5´ ACWCARHTVAAYTNAARTAYGC 3´ y Cor-Reverse-5´ TCRCAYYTTDGGRTARTCCA 3´ (Moës *et al.*, 2005).

4.6.3. PCR anidada

Se tomaron 5 µL del ADN complementario previamente sintetizado y se adicionaron 20 µL del “*master mix*” de GoTaq Green Master Mix (PROMEGA) que consistía en agua destilada, 2x “*master Mix*”, cebador Cor-Fw (20 µM), cebador Cor-Rw (20 µM), teniendo así un volumen final de 25 µL para la reacción. Luego, se sometieron en el termociclador a una desnaturalización de 95°C por 5 minutos, 50 ciclos de PCR (94°C por 40 segundos, 48°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto), una extensión a 72°C por 10 minutos y un paso final de 4°C.

Se colocó 2 µL del producto de PCR en un nuevo tubo y se le añadió el “*master mix*” conteniendo agua destilada, 2x “*master Mix*”, cebador Beta F (10 µM), cebador New Beta 3x R (10 µM). Las condiciones del PCR fueron una desnaturalización a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de PCR (94°C por 40 segundos, 57°C por 1 minuto y 72°C por 40 segundos), una extensión 72°C por 10 minutos y 4°C por tiempo indefinido.

Para el PCR anidado se empleó el cebador New.beta.Cov.F 5'ATTAGTGCWAAGAATAGAGCYCGCAC 3' y New.beta.1.R3x 5'TCACAYTTWGGRTCCCADCCCA 3' (Castilla *et al.*, 2021).

4.6.4. Electroforesis

Se realizó la corrida electroforética en un gel de agarosa al 1.5% teñidos con SYBR Safe (Invitrogen, EE. UU.) con 8 µL del producto de PCR y a 110V por 1 hora.

4.6.5. Secuenciamiento

Aquellos productos PCR-positivos fueron enviados a secuenciar en la empresa Macrogen Ltd. (Corea del Sur).

4.6.6. Comité de ética

El presente proyecto cuenta con el consentimiento informado para el manejo de muestras de animales mediante la Constancia de Autorización Ética N°. 2021-14 expedido por el Comité de ética, Facultad de Medicina Veterinaria (Anexo 6). El proyecto es subvencionado por el VRIP UNMSM por el Concurso del Programa de Proyectos de Investigación Multidisciplinarios 2020.

4.7 Análisis de datos

Las secuencias obtenidas se limpiaron y analizaron usando ChromasPro (<https://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>). Posteriormente, fueron comparadas con secuencias de referencia que se encuentran en la base de datos GenBank a través de BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Mediante el programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) se editaron las secuencias y se evaluaron. La filogenia se obtuvo con el programa MEGA11 (<https://www.megasoftware.net/>) con el método “Neighbor-Joining” y Máxima verosimilitud usando el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros (Tamura *et al.*, 2021; Tamura, 1992). Esta investigación fue financiada por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos – RR N° 016238-2020-R/UNMSM con código de proyecto A2008006m

5. RESULTADOS

5.1. Identificación de las especies de primates no humanos que actúan como reservorios para el SARS-CoV-2 y otros Betacoronavirus y Alfacoronavirus.

Se recibieron del Servicio Nacional de Forestal y de Fauna Silvestre, Administración Técnicas Forestal y de Fauna Silvestre, Sede Lima (SERFOR-ATFFS-Lima) un total 54 primates no humanos conformados por 7 especies, entre los cuales se encontraron *Aotus* sp. (n=3), *Ateles* sp. (n=1), *Cebus* sp. (n=20), *Lagothrix* sp. (n=6), *Saguinus* sp. (n=8), *Saimiri boliviensis* (n=1) y *Saimiri sciureus* (n=15). Los individuos fueron 41 machos y 13 hembras que estuvieron en edad juvenil a excepción de 2 que fueron crías (Tabla 2).

La detección se realizó a través de PCR anidada y se logró amplificar la región ORF1 de Coronavirus, cuyo resultado final fue una banda de aproximadamente 217 pb (Figura 7). El marcador que se empleó fue de 100 pb, resultando las bandas de los carriles 1, 2, 3 y 6 positiva; en tanto que el resultado fue negativo en los carriles 4 y 5 puesto que se trataron de muestras negativas usadas como control. Además, el resultado del PCR anidada muestra que, de 54 individuos, 6 muestras (11.11%) fueron positivas para el hisopado traqueal. Aquellos especímenes que dieron positivo fueron *Cebus* sp (n=3), *Saimiri sciureus* (n=2) y *Aotus* sp (n=1); mientras que, en ninguna de las muestras de hisopado rectal se detectó coronavirus (Anexo 1).

Tabla 2.

Datos generales del material biológico muestreado.

Especie	Edad		Sexo		Total
	Juvenil	Cría	Macho	Hembra	
<i>Aotus</i> sp.	2	1	1	2	3
<i>Ateles</i> sp.	1	0	0	1	1
<i>Cebus</i> sp.	20	0	17	3	20
<i>Lagothrix</i> sp.	6	0	4	2	6
<i>Saguinus</i> sp.	8	0	5	3	8
<i>Saimiri</i> <i>sciureus</i>	14	1	14	1	15
<i>Saimiri</i> <i>boliviensis</i>	1	0	1	0	1

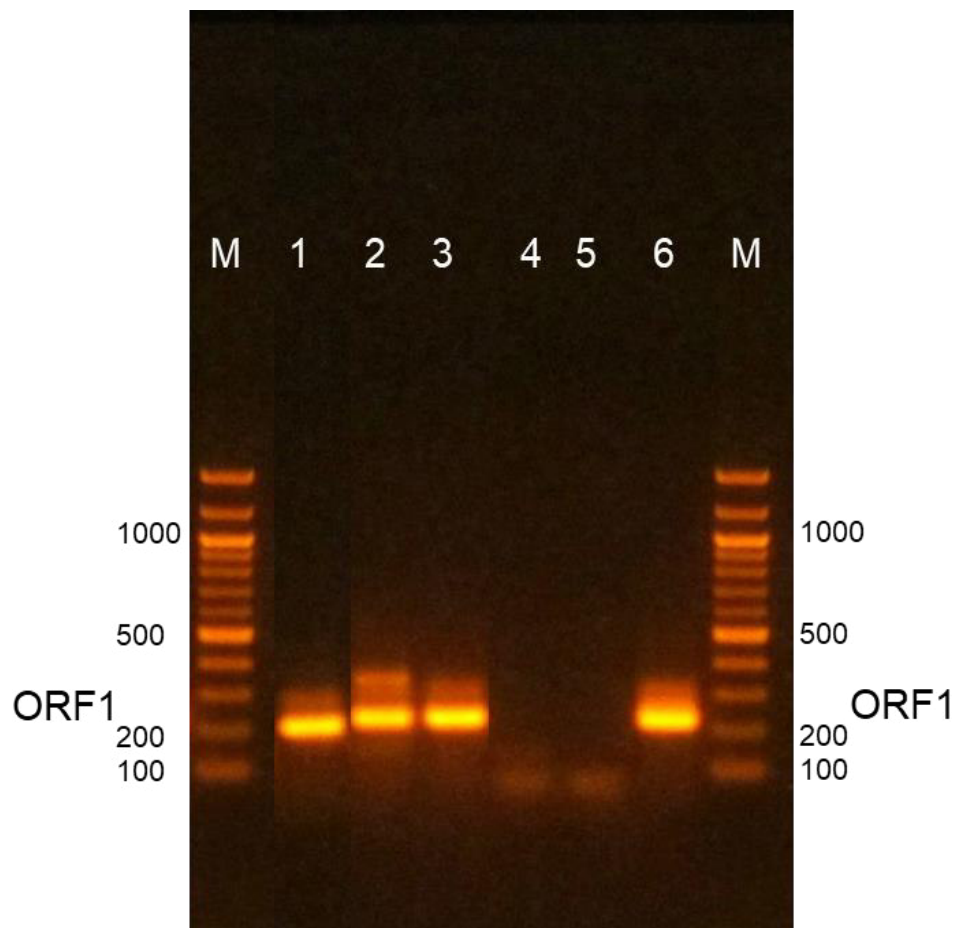


Figura 7. Corrida electroforética de productos de PCR. M. Marcador de 100 pb, 1. Muestra 78-2021 PEDV positiva, 2. Muestra 84-2021 PEDV positiva, 3. Muestra 92-2021 PEDV positiva, 4. Control negativo del PCR primario, 5. Control negativo del PCR secundario, 6. Control positivo.

5.2. Detección de los coronavirus aislados a partir de hisopado traqueal y rectal de primates no humanos incautados por el SERFOR durante 2020-2021 en Lima, Perú.

Las 6 muestras positivas fueron secuenciadas en ambas direcciones y el análisis de la secuencia mostraron dos especies distintas de coronavirus pertenecientes al mismo género de Alfacoronavirus. Por un lado, se tuvo una muestra procedente de *Cebus* sp. que tuvo una identidad del 95.52 % con el coronavirus felino (FCoV) ([MW030108.1](#)).

