Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
Unidad de Posgrado

Identificación molecular de coronavirus en mamíferos y aves silvestres incautados y hallados por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) en Lima, Perú

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal

AUTOR

Lisseth Magaly LEIVA HERRERA

ASESOR

Mg. Luis Antonio GÓMEZ PUERTA

Lima, Perú

2025



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

Leiva L. Identificación molecular de coronavirus en mamíferos y aves silvestres incautados y hallados por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) en Lima, Perú [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2025.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Lisseth Magaly Leiva Herrera
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	46843752
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0007-0777-9319
Datos de asesor	
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	Mercy Gisela Ramírez Velásquez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10713781
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Walter Hugo Silva Suárez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07521115
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Gladis Susana Atías Vásquez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	05391049
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	
Tipo de documento	
Número de documento de identidad	

Datos de investigación	
Línea de investigación	B.4.4. SALUD PÚBLICA VETERINARIA B.4.4.1. Medicina Veterinaria preventiva
Grupo de investigación	Ateneo abocado a responder amenazas y oportunidades del Sector Pecuario
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado Proyecto de Investigación Multidisciplinarios con RR-016238-2020
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Epidemiologia e Economía Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Centro poblado: No aplica Urbanización: No aplica Manzana y lote: No aplica Calle: Av. Circunvalación Cuadra 28 Latitud: 12° 04' 50" Longitud: 76° 59' 09"
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Enero 2020- Diciembre 2022
URL de disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON MENCIÓN EN SALUD ANIMAL

En la Sala de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 11:00 horas del día lunes 21 de julio del 2025, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por la Mg. Mercy Gisela Ramírez Velásquez y conformado por los siguientes miembros docentes: Mg. Walter Hugo Silva Suárez, Dra. Gladis Susana Atías Vásquez y Mg. Luis Antonio Gómez Puerta (asesor), se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis titulada:

"IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CORONAVIRUS EN MAMÍFEROS Y AVES SILVESTRES INCAUTADOS Y HALLADOS POR EL SERVICIO NACIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE (SERFOR) EN LIMA, PERÚ", presentado por la Bachiller en Medicina Veterinaria:

LISSETH MAGALY LEIVA HERRERA

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **MUY BUENO, (16) DIECISÉIS**

A continuación, el Jurado por intermedio de su Presidente recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal, a la Bachiller en Medicina Veterinaria Lisseth Magaly Leiva Herrera.

Siendo las 12:25 horas del día lunes 21 de julio de 2025, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

Mg. Mercy Gisela Ramírez Velásquez (P.P.D.E.)
Presidente

Mg. Walter Hugo Silva Suárez
Miembro

Dra. Gladis Susana Atías Vásquez (P.A.D.E.)
Miembro

Mg. Luis Antonio Gómez Puerta (P.P.D.E)
Miembro Asesor

Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Luis Antonio Gómez Puerta en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Directoral N°021-UPG-FMV-2022 de la tesis, cuyo título es "IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CORONAVIRUS EN MAMÍFEROS Y AVES SILVESTRES INCAUTADOS Y HALLADOS POR EL SERVICIO NACIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE (SERFOR) EN LIMA, PERÚ", presentado por la bachiller en Medicina Veterinaria Lisseth Magaly Leiva Herrera para optar el grado de Magister en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 11% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Lima, 17 de febrero de 2025



Firma del Asesor:

Nombres y Apellidos del asesor: Luis Antonio Gómez Puerta

DNI: 10810335

DEDICATORIA

Esta Tesis esta dedicada a Dios, porque acompaña mi vida, con su gracia, amor y protección. A mis padres por su ejemplo de perseverancia y superación. Al Dr. Luis Gomez por fortalecer y dirigir mi camino en la investigacion veterinaria. Al estudiante que reflexiona, cuestiona y se enfoca por conocer más de la ciencia.

AGRADECIMIENTO

A mi familia por ser el pilar de mi crecimiento y desarrollo.

Al Dr Luis Gomez por todo su apoyo y confianza durante la realización de la tesis.

Al Laboratorio de Epidemiologia e Economía Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por permitirme ser parte del proyecto de investigacion.

Al Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) por ser parte fundamental en este proyecto.

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.