Por otra parte, a través del análisis de las secuencias de nucleótidos se encontró que *Cebus* sp. (n=2), *Aotus* sp. (n=1) y *Saimiri sciureus* (n=2) estuvieron parasitados con el virus de la diarrea epidémica porcina. Estas secuencias nombradas como 78-2021, 84-2021, 92-2021, 20-2020 y 22-2020 fueron 100 % idénticas entre sí. Dichas secuencias obtenidas en este trabajo se compararon con las que se encuentran en la base de datos GenBank, resultando una similitud de 98.01% con el virus de la diarrea epidémica porcina aislado de España (PEDV) ([MN692791.1](#)) y con el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) de Indiana, Estados Unidos ([KJ645635.1](#)). Se observó también un porcentaje de identidad del 97.01% con el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) aislada de Illinois, Estados Unidos ([KR265817.1](#)).

Tabla 3.

Identificación de Coronavirus mediante el uso de base de datos GenBank

Código de la muestra	Valor E	Cobertura (%)	Identidad (%)	Número de acceso de la secuencia de referencia
78-2021	7e-93	100	98.01	MN692791.1
84-2021	7e-93	100	98.01	MN692791.1
92-2021	7e-93	100	98.01	MN692791.1
20-2020	7e-93	100	98.01	MN692791.1
22-2020	7e-93	100	98.01	MN692791.1
23-2020	1e-83	98	95.52	MW030108.1

La diferencia de nucleótidos radicó en que las secuencias PEDV (MN692791.1), PEDV (KJ645635.1) y PEDV (KR265817.1) tuvieron 5 transversiones, formado por Adenina y Timina, y Adenina y Citosina, y 3 transición, conformado Adenina y Guanina,

y Citosina y Timina, con la secuencia consenso PEDV (78-2021) (Figura 8); mientras que, la secuencia PEDV (KR265817.1) tuvo adicionalmente 3 transiciones más de Citosina por Timina.

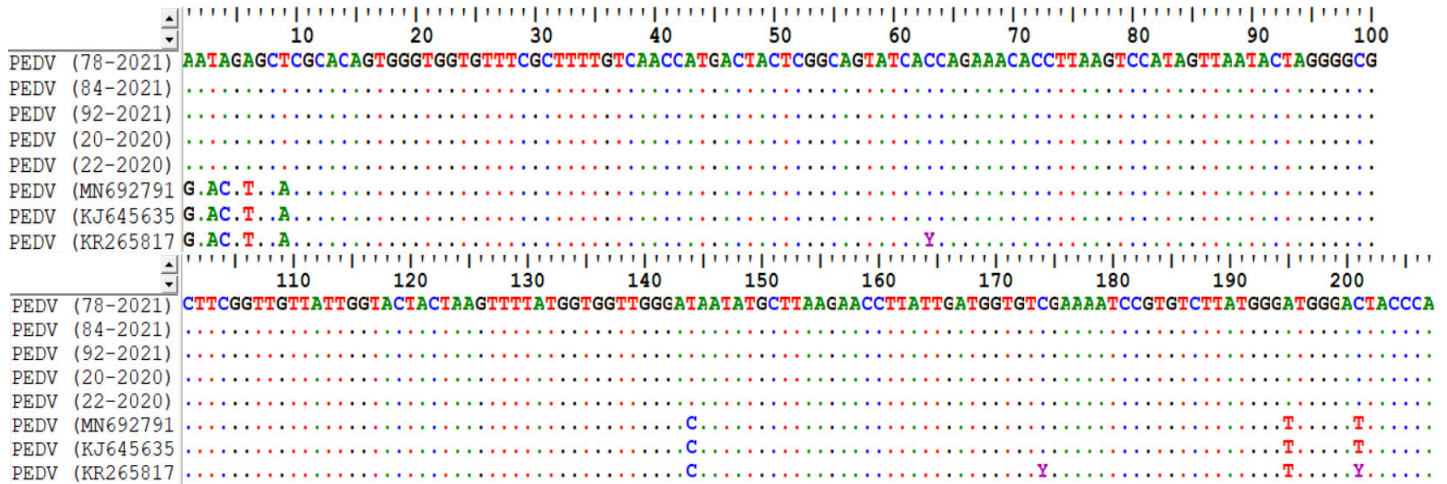


Figura 8. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas PEDV (78-2021), PEDV (84-2021), PEDV (92-2021), PEDV (20-2020) y PEDV (22-2020) con secuencias del GenBank.

Por otro lado, el resultado del BLASTn arrojó que la secuencia FCoV (23-2020) de *Cebus* sp. fue 95.52% similar un coronavirus felino de Wuhan, China ([MW030108.1](#)). El porcentaje de similitud disminuyó (94%) cuando se comparó con un coronavirus felino aislado de Estados Unidos ([HQ012370.1](#)); mientras que, con el virus felino aislado del mismo país ([HQ392471.1](#)) el porcentaje de similitud fue de 92%. Cabe mencionar que nuestra secuencia con el virus felino de China ([MT444152.1](#)) compartieron una diferencia de 9%.

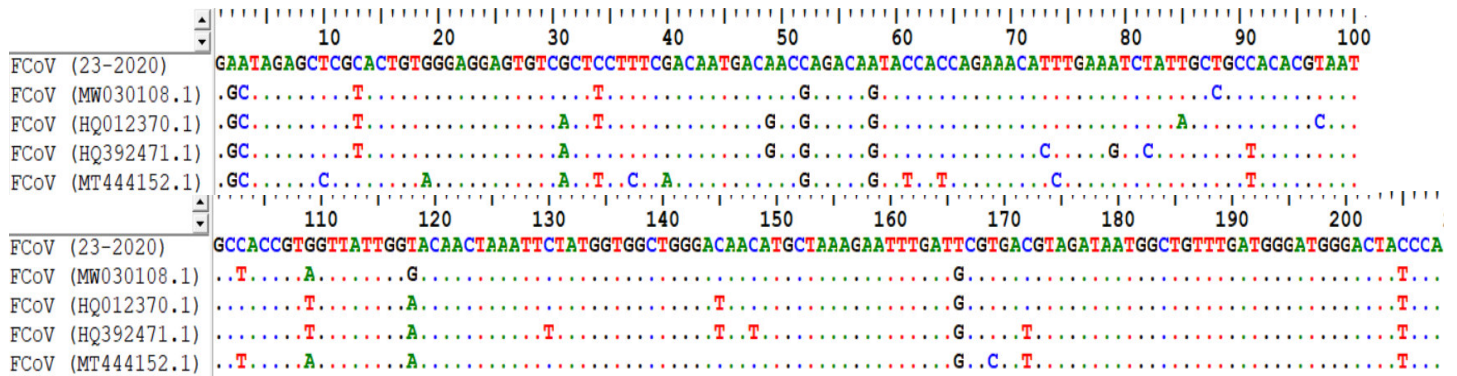


Figura 9. Alineamiento de la secuencia nucleotídica FCoV (23-2020) con secuencias del GenBank.

En la Figura 9 se presenta el alineamiento de nuestra secuencia FCoV (23-2020) con FCoV ([MW030108.1](#)), FCoV ([HQ012370.1](#)), FCoV ([HQ392471.1](#)) y FCoV ([MT444152.1](#)) obtenidas del GenBank donde al comparar la secuencia FCoV (23-2020) con FCoV ([MW030108.1](#)), se encuentran 8 transiciones que incluyen Adenina por Guanina, Citosina por Timina y Guanina por Timina y 4 transversiones formadas por Adenina por Citosina y Citosina por Guanina. Respecto a la secuencia FCoV ([HQ012370.1](#)) existen 6 transversiones (Guanina por Timina, Adenina por Timina, Citosina y Guanina y Adenina y Citosina) y 9 transiciones (Adenina por Guanina y Citosina por Timina). Por otra parte, con la secuencia FCoV ([HQ392471.1](#)) se hallaron 5 transversiones (Adenina por Citosina, Citosina por Guanina, Guanina por Timina, Adenina por Timina) y 14 transiciones (Adenina por Guanina, Citosina por Timina).

Finalmente, con la secuencia FCoV ([MT444152.1](#)) las transversiones fueron 4 y estuvieron formadas por Adenina y Citosina, Citosina y Guanina, Guanina por Timina; en tanto que el número de transiciones fue de 17 conformadas por Adenina y Guanina, Adenina y Timina y Citosina por Timina.

5.3. Relaciones filogenéticas de los coronavirus identificados en primates no humanos incautados por el SERFOR en Lima, Perú.

La Figura 10 indica el árbol filogenético que resulto del análisis mediante “*Neighbor-Joining*”, el cual se divide principalmente en 3 grupos como son los Alfacoronavirus, Betacoronavirus y Deltacoronavirus. Las muestras PEDV (78-2021), PEDV (84-2021), PEDV (92-2021), PEDV (20-2020) y PEDV (22-2020) se agruparon juntas. Estas tuvieron un gran parentesco con otros virus de la diarrea epidémica porcina provenientes de diferentes países. En cambio, la muestra FCoV (23-2020) se separó en un solo clado estando más emparentado con FCoV (MW030108.1) y FCoV (HQ012370.1). Para enraizar este árbol filogenético se usaron secuencias de coronavirus porcino del género Deltacoronavirus.



Figura 10. Relaciones evolutivas de los taxones. La historia evolutiva se dedujo mediante el método “*Neighbor-Joining*” (Saitou y Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo. Junto a las ramas se muestra el porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon mediante “*Bootstrap*” (1000 réplicas) (Felsenstein, 1985). Las

distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980) y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Este análisis incluyó 42 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones con menos de un 95% de cobertura del sitio, es decir, se permitieron menos de un 5% de “*gaps*” de alineación, datos perdidos y bases ambiguas en cualquier posición (opción de eliminación parcial). En el conjunto de datos final había un total de 207 posiciones. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021).

Se construyó otro árbol usando el método de Máxima Verosimilitud (Figura 11), donde se notó que las 5 muestras PEDV (78-2021), PEDV (84-2021), PEDV (92-2021), PEDV (20-2020) y PEDV (22-2020) compartían un parentesco con los virus de la diarrea epidémica porcina y, de igual manera, la secuencia FCoV (23-2020) también formaba un mismo clado con FCoV (MW030108.1).

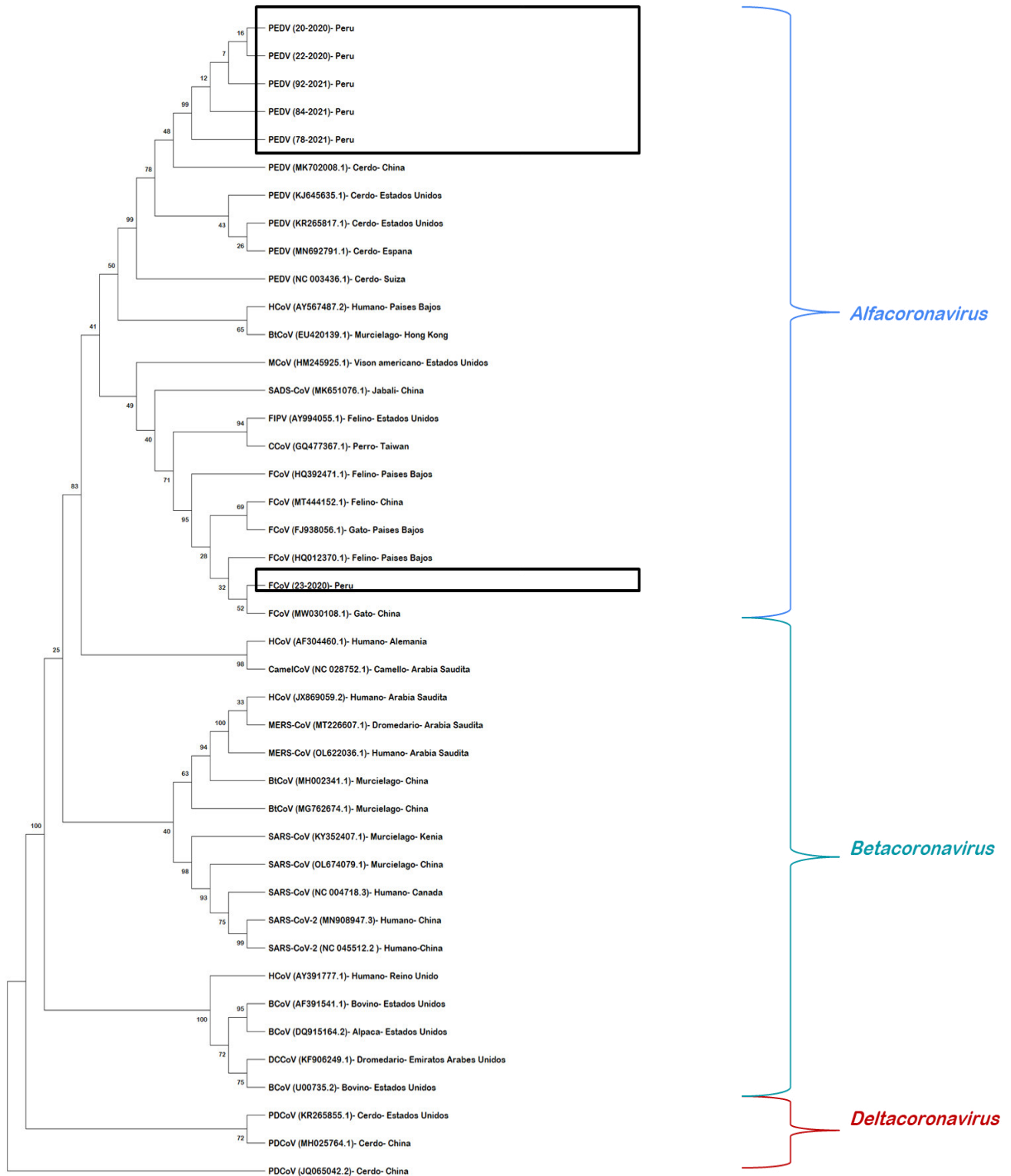


Figura 11. Análisis evolutivo por el método de Máxima Verosimilitud. La historia evolutiva se dedujo mediante el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980). Se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica (-2887,27). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan se

muestra junto a las ramas. Los árboles de partida para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos “*Neighbor-Join*” y BioNJ a una matriz de distancias entre pares estimada mediante el enfoque de Máxima Verosimilitud Compuesta (MCL), y seleccionando a continuación la topología con un valor de probabilidad logarítmica superior. Este análisis incluyó 42 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones con menos de un 95% de cobertura del sitio, es decir, se permitieron menos de un 5% de “*gaps*” de alineación, datos perdidos y bases ambiguas en cualquier posición (opción de eliminación parcial). En el conjunto de datos final había un total de 207 posiciones. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11 (Tamura, 2021).

6. DISCUSIÓN

El presente trabajo demostró que los primates no humanos pueden actuar como portadores para coronavirus ya que se detectó dos especies de Alfacoronavirus en 11.11% (6 /54) de los primates incautados. Las dos especies detectadas, PEDV y FCoV, son agentes de enfermedades entéricas y causan diarreas con una alta morbilidad y mortalidad en sus hospederos. Estudios previos han demostrado la infección de coronavirus en simios, tal como lo demuestra el estudio de Wang *et al.* (2007) que recolectó muestras fecales de simios con diarrea que habitaban en dos colonias de Estados Unidos. Los resultados mostraron infecciones endémicas con virus entéricos en ambas colonias de animales. Dentro de los virus que fueron detectados se encontraron rotavirus de simios, adenovirus entéricos, enterovirus y coronavirus. Además, dicho estudio encontró que los coronavirus estuvieron presentes tanto en las heces normales como en las diarreicas; sin embargo, no hubo una relación causa-efecto con la gastroenteritis de esta población (Wang *et al.*, 2007). En 1982, un trabajo evaluó muestras de heces normales y con diarrea de babuinos, chimpancés, macacos y tífiles. De las 108 muestras, se pudo detectar mediante microscopía electrónica que 46 contenían partículas similares a coronavirus (43%). Aquí, se describieron coronavirus

en muestras de diarrea de infantes, juveniles y adultos; mientras que, en las heces normales se detectaron coronavirus en heces de lactantes, juveniles y adultos, lo cual no permite generalizar la asociación de coronavirus con la diarrea, pero si se vio asociada con una alta prevalencia en heces normales y diarreicas en animales de mayor edad (Smith *et al.*, 1982). Asimismo, se ha descrito una situación similar en gatos, perros, humanos y macacos Cynomolgous y Rhesus (Caul y Egglestone, 1979; Hoshino y Scott, 1980).

Cabe mencionar que, si bien no abundan los reportes de Alfacoronavirus en simios del nuevo mundo, si se han encontrado en humanos, los cuales también son considerados primates pertenecientes a la familia *Hominidae*. En particular, los Alfacoronavirus HCoV NL63 y HCoV 229E llevan muchos años circulando en los seres humanos y son la causa del 20-30% de los resfriados comunes (CDC, 2020).

Otro hallazgo en este trabajo es el de un espécimen de *Cebus* sp. que fue positivo a un Coronavirus Felino (FCoV (23-2020)) con un 95.52% de identidad, lo que indicaría una posible transmisión entre un felino y un primate debido a que estos últimos son víctimas del tráfico ilegal de fauna silvestre, siendo que esta actividad ha llevado a una declinación de la población de *Cebus* sp., ubicándolo dentro de la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) en la categoría de Peligro Crítico (CR) y Casi Amenazado (NT) (MINAM, 2018). Es importante resaltar que en la selva la mayoría de los primates son captados ilegalmente para después vender las crías como mascotas (Salazar, 2022). Estas situaciones de contacto entre humanos, animales salvajes y domésticos pudieron haber ocasionado que estos virus se trasladen a nuevas poblaciones de huéspedes, los primates (Daszak *et al.*, 2007).

Cebus sp. pudo haberse infectado con un Coronavirus Felino de un félido silvestre ya que ambos animales comparten hábitat en la selva peruana. Nuestra Amazonía alberga felinos como el gato del pajonal (*Leopardus colocolo*), gato andino (*Leopardus jacobita*), yaguarundi (*Herpailurus yagouaroundi*), tigrina (*Leopardus*

tigrinus), huamburushu (*Leopardus wiedii*), tigrillo (*Leopardus tigrinus*), puma (*Puma concolor*) y otorongo (*Panthera onca*).