ÍNDICE

RESUMEN iii

ABSTRACT iv

LISTA DE CUADROS v

LISTA DE FIGURAS vii

LISTA DE ANEXOS viii

I. INTRODUCCIÓN 1

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 2.1

Coronavirus 2.1.1

Generalidades 3

2.1.2 Clasificación 4

2.1.2.1. Alfacoronavirus 4

2.1.2.2. Betacoronavirus 4

2.1.2.3. Deltacoronavirus 5

2.1.2.4. Gammacoronavirus 5

2.1.3. Mecanismo de Entrada Viral 5

2.1.4. Receptores de la celula hospedera 5

2.1.5. Propiedades Moleculares del Coronavirus 6

2.1.5.1. Estructura molecular del virus 6

a. Proteina Spike 6

2.1.5.2. Estructura involucradas en la Replicación Viral 7

a. Proteina no estructurales 7

b. Proteina accesorias 10

2.1.5.3. Estructura involucradas en el ensamblaje viral 11

a. Proteina de la Nucleocapside 11

b. Proteina de la Membrana 11

c. Proteina de la Envoltura 12

2.2 Coronavirus en animales 12

2.2.1. Coronavirus en caninos 12

2.2.2. Coronavirus en felinos 13

2.2.3. Coronavirus en porcinos 14

2.2.3.1. Alfacoronavirus porcino 14

2.2.3.2. Betacoronavirus porcino 16

2.2.3.3. Deltacoronavirus 16

2.2.4. Coronavirus en Bovino 17

a. Forma entérica en terneros 17

b. Forma entérica en bovinos adultos 17

c. Forma respiratoria 19

2.2.4.1. BCoV en pequeños rumiantes 19

2.2.5 Coronavirus aviar 20

2.2.6. Coronavirus en murcielago 20

2.2.3.3. Deltacoronavirus 23

2.3 Potencial zoonotico de los coronavirus 23

2.3.1. Coronavirus en el humano 23

a. Modelos experimentales 24

2.3.2. Coronavirus en el Interface Humano-Animal 32

2.4. Pruebas diagnósticas ..... 2.4.1.

Aislamiento Viral 35

2.4.2. Detección de antigenos virales 37

2.4.3. Diagnóstico serologico 37

2.4.4. Diagnóstico molecular 39

III. MATERIALES Y MÉTODOS 40

3.1 Materiales 40

3.1.1. Lugar de Estudios……40

3.1.2. Tamaño muestral……40

3.2. Metodos……...…40

3.2.1. Colección de muestras…….…40

3.2.2. Extracción de ARN…….40

3.2.3. RT-PCR…….…..41

3.2.4. Analisis de Secuencias…….42

IV. RESULTADOS 44

V. DISCUSION 53

VII. CONCLUSIONES 61

VIII. LITERATURA CITADA 62

IX. ANEXOS 94

RESUMEN

Los coronavirus infectan una amplia variedad de animales y humanos; originando enfermedades de leve a grave intensidad. Desde las emergencias sanitarias de los coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV 2), se ha conocido el potencial del virus para cruzar la barrera interespecies. El presente estudio tuvo como objetivo identificar molecularmente las especies de coronavirus presentes en animales silvestres incautados y hallados por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) en Lima, Perú. Se colecto muestras de mucosa mediante hisopados orofaringeos y rectales o cloacales de mamíferos y aves silvestres, respectivamente. Mediante un protocolo de RT-PCR, se emplearon iniciadores que amplificaron la región ORF1ab. El estudio incluyo 28 mamíferos y 131 especies de aves. Pancoronavirus fue detectado en 14.3% y 4.6 % de muestras de mamíferos y aves respectivamente. En mamíferos, las muestras positivas pertenecían al género *Alphacoronavirus*, el análisis de la secuencia parcial de la región ORF1ab reveló que nueve secuencias pertenecían al subgénero *Pedacovirus* y compartían hasta 100 % de identidad de nucleótidos con el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV). Las secuencias amplificadas provenientes de aves dieron positivo a Deltacoronavirus (n = 1), Gammacoronavirus (n = 2) y *Alphacoronavirus* (n = 3). El análisis filogenético reveló que los coronavirus en aves tuvieron una similitud de 99.03 %, 97.5% y 99.1 % con el coronavirus del halcón Peregrino, el coronavirus del pato y el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), respectivamente. Se concluye que la diversidad de coronavirus en mamíferos silvestres demuestra la dinámica de la evolución y circulación del virus en estas especies, sugiriendo plantear estrategias de vigilancia filogenética del coronavirus para prevenir futuras epidemias.