El coronavirus felino (FCoV) se trata de un agente de distribución ubicua en gatos, felinos no domésticos en instalaciones zoológicas y en la vida silvestre. Según su patología se pueden clasificar en dos tipos. El primer tipo son cepas avirulentas que se conocen como coronavirus entérico felino (FECV). Su seropositividad es de 20 al 60 %, alcanzando hasta el 90 % en hogares con varios gatos. Mientras que, a las cepas virulentas se les conoce como virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) por la manifestación clínica que causan (Delaplace *et al.*, 2021). Asimismo, en los árboles filogenéticos de ML y NJ figura FIPV y coronavirus canino (CCoV) agrupados en un solo clado y esto se debe a que FIPV surgió a través de una doble recombinación entre el FCoV tipo I y el coronavirus canino tipo II (CCoV). Estudios han demostrado que hay una alta tasa de positividad de FIPV en felinos no domésticos en entornos cautivos como guepardos (*Acinonyx jubatus*) (Foley *et al.*, 2013; Delaplace *et al.*, 2021). También, se ha demostrado infección en leones africanos (*Panthera leo*), gatos salvajes europeos (*Felis silvestris*), gatos de Pallas (*Otocolobus manul*) y gatos de arena (*Felis margarita*), tigres (*Panthera tigris*), servales (*Leptailurus serval*) y linceos (*Lynx rufus*) (Ratti *et al.*, 2022; Stout y Whittaker, 2021). En nuestra región se reporta una amplia distribución como en pumas (*Puma concolor*), jaguares (*Panthera onca*), leopardos (*Panthera pardus*) y huamburushu (*Leopardus wiedii*) coincidiendo con los felinos silvestres que forman parte de nuestra fauna. En la ciudad de Lima se han descrito gatos del distrito de Magdalena con el biotipo II de FCoV (FIPV) demostrando la alta propagación del virus en todo el mundo (Rubio, 2018; Colina *et al.*, 2021).

La transmisión de los 5 primates que resultaron positivos a PEDV, *Cebus* sp., *Aotus* sp. y *Saimiri sciureus*, probablemente haya tomado lugar en Lima. Esto debido a que la costa peruana es un alto productor de porcinos, siendo Lima el principal productor

con 15.4% del total de porcinos a nivel nacional (MIDAGRI, 2015). Entonces, la transmisión entre cerdos y primates pudo darse debido al alto grado de confinamiento en la crianza de cerdos dentro de los almacenes que poseen los comerciantes. A su vez, el virus de la diarrea epidémica del porcino (PEDV) tiene cada vez mayor importancia en las granjas intensivas, explotaciones extensivas y en los suinos silvestres puesto que se caracteriza por causar una enfermedad entérica aguda y altamente contagiosa con la presencia de vómitos, diarrea y deshidratación (Sasaki *et al.*, 2016).

A nivel de América Latina, PEDV es poco estudiado y la presencia de estos agentes en algunos países continúa sin conocerse. En nuestro país, este Alfacoronavirus se ha detectado como causante de diarreas agudas desde el 2014. En Lima, el 97.1% de granjas porcinas que fueron muestreadas resultaron positivas para PEDV lo que evidencia la rápida transmisión en las granjas del Perú y la necesidad de monitorear mediante RT-PCR la presencia de este virus (Castro-Sanguinetti, 2017). Por ende, implementar y reforzar las medidas de bioseguridad es un factor crucial donde debe procurarse siempre realizar un correcto lavado, desinfección y secado de los vehículos donde se transportan los animales y de esta manera reducir el riesgo de contaminación.

Se conoce que el cerdo doméstico (*Sus scrofa domesticus*) es el único hospedero natural de PEDV. No se han reportado casos en seres humanos, ni en otras especies domésticas (Pospischil y Kiupel, 2002). A pesar de ello, en condiciones de laboratorio múltiples líneas celulares de diferentes especies, incluidos murciélagos y primates humanos y no humanos permiten la propagación de PEDV de manera exitosa (Castro, 2016; Gallagher y Perlman, 2013). La habilidad de PEDV de infectar a células de especies distintas, en este caso a *Cebus sp.*, *Aotus sp.* y *Saimiri sciureus*, puede ser explicado por que el virus emplea los componentes celulares conservados evolutivamente como receptores, lo cual incrementa el peligro de transmisión entre especies y potencial zoonosis (Song y Park, 2012; Li *et al.*, 2020).

Tanto PEDV como FCoV se describen como virus entéricos cuya forma de transmisión es vía fecal-oral y fómites (Rubio y Chavera, 2018; Yuan *et al.*, 2018). Por consiguiente, el resultado esperado sería que ambos virus se detecten en los hisopados rectales. Sin embargo, no se detectó ningún coronavirus en este tipo de hisopados, si no mas bien que los resultados positivos corresponden todos a hisopados de tráquea. Para PEDV se ha sugerido a la transmisión aérea como otra posible ruta de transmisión (Li *et al.*, 2018). Se ha encontrado que PEDV está presente en todos los tamaños de partículas de aerosol y que es capaz de sobrevivir hasta 9 meses en el medio ambiente (Alonso *et al.*, 2014). Es probable que las células dendríticas del epitelio nasal capten a las partículas virales de PEDV y lo presenten a las células T CD3+. Mediante la circulación sanguínea las células T CD3+ llegan al intestino donde se encuentran las células epiteliales intestinales que son blanco de este virus (Li *et al.*, 2018).

Los receptores de FCoV que interactúan con la proteína S son la aminopeptidasa (APN) y a una molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas no integrina-3 (DC-SIGN). Si bien la inmunorreactividad de estos dos receptores es fuerte a lo largo de todo el intestino, también se ha encontrado que puede haber una reacción con DC-SIGN en las vías respiratorias, específicamente en el epitelio bronquial, neumocitos de tipo I y de tipo II (Cook *et al.*, 2022).

La importancia de estos hallazgos recae en la identificación por primera vez de PEDV y FCoV en especies de fauna silvestre en las que no se había reportado la infección antes. En consecuencia, si un animal infectado, en este caso los primates, está viajando de un lugar a otro, se debería tener una consideración especial cuando se detecta este agente viral o decomisar estos animales en cualquier lugar por el peligro potencial que pueden suponer.

Por último, es preciso elaborar estudios en otras especies de primates, como, por ejemplo, aquellos que viven en zoológicos ya que tienen contacto habitual con otras especies de animales y humanos. A esto se le agrega, que la transmisión de los

coronavirus puede ser también por vía aerógena y ser, por tanto, más contagiosa la transmisión. Se necesita saber la situación actual de este virus en primates en cautiverio en diversas partes del mundo por el impacto en el bienestar, la salud de la vida silvestre y sobre los planes de conservación que tienen como objetivo proteger a las especies en peligro de extinción.

7. CONCLUSIONES

- Se detectó Coronavirus en 6 especímenes de primates correspondientes a las especies *Cebus* sp., *Aotus* sp. y *Saimiri sciureus*, siendo estos primates reservorios de virus ya conocidos o importantes desde el punto de vista veterinario y de salud pública.
- Los dos agentes virales identificados pertenecieron al género Alfacoronavirus, uno de ellos fue 98.01% idéntico al virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) y el otro 95.52% idéntico al coronavirus felino (FCoV).
- Es importante que se preste atención y se tomen medidas de prevención para velar por la salud de estos primates no humanos debido a que los coronavirus poseen una alta dinámica de recombinación y mutación que puede dar lugar a enfermedades infecciosas emergentes o de potencial zoonótico.

8. RECOMENDACIONES

- Llevar a cabo estudios que incluyan un mayor número de hisopados rectales y traqueales para obtener un conocimiento más profundo sobre de la epidemiología de PEDV y FCoV.
- Realizar el descarte en especies incautadas en otros puntos del Perú y aquellas están en cautiverio dentro de los zoológicos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, C., Goede, D. P., Morrison, R. B., Davies, P. R., Rovira, A., Marthaler, D. G., & Torremorell, M. (2014). Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Veterinary Research*, 45(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0073-z>
- Andersen, K., Rambaut, A., Lipkin, W., Holmes, E., & Garry, R. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, 26, 450-452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>.
- Asrani, P., Mustafa, G., Singh, S., & Hassan, I. (2020). Molecular basis of pathogenesis of coronaviruses: A comparative genomics approach to planetary health to prevent zoonotic outbreaks in the 21st century. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 24(11), 634-644.
- Assiri, A., Al-Tawfiq, J., Al-Rabeeah, A., Al-Rabiah, F., Al-Hajjar, S., Al-Barrak, A., Flemmang, H., Al-Nassir, W., Balkhy, H., Al-Hakeem, R., Makhdoom, H., Zumla, A., & Memish, Z. (2013). Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: A descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, 13, 752-761. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70204-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70204-4).
- Baker, S., Cain, R., van Kesteren, F., Zommers, Z., D'Cruze, N., & MacDonald, D. (2013). Rough trade: Animal welfare in the global wildlife trade. *BioScience*, 63, 928-938. <https://doi.org/10.1525/bio.2013.63.12.6>.
- Bautista, R. (2010). Las tres generaciones de la secuenciación. *Plataforma Andaluza de Bioinformática*, 3(128), 27-28.

- Beig, A., Bazaz, M., Bamerh, H., H., Fereshteh, S., Amiri, S., Salehi-Vaziri, M., Arashkia, A., & Azadmanesh, K. (2021). The inclusive review on SARS-CoV-2 biology, epidemiology, diagnosis, and potential management options. *Current Microbiology*, 78(4), 1099-1114. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02396-x>
- Bezerra, M., Mendoza, J., Thompson, R., Dantas, F., & Otranto, D. (2021). Illegal wildlife trade: A gateway to zoonotic infectious diseases. *Trends in Parasitology*, 37(3), 181-184. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.12.005>
- Brian, D., & Baric, R. (2005). Coronavirus genome structure and replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 287, 1-30. https://doi.org/10.1007/3-540-26765-4_1
- Burrell, C., Howard, C., & Murphy, F. (2017). *Fenner and White's medical virology* (5th ed.). Academic Press. pp. 437-446. ISBN 9780123751560. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375156-0.00031-X>
- Castilla, D., Escobar, V., Ynga, S., Llanco, L., Manchego, A., Lázaro, C., Navarro, D., Santos, N., & Rojas, M. (2021). Enteric viral infections among domesticated South American camelids: First detection of mammalian orthoreovirus in camelids. *Animals: An open access journal from MDPI*, 11(5), 1455. <https://doi.org/10.3390/ani11051455>
- Castro-Sanguinetti, G. (2017). Aislamiento y detección molecular de cepas emergentes del virus de la diarrea epidémica porcina en Lima, Perú [Isolation and molecular detection of emerging strains of porcine epidemic diarrhea virus in Lima, Peru]. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, 28(4), 1010-1019. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13885>
- Castro, G. (2016). *Caracterización molecular y filogenética de cepas emergentes del virus de la diarrea epidémica porcina detectadas en el Perú* [Tesis de maestría,

Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Archivo digital
<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/5707>

Caul, E., & Egglestone, S. (1979). Coronavirus-like particles present in similar faeces. *Veterinary Record*, 104, 168-169.

Centers for Disease Control and Prevention. (2020). Common human coronaviruses.
<https://www.cdc.gov/coronavirus/general-information.html>

Collins, S., & Mossman, K. (2014). Danger, diversity and priming in innate antiviral immunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25, 525-531.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.002>

Cohen, J. (2020). From mice to monkeys, animals studied for coronavirus answers. *Science*, 368, 221-222. <https://doi.org/10.1126/science.368.6488.221>

Colina, S., Aspitia, C., Noguerras, J., Serena, M. S., Echeverría, M. G., & Metz, G. E. (2021). El tercer gran salto: los coronavirus animales en América Latina [The third big leap: animal coronaviruses in Latin America]. *Analecta Veterinaria*, 41(2), 059. <https://doi.org/10.24215/15142590e059>

Cook, S., Castillo, D., Williams, S., Haake, C., & Murphy, B. (2022). Serotype I and II feline coronavirus replication and gene expression patterns of feline cells—building a better understanding of serotype I FIPV biology. *Viruses*, 14, 1356.
<https://doi.org/10.3390/v14071356>

Costagliola, A., Liguori, G., D'Angelo, D., Costa, C., Ciani, F., & Giordano, A. (2021). Do animals play a role in the transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)? A commentary. *Animals*: 11(1), 16.
<https://doi.org/10.3390/ani11010016>

- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181-192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Daszak, P., Epstein, J. H., Kilpatrick, A. M., Aguirre, A. A., Karesh, W. B., & Cunningham, A. A. (2007). Collaborative research approaches to the role of wildlife in zoonotic disease emergence. *Current topics in microbiology and immunology*, 315, 463–475. https://doi.org/10.1007/978-3-540-70962-6_18
- Daut, E. F., Lahodny, G., Jr., Peterson, M. J., & Ivanek, R. (2016). Interacting effects of Newcastle disease transmission and illegal trade on a wild population of white-winged parakeets in Peru: A modeling approach. *PLoS One*, 11, 147-517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147517>.
- Delaplace, M., Huet, H., Gambino, A., & Le Poder, S. (2021). Feline coronavirus antivirals: A review. *Pathogens*, 10(9), 1150. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091150>
- Donnik, I. M., Popov, I. V., Sereda, S. V., Popov, I. V., Chikindas, M. L., & Ermakov, A. M. (2021). Coronavirus infections of animals: Future risks to humans. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 48(1), 26-37. <https://doi.org/10.1134/S1062359021010052>
- Doody, J., Reid, J., Bilali, K., Diaz, J., & Mattheus, N. (2021). In the post-COVID-19 era, is the illegal wildlife trade the most serious form of trafficking? *Crime Sci*, 10(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s40163-021-00154-9>
- Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H. R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A., Berger, A., Burguiere, A. M., Cinatl, J., Eickman, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J. C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H. D., Osterhaus, A. D., Schmitz, H., & Doerr, H. W. (2003). Identification of a novel

coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, 348, 1967-1976. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030747>

Faiza, M. (2021, May 6). How BLAST works – Concepts, Types, and Methods Explained. *Bioinformatics Review*. <https://bioinformaticsreview.com/20210503/how-blast-works-concepts-types-methods-explained/>

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.

Foley, J.E., Swift, P., Fler, K.A., Torres, S., Girard, Y.A., & Johnson, C.K. (2013). Risk factors for exposure to feline pathogens in California mountain lions (*Puma concolor*). *Journal of Wildlife Diseases*, 49, 279-293. <https://doi.org/10.7589/2012-08-206>

Forni, D., Cagliani, R., Clerici, M., & Sironi, M. (2017). Molecular evolution of human coronavirus genomes. *Trends in Microbiology*, 25(1), 35-48. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.001>

Gallagher, T., & Perlman, S. (2013). Public health: Broad reception for coronavirus. *Nature*, 495(7439), 176-177. <https://doi.org/10.1038/495176a>

Gollakner, R., & Capua, I. (2020). Is COVID-19 the first pandemic that evolves into a panzootic? *Veterinaria Italiana*, 56(1), 7-8. <https://doi.org/10.12834/VetIt.2246.12523.1>

Griffiths, A.J.F. (2022, December 19). DNA sequencing. *Encyclopædia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/DNA-sequencing>

Harrison, A. (2022, August 31). Bioinformatics by hand: Neighbor-joining trees. *Tender Is The Byte*. <https://www.tenderisthebyte.com/blog/2022/08/31/neighbor-joining-trees/>

Hilderink, M., & de Winter, I. (2021). No need to beat around the bushmeat – The role of wildlife trade and conservation initiatives in the emergence of zoonotic diseases. *Heliyon*, 7(7), 76-92. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07692>

- Hoshino, Y., & Scott, F. W. (1980). Coronavirus-like particles in the feces of normal cats. *Arch. Virol.*, *68*, 147-152.
- Huang, Y. W., Dickerman, A. W., Piñeyro, P., Li, L., Fang, L., Kiehne, R., Opriessnig, T., & Meng, X. J. (2013). Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *mBio*, *4*(5), e00737-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00737-13>
- Jonsdottir, H. R., & Dijkman, R. (2016). Coronaviruses and the human airway: a universal system for virus-host interaction studies. *Virology journal*, *13*, 24. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0479-5>
- Kim, Y. I., Kim, S. G., Kim, S. M., Kim, E. H., Park, S. J., Yu, K. M., Chang, J. H., Kim, E. J., Lee, S., Casel, M. A. B., Um, J., Song, M. S., Jeong, H. W., Lai, V. D., Kim, Y., Chin, B. S., Park, J. S., Chung, K. H., Foo, S. S., Poo, H., Mo, I. P., Lee, O. J., Webby, R. J., Jung, J. U., & Choi, Y. K. (2020). Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets. *Cell Host Microbe*, *27*(5), 704–709.e2. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.023>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*, 111-120.
- Kirichenko, A., Poroshina, A., Sherbakov, D., Sadovsky, M., & Krutovsky, K. (2022). Comparative analysis of alignment-free genome clustering and whole genome alignment-based phylogenomic relationship of coronaviruses. *PloS one*, *17*(3), e0264640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264640>
- Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J. A., Lim, W., Rollin, P. E., Dowell, S. F., Ling, A. E., Humphrey, C. D., Shieh, W. J., Garner, J., Paddock, C. D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J. Y., Cox, N., Hughes, J. M., Leduc, J. W., Bellini, W. J., Anderson, L. J., et al. (2003). A novel

- coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, 348, 1953-1966. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030781>
- Lau, S. K., Li, K. S., Tsang, A. K., Lam, C. S., Ahmed, S., Chen, H., Chan, K. H., Woo, P. C., & Yuen, K. Y. (2013). Genetic characterization of Betacoronavirus lineage C viruses in bats reveals marked sequence divergence in the spike protein of *Pipistrellus* bat coronavirus HKU5 in Japanese pipistrelle: implications for the origin of the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Virology*, 87(15), 8638–8650. <https://doi.org/10.1128/JVI.01055-13>
- Lednicky, J. A., Tagliamonte, M. S., White, S. K., Elbadry, M. A., Alam, M. M., Stephenson, C. J., Bonny, T. S., Loeb, J. C., Telisma, T., Chavannes, S., Ostrov, D. A., Mavian, C., Beau De Rochars, V. M., Salemi, M., & Morris, J. G., Jr (2021). Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children. *Nature*, 600(7887), 133–137. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04111-z>
- Levin, R. (2018). DNA-Based Technique: Polymerase Chain Reaction (PCR). In *Modern Techniques for Food Authentication (Second Edition)*, (pp. 527-616). *Academic Press*. ISBN 9780128142646, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814264-6.00014-1>
- Li, S., Yang, J., Zhu, Z., & Zheng, H. (2020). Porcine Epidemic Diarrhea Virus and the Host Innate Immune Response. *Pathogens*, 9(5), 367. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050367>
- Li, G., Chen, Q., Harmon, L., Yoon, K., Schwartz, K., Hoogland, M., Gauger, P., Main, R., & Zhang, J. (2014). Full-length genome sequence of porcine Deltacoronavirus strain USA/IA/2014/8734. *Genome Announcements*, 2(2), e00278-e00214.
- Li, X., Luk, H. K. H., Lau, S. K. P., & Woo, P. C. Y. (2019). Human coronaviruses: general features. *Reference Module in Biomedical Sciences*, B978-0-12-801238-3.95704-0. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.95704-0>

- Li, Y., Wu, Q., Huang, L., et al. (2018). An alternative pathway of enteric PEDV dissemination from nasal cavity to intestinal mucosa in swine. *Nature Communications*, 9, 3811. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06056-w>
- Liu, Z., Qian, X., Hong, M., Zhang, J., Li, D., Wang, T., Yang, Z., Zhang, L., Wang, Z., Nie, H., Fan, K., Zhang, X., Chen, M., Sha, W., Roos, C., & Li, M. (2021). Global view on virus infection in non-human primates and implications for public health and wildlife conservation. *Zoological Research*, 42(5), 626-632. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2021.080>
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W. J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E. C., Gao, G. F., Wu, G., Chen, W., Shi, W., & Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395, 565-574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Lu, S., Zhao, Y., Yu, W., Yang, Y., Gao, J., Wang, J., Kuang, D., Yang, M., Yang, J., Ma, C., Xu, J., Qian, X., Li, H., Zhao, S., Li, J., Wang, H., Long, H., Zhou, J., Luo, F., Ding, K., et al. (2020). Comparison of nonhuman primates identified the suitable model for COVID-19. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 157. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00269-6>
- Luytjes, W., Bredenbeek, P. J., Noten, A. F., Horzinek, M. C., & Spaan, W. J. (1988). Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA 2: indications for RNA recombination between coronaviruses and influenza C virus. *Virology*, 166(2), 415-422. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90512-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90512-0)
- Masters, P. S. (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in virus research*, 66, 193-292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)

- Mendoza, P., & Murillo, Y. (2015). Aportes para el diseño de una Estrategia Nacional para el Control y Prevención del Tráfico de Fauna Silvestre. Wildlife Conservation Society. Documento de Trabajo N° 24. <http://peru.wcs.org/es-es/WCS-Per%C3%BA/Publicaciones.aspx>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI). (2015). Situación de las actividades de crianza y producción de porcinos. <https://www.midagri.gob.pe/portal/datero/40-sector-agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-producci/302-porcinos>
- Mihindukulasuriya, K., Wu, G., St Leger, J., Nordhausen, R., & Wang, D. (2008). Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *Journal of Virology*, 82(10), 5084–5088. <https://doi.org/10.1128/JVI.02722-07>
- MINSA. (2020, Mayo 4). Covid-19 tiene comportamiento diferente en los mercados [Press release]. <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/158836-munster-covid-19-tiene-comportamiento-diferente-en-los-mercados>
- MINAM. (2018). Listado de especies de Fauna Silvestre CITES-Perú. Dirección General de Diversidad Biológica. Lima. Perú.
- Morales, J., & Tirado, Y. (2022). *Susceptibilidad a la infección por SARS en el Perú: estudio in silicoCoV2 de mamíferos acuáticos presentes de la interacción de Spike con las proteínas de reconocimiento y procesamiento del virus*. [Tesis de pregrado, Universidad Peruana Cayetano Heredia].
- Moës, E., Vijgen, L., Keyaerts, E., Zlateva, K., Li, S., Maes, P., Pyrc, K., Berkhout, B., Van der Hoek, L., & Van Ranst, M. (2005). A novel pancoronavirus RT-PCR assay: Frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infectious Diseases*, 5, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-6>

- Munne, K., Bhanothu, V., Bhor, V., Patel, V., Mahale, S. D., & Pande, S. (2021). Detection of SARS-CoV-2 infection by RT-PCR test: Factors influencing interpretation of results. *Virus disease*, 32(2), 187–189. <https://doi.org/10.1007/s13337-021-00692-5>
- Munster, V., Feldmann, F., Williamson, B., van Doremalen, N., Perez-Perez, L., Schulz, J., Meade-White, K., Okumura, A., Callison, J., Brumbaugh, B., Avanzato, V., Rosenke, R., Hanley, P., Saturday, G., Scott, D., Fischer, E., & de Wit, E. (2020). Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature*, 585(7824), 268–272. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2324-7>
- Murphy, H. L., & Ly, H. (2021). Understanding the prevalence of SARS-CoV-2 (COVID-19) exposure in companion, captive, wild, and farmed animals. *Virulence*, 12(1), 2777–2786. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996519>
- Natarajan, P., & Miller, A. (2017). Recreational Infections. *Infectious Diseases*, 643–646.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00071-X>
- Nijman, V. (2021). Illegal and legal wildlife trade spreads zoonotic diseases. *Trends in Parasitology*, 37(5), 389-391. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.02.011>
- Núñez, G., Valentino, J., Granados, A., Ramírez, E., Zepeda, F., & Tintos, A. (2021). Aquatic biota is not exempt from coronavirus infections: An overview. *Water*, 13(16), 2215. <https://doi.org/10.3390>
- Oliveira, B., Oliveira, L., Sabino, E., & Okay, T. (2020). SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 62, e44. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202062044>
- OMS. (2020). Molecular assays to diagnose COVID-19: Summary table of available protocols. <https://www.who.int/es/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance>

- Ortiz, G. (2020). Pandemias, zoonosis y comercio de animales silvestres. *Revista de Bioética y Derecho*, 50, 19-35.
- Oude Munnink, B.B., Sikkema, R.S., Nieuwenhuijse, D.F., Molenaar, R.J., Munger, E., Molenkamp, R., & Koopmans, M.P.G. (2020). Jumping back and forth: anthroozoonotic and zoonotic transmission of SARS-CoV-2 on mink farms. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.09.01.277152>
- Pacheco, A., Moreno, S., & Medina, A. (2013). Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 12(3), 162-173.
- Peiris, J.S.M., Lai, S.T., Poon, L.L.M., Guan, Y., Yam, L.Y.C., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W.K.S., Yan, W.W., Cheung, M.T., Cheng, V.C.C., Chan, K.H., Tsang, D.N.C., Yung, R.W.H., Ng, T.K., & Yuen, K.Y. (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *The Lancet*, 361, 1319-1325. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13077-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13077-2).
- Pospischil, A., Stuedli, A., & KiupeL, M. (2002). Diagnostic notes update on porcine epidemic diarrhea. *Journal of Swine Health and Production*, 10, 81-85.
- Raj, V., Farag, E. A. B. A., Reusken, C. B. E. M., Lamers, M. M., Pas, S. D., Voermans, J., Smits, S. L., Osterhaus, A. D. M. E., Al-Mawlawi, N., Al-Romaihi, H. E., AlHajri, M. M., El-Sayed, A. M., Mohran, K. A., Ghobashy, H., Alhajri, F., Al-Thani, M., Al-Marri, S. A., El-Maghraby, M. M., Koopmans, M. P. G., & Haagmans, B. L. (2014). Isolation of MERS coronavirus from a dromedary camel, Qatar. *Emerging Infectious Diseases*, 20(8), 1339-1342. <https://doi.org/10.3201/eid2008.140663>
- Ratti, G., Stranieri, A., Giordano, A., Oltolina, M., Bonacina, E., Magnone, W., Morici, M., Ravasio, G., Paltrinieri, S., & Lauzi, S. (2022). Molecular detection of feline coronavirus in captive non-domestic felids from zoological facilities. *Animals*, 12(14), 1864. <https://doi.org/10.3390/ani12141864>

- Romero, P., Sánchez, M., Montero, S., & Tsukayama, P. (2021). Uso de genomas de SARS-CoV-2 para la estimación del número reproductivo efectivo (Rt) en Perú durante marzo y abril del 2020. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 38(2), 267-271. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.382.6417>
- Rubio, A., & Chavera, A. (2018). Peritonitis infecciosa felina: Dos casos clínicos en Lima-Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 381-388. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14188>
- Rush, E., Dale, E., & Aguirre, A. (2021). Illegal wildlife trade and emerging infectious diseases: Pervasive impacts to species, ecosystems and human health. *Animals*, 11, 1821. <https://doi.org/10.3390/ani11061821>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Salazar, M. (2022, August 17). Cada año 200 000 primates de Perú son objeto de tráfico con fines de comercio de mascotas o carne de animales silvestres. Noticias ambientales. <https://es.mongabay.com/2016/04/ano-200-000-primates-peru-objeto-trafico-fines-comercio-mascotas-carne-animales-silvestres/>
- Sasaki, Y., Alvarez, J., Sekiguchi, S., Sueyoshi, M., Otake, S., & Perez, A. (2016). Epidemiological factors associated with the spread of porcine epidemic diarrhea in Japan. *Preventive Veterinary Medicine*, 123, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.11.002>
- Scott, A., & Baum, A. (2016). Phylogenetic Tree. In R. M. Kliman (Ed.), *Encyclopedia of Evolutionary Biology* (pp. 270–276). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00203-1>.
- SERFOR. (2017). Estrategia Nacional para Reducir el Tráfico Ilegal de Fauna Silvestre al 2027 en el Perú, período 2017 – 2027 y su Plan de Acción 2017 – 2022.

<https://www.serfor.gob.pe/portal/wp-content/uploads/2017/09/presentacion-de-la-estrategia-nacional-para-reducir-el-trafico-ilegal-de-fauna-silvestre.pdf>

- Shabani, E., Dowlatsahi, S., & Abdekhodaie, M. J. (2021). Laboratory detection methods for the human coronaviruses. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40(2), 225–246. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04001-8>
- Shen, C. (2019). Amplification of nucleic acids. In *Diagnostic Molecular Biology* (pp. 215–247). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00009-2>
- Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., Chen, H., & Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*, 368, 1016–1020. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
- Simas, P., Barnabe, A., Durães, R., Neto, D., Caserta, L., Artacho, L., Jacomassa, F., Martini, M., Bianchi, M., Felipe, P., Ferreira, H., & Arns, C. W. (2015). Bat coronavirus in Brazil related to Appalachian ridge and porcine epidemic diarrhea viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 21, 729–731. <https://doi.org/10.3201/eid2104.141783>
- Singh, A., Shaikh, A., Singh, R., & Singh, A. (2020). COVID-19: From bench to bedside. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 14, 277-281.
- Singh, D., & Yi, S. (2021). On the origin and evolution of SARS-CoV-2. *Experimental & Molecular Medicine*, 53, 537-547. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00604-z>
- Sit, T. H., Brackman, C. J., Ip, S. M., Tam, K. W., Law, P. Y., To, E. M., Yu, V. Y., Sims, L. D., Tsang, D. N., Chu, D. K., Perera, R. A., Poon, L. L., & Peiris, M. (2020). Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature*, 586, 776–778 <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2334-5>.

- Smith, G. R., Lester, T. L., Heberling, R. L., & Kalter, S. S. (1982). Coronavirus-like particles in nonhuman primate feces. *Archives of Virology*, 72(1-2), 105-111. <https://doi.org/10.1007/BF01314455>
- Song, D. S., & Park, B. K. (2012). Porcine epidemic diarrhea virus: A comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*, 44(2), 167-175. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0713-1>
- South, N., & Wyatt, T. (2011). Comparing illicit trades in wildlife and drugs: An exploratory study. *Deviant Behavior*, 32, 538-561. <https://doi.org/10.1080/01639625.2010.483162>
- Stout, A. E., André, N. M., & Whittaker, G. R. (2021). Feline coronavirus and feline infectious peritonitis in non-domestic felid species. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 52, 14-27. <https://doi.org/10.1638/2020-0134>
- Supatrim, C. (2014). Bioinformatics for Beginners || Phylogenetic Analysis. *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410471-6.00009-8>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 678–687.
- Wan, P., & Che, D. (2013). Constructing phylogenetic trees using interacting pathways. *Bioinformatics*, 9(7), 363–367. <https://doi.org/10.6026/97320630009363>
- Wang, Y., Tu, X., Humphrey, C., McClure, H., Jiang, X., Qin, C., Glass, R. I., & Jiang, B. (2007). Detection of viral agents in fecal specimens of monkeys with diarrhea. *Journal of Medical Primatology*, 36(2), 101–107. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2006.00167.x>

- Wang, Y., Grunewald, M., & Perlman, S. (2020). Coronaviruses: An updated overview of their replication and pathogenesis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2203, 1–29. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0900-2_1
- Wang, Q., Zhou, Z., You, Z., et al. (2021). Epidemiology and evolution of novel Deltacoronaviruses in birds in central China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 00, 1–13. <https://doi.org/10.1111/tbed.14029>
- Wheeler, D., & Bhagwat, M. (2007). BLAST QuickStart: Web-based BLAST tutorial based on examples. In N. H. Bergman (Ed.), *Comparative genomics: Vol. 1 & 2* (Chapter 9). Humana Press.
- Wong, A., Li, X., Lau, S., & Woo, P. (2019). Global epidemiology of bat coronaviruses. *Viruses*, 11(2), <https://doi.org/10.3390/v11020174>
- Woo, P. C., Lau, S. K., Huang, Y., & Yuen, K. Y. (2009). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Experimental Biology and Medicine*, 234, 1117-1127. <https://doi.org/10.3181/0903-MR-94>
- Woo, P., Lau, S., Lam, C., Lau, C., Tsang, A., Lau, J., Bai, R., Teng, J., Tsang, C., Wang, M., Zheng, B. J., Chan, K., & Yuen, K. (2012). Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and Betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of Gammacoronavirus and deltacoronavirus. *Journal of Virology*, 86, 3995-4008. <https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11>
- Woo, P., Huang, Y., Lau, S., & Yuen, K. (2010). Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*, 2(8), 1804-1820. <https://doi.org/10.3390/v2081803>
- Wu, Z., Yang, L., Ren, X., Zhang, J., Yang, F., Zhang, S., & Jin, Q. (2016). ORF8-related genetic evidence for Chinese horseshoe bats as the source of human severe acute respiratory

- syndrome coronavirus. *Journal of Infectious Diseases*, 213(4), 579-583.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiv476>
- Yuan, P., Yang, Z., Song, H., Wang, K., Yang, Y., Xie, L., Huang, S., Liu, J., Ran, L., & Song, Z. (2018). Three main inducers of alphacoronavirus infection of enterocytes: Sialic acid, proteases, and low pH. *Intervirology*, 1-11. <https://doi.org/10.1159/000492424>
- Yuen, K., Lau, S., & Woo, P. (2012). Wild animal surveillance for coronavirus HKU1 and potential variants of other coronaviruses. *Hong Kong Medical Journal*, 18(Suppl 2), 25-26.
- Zaki, A., van Boheemen, S., Bestebroer, T., Osterhaus, A., & Fouchier, R. (2012). Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*, 367, 1814-1820. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721>
- Zhang, T., Wu, Q., & Zhang, Z. (2020). Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. *Current Biology*, 30, 1346-1351.e2.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.022>
- Zhang, G., Cowled, C., Shi, Z., Huang, Z., Bishop-Lilly, K. A., Fang, X., Wynne, J. W., Xiong, Z., Baker, M. L., Zhao, W., Tachedjian, M., Zhu, Y., Zhou, P., Jiang, X., Ng, J., Yang, L., Wu, L., Xiao, J., Feng, Y., Chen, Y., *et al.* (2013). Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6118), 456–460. <https://doi.org/10.1126/science.1230835>
- Zhong, N. S., Zheng, B. J., Li, Y. M., Poon, Xie, Z. H., Chan, K. H., Li, P. H., Tan, S. Y., Chang, Q., Xie, J. P., Liu, X. Q., Xu, J., Li, D. X., Yuen, K. Y., Peiris, & Guan, Y. (2003). Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet (London, England)*, 362(9393), 1353–1358. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)14630-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)14630-2).

Zhou, Z., Qiu, Y., & Ge, X. (2021). The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order. *Animal diseases*, 1(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s44149-021-00005-9>

Zhu, S., Zimmerman, D., & Deem, S. L. (2019). A Review of Zoonotic Pathogens of Dromedary Camels. *EcoHealth*, 16(2), 356–377. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01413-7>

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para la extracción de ARN con el “*kit*” Purelink Viral RNA/DNA.

Preparación de los lisados

1. Añadir 25 µL de Proteinasa K al tubo con la muestra.
2. Agregar 200 µL de “*Lysis Buffer*” (contenido 5.6 µg de “*Carrier RNA*”)
3. Para combinar el “*Lysis Buffer*” con el *Carrier RNA*” seguir la siguiente fórmula:

$$M = n \times 0.21 \text{ mL de “} \mathbf{Buffer Lysis} \mathbf{”}$$

Donde:

n: número de muestras

Luego:

$$M \times 28 \text{ µL}$$

Agregar dicha cantidad de “*Carrier RNA*”

4. Cerrar el tubo 8 y agitar en vórtex por 15 segundos.
5. Añadir 250 µL de etanol 96-100% al tubo, cerrar la tapa y volver a mezclar por otros 15 segundos.
6. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.

Purificación del ARN

7. Agregar el lisado a la columna “*Viral Spin*” dentro de un tubo de colecta.
8. Centrifugar la columna a 6800 G por 1 minuto. Posterior a ello, descartar el tubo de colecta y colocar la columna en un nuevo tubo de lavado.
9. Lavar la columna con 500 µL de “*Wash buffer*” (WII) con etanol y centrifugar a 6800 G durante 1 minuto. Descartar el contenido.
10. Repetir el paso anterior lavando con el “*Wash buffer*” (WII).
11. Descartar el tubo de colecta y colocar la columna en un nuevo tubo de lavado.
12. Llevar a centrífuga a la máxima velocidad (20 000 G) por 1 minuto para remover cualquier residuo del buffer de lavado.

13. La columna colocarla en un tubo limpio de recogida con capacidad de 1.7 mL.
14. Eludir con 30 μ L de agua libre de ARNasa e incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
15. Centrifugar la columna nuevamente a la máxima velocidad por 1 minuto para eludir los ácidos nucleicos. Una vez hecho esto ya se puede eliminar la columna.
16. Guardar el ARN purificado a -80°C para la amplificación por PCR.

Anexo 2.

Características y resultados de los 54 primates muestreados.

Código	Año	Muestra	Sexo	Día de necropsia	Edad	Tráquea PCR_2	Recto PCR_2	Secuenciación
1	2022	<i>Cebus</i> sp.	Macho	1/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	---
		<i>Saimiri</i>						---
2	2022	<i>sciureus</i>	Macho	1/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	
3	2022	<i>Saguinus</i> sp.	Macho	1/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	---
4	2022	<i>Saguinus</i> sp.	Macho	1/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	---
		<i>Saimiri</i>						---
5	2022	<i>sciureus</i>	Macho	1/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	
		<i>Saimiri</i>						---
6	2022	<i>boliviensis</i>	Macho	1/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	
		<i>Saimiri</i>						---
7	2022	<i>sciureus</i>	Macho	1/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	
		<i>Saimiri</i>						---
8	2022	<i>sciureus</i>	Macho	1/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	
11	2022	<i>Lagothrix</i> sp.	Macho	11/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	---

Código	Año	Muestra	Sexo	Día de necropsia	Edad	Tráquea PCR_2	Recto PCR_2	Secuenciación
12	2022	<i>Aotus</i> sp.	Hembra	11/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	---
13	2022	<i>Cebus</i> sp.	Macho	11/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	---
14	2022	<i>Saguinus</i> sp.	Hembra	11/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	---
16	2022	<i>Cebus</i> sp.	Macho	11/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	---
17	2022	<i>Saimiri sciureus</i>	Macho	11/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	---
18	2022	<i>Saimiri sciureus</i>	Macho	11/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	---
19	2022	<i>Saimiri sciureus</i>	Macho	11/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	---
33	2022	<i>Cebus</i> sp.	Macho	16/02/2022	Juvenil	Negativo	Negativo	---
1	2021	<i>Saimiri sciureus</i>	Macho	24/03/2021	Cría	Negativo	Negativo	---
2	2021	<i>Saguinus</i> sp.	Macho	24/03/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---
3	2021	<i>Cebus</i> sp.	Macho	24/03/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---

Código	Año	Muestra	Sexo	Día de necropsia	Edad	Tráquea PCR_2	Recto PCR_2	Secuenciación
4	2021	<i>Saguinus</i> sp.	Hembra	24/03/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---
9	2021	<i>Cebus</i> sp.	Hembra	31/03/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---
20	2021	<i>Lagothrix</i> sp.	Macho	31/03/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---
48	2021	<i>Saguinus</i> sp.	Hembra	5/05/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---
53	2021	<i>Saguinus</i> sp.	Hembra	19/05/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---
		<i>Saimiri</i>						---
54	2021	<i>sciureus</i>	Macho	19/05/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	
62	2021	<i>Cebus</i> sp.	Macho	11/06/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---
64	2021	<i>Cebus</i> sp.	Macho	19/06/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---
66	2021	<i>Cebus</i> sp.	Macho	25/06/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---
67	2021	<i>Cebus</i> sp.	Hembra	25/06/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---
68	2021	<i>Cebus</i> sp.	Macho	25/06/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---
78	2021	<i>Cebus</i> sp.	Macho	13/08/2021	Juvenil	Positivo	Negativo	Virus de la diarrea

Código	Año	Muestra	Sexo	Día de necropsia	Edad	Tráquea PCR_2	Recto PCR_2	Secuenciación
								epidémica del porcino
80	2021	<i>Cebus sp.</i>	Macho	13/08/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---
								Virus de la diarrea epidémica del porcino
84	2021	<i>Saimiri sciureus</i>	Macho	3/09/2021	Juvenil	Positivo	Negativo	epidémica del porcino
85	2021	<i>Saguinus sp.</i>	Macho	3/09/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---
87	2021	<i>Cebus sp.</i>	Macho	10/09/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---

89	2021	<i>Saimiri sciureus</i>	Macho	10/09/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---

91	2021	<i>Saimiri sciureus</i>	Macho	22/09/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	---
								Virus de la diarrea epidémica del porcino
92	2021	<i>Saimiri sciureus</i>	Macho	22/09/2021	Juvenil	Positivo	Negativo	epidémica del porcino

Código	Año	Muestra	Sexo	Día de necropsia	Edad	Tráquea PCR_2	Recto PCR_2	Secuenciación
		<i>Saimiri</i>						---
93	2021	<i>sciureus</i>	Macho	22/09/2021	Juvenil	Negativo	Negativo	
7	2020	<i>Cebus</i> sp.	Macho	14/08/2020	Juvenil	Negativo	Negativo	---
9	2020	<i>Lagothrix</i> sp.	Hembra	14/08/2020	Juvenil	Negativo	Negativo	---
10	2020	<i>Lagothrix</i> sp.	Macho	14/08/2020	Juvenil	Negativo	Negativo	---
12	2020	<i>Lagothrix</i> sp.	Macho	21/08/2020	Juvenil	Negativo	Negativo	---
13	2020	<i>Lagothrix</i> sp.	Hembra	21/08/2020	Juvenil	Negativo	Negativo	---
19	2020	<i>Aotus</i> sp	Macho	11/11/2020	Juvenil	Negativo	Negativo	---
								Virus de la diarrea epidémica del porcino
20	2020	<i>Aotus</i> sp	Hembra	11/11/2020	Cría	Positivo	Negativo	
								Virus de la diarrea epidémica del porcino
22	2020	<i>Cebus</i> sp.	Hembra	25/11/2020	Juvenil	Positivo	Negativo	

Código	Año	Muestra	Sexo	Día de necropsia	Edad	Tráquea PCR_2	Recto PCR_2	Secuenciación
23	2020	<i>Cebus</i> sp.	Macho	25/11/2020	Juvenil	Positivo	Negativo	Coronavirus felino
27	2020	<i>Cebus</i> sp.	Macho	2/12/2020	Juvenil	Negativo	Negativo	---
28	2020	<i>Cebus</i> sp.	Macho	2/12/2020	Juvenil	Negativo	Negativo	---
29	2020	<i>Cebus</i> sp.	Macho	2/12/2020	Juvenil	Negativo	Negativo	---
30	2020	<i>Saimiri sciureus</i>	Hembra	2/12/2020	Juvenil	Negativo	Negativo	---
34	2020	<i>Ateles</i> sp.	Hembra	29/12/2020	Juvenil	Negativo	Negativo	---

Anexo 3.*Lista de secuencias empleadas para construir la filogenia.*

Especie de virus	Número de acceso	Hospedero	País donde fue identificado
FCoV	HQ012370.1	Felino	Países Bajos
FCoV	HQ392471.1	Felino	Países Bajos
FCoV	MT444152.1	Felino	China
HCoV	AF304460.1	Humano	Alemania
BCoV	AF391541.1	Bovino	Estados Unidos
HCoV	AY391777.1	Humano	Reino Unido
HCoV	AY567487.2	Humano	Países Bajos
FIPV	AY994055.1	Felino	Estados Unidos
BCoV	DQ915164.2	Alpaca	Estados Unidos
BtCoV	EU420139.1	Murciélago	Hong Kong
FCoV	FJ938056.1	Gato	Países Bajos
CCoV	GQ477367.1	Perro	Taiwán
		Visón	
MCoV	HM245925.1	americano	Estados Unidos
PCoV	JQ065042.2	Cerdo	China
HCoV	JX869059.2	Humano	Arabia Saudita
DCCoV	KF906249.1	Dromedario	Estados Unidos
PCoV	KR265855.1	Cerdo	Estados Unidos
SARS-CoV	KY352407.1	Murciélago	Kenia
BtCoV	MG762674.1	Murciélago	China
BtCoV	MH002341.1	Murciélago	China
PCoV	MH025764.1	Cerdo	China
SADS-CoV	MK651076.1	Jabalí	China

Especie de virus	Número de acceso	Hospedero	País donde fue identificado
PEDV	MK702008.1	Cerdo	China
BtCoV	MN187553.1	Murciélago	Singapur
PEDV	MN692791.1	Cerdo	España
SARS-CoV-2	MN908947.3	Humano	China
MERS-CoV	MT226607.1	Dromedario	Arabia Saudita
FCoV	MW030108.1	Gato	China
PEDV	NC_003436.1	Cerdo	Suiza
SARS-CoV	NC_004718.3	Humano	Canadá
CamelCoV	NC_028752.1	Camello	Arabia Saudita
SARS-CoV-2	NC_045512.2	Humano	China
MERS-CoV	OL622036.1	Humano	Arabia Saudita
SARS-CoV	OL674079.1	Murciélago	China
BCoV	U00735.2	Bovino	Estados Unidos
PEDV	KJ645635.1	Cerdo	Estados Unidos
PEDV	KR265817.1	Cerdo	Estados Unidos

Anexo 4.

Espécimen de Saimiri sp. recolectado del SERFOR.



Anexo 5.

Espécimen de Cebus sp. colectado del SERFOR.



Anexo 6.

Constancia de Autorización Ética de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA)



Constancia de Autorización Ética N°. 2021-14

El Comité de Ética y de Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, expide la presente **Constancia de Autorización Ética** al proyecto “Vigilancia epidemiológica del SARS-CoV-2 en mamíferos silvestres incautados por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre del Perú y otras Autoridades Regionales Forestales y de Fauna Silvestre”, presentado por el investigador Luis Antonio Gómez Puerta con código CEBA 2021-14

Atentamente



UNMSM

Firmado digitalmente por DELGADO
CASTRO Alfredo FAU 20148092282
sof
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 06.07.2021 23:27:56 -05:00

Presidente del Comité de Ética y de Bienestar Animal