Palabras clave: Pancoronavirus; ORF1ab; Alphacoronavirus; Perú

ABSTRACT

Coronaviruses infect a wide variety of animals and humans, causing diseases ranging from mild to severe. Since the health crises caused by SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2, we have understood that these viruses can jump from animals to humans. The present study aimed to molecularly identify the coronavirus species present in wild animals seized and found by the National Forest and Fauna Service (SERFOR) in Lima, Peru. Mucosal samples were collected through oropharyngeal and rectal swabs from wild mammals and birds. We used an RT-PCR protocol with initiators to amplify the ORF1ab region. The study included 28 mammals and 131 bird species. Pancoronavirus was detected in 14.3% and 4.6% of mammalian and bird samples, respectively. In mammals, the positive samples belonged to the genus *Alphacoronavirus*; the analysis of the partial sequence of the ORF1ab region revealed that nine sequences belonged to the *Pedacovirus* subgenre and shared up to 100% nucleotide identity with the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). The amplified sequences from birds positively gave *Deltacoronavirus* (n = 1), *Gammacoronavirus* (n = 2) and *Alphacoronavirus* (n = 3). The phylogenetic analysis revealed that the coronavirus in birds had a similarity of 99.03%, 97.5% and 99.1 % with the coronavirus of the peregrine falcon, the coronavirus of the duck and the virus of the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), respectively. It is concluded that the diversity of coronavirus in wild mammals demonstrates the dynamics of the evolution and circulation of the virus in these species, suggesting raising phylogenic surveillance strategies of the coronavirus to prevent future epidemics.

Keywords: Pancoronavirus; ORF1b; Alphacoronavirus; Perú

LISTA DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1.	Coronavirus con patología entérica en porcinos	15
Cuadro 2.	Modelos experimentales de SARS, MERS, SARS CoV 2 en Primates no humanos	25
Cuadro 3.	Modelos experimentales de SARS y SARS CoV 2 en Ratones de laboratorio	29
Cuadro 4.	Modelos experimentales de SARS y SARS CoV 2 en mascotas	29
Cuadro 5.	Modelos experimentales de SARS y SARS CoV 2 en hurones	30
Cuadro 6.	Modelos experimentales de SARS, MERS, SARS CoV 2 en otros animales	31
Cuadro 7.	Modelos experimentales de SARS, MERS, SARS CoV 2 en animales de producción	31
Cuadro 8.	Líneas celulares utilizadas para aislamiento de coronavirus	36
Cuadro 9.	Mamíferos decomisados y rescatados por SERFOR en Lima, Perú (periodo enero 2020 – diciembre 2022)	44
Cuadro 10	Frecuencia de detección de pancoronavirus en mamiferos	45
Cuadro 11.	Identificación molecular de coronavirus en mamiferos incautados y rescatados por SERFOR en Lima, Perú	47

Cuadro 12. Aves silvestres decomisadas y rescatadas por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre del Perú 49

Cuadro 13 Frecuencia de detección de pancoronavirus en aves 50

Cuadro 14. Identificación molecular de coronavirus en aves silvestres incautadas y rescatadas por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre del Perú 51

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Representación esquemática de los genomas del sindrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV)	6
Figura 2.	Coronavirus y sus proteínas estructurales	11
Figura 3.	Escenarios antropozoonóticos que fomentaron la dispersión de SARS y MERS en los humanos	32
Figura 4.	Árbol filogenético simplificado de los coronavirus relacionados con el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERSr-CoV)	33
Figura 5.	Diagnóstico molecular del coronavirus en mamíferos silvestres mediante un análisis de RT-PCR anidada de la region ORF1ab	46
Figura 6.	Árbol filogenético topográfico de los coronavirus (Alphacoronavirus Betacoronavirus y Gammacoronavirus), construido a partir de 21 cepas de referencia y 10 cepas identificadas en este estudio	48
Figura 7.	Árbol filogenético topográfico de los coronavirus (grupos AlphaCoV, BetaCoV y GammaCoV) utilizando 49 cepas de referencias y seis cepas identificadas en este estudio	52

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Resolución de autorización IFS-2021-005 del proyecto por el Servicio Nacional de Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR)	95
Anexo 2	Carta de Aprobación del Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA)	96
Anexo 3	Protocolo para la toma de muestras biológicas	97

I. INTRODUCCIÓN

Los virus pertenecientes a la Familia *Coronaviridae* están constituidos por una cadena simple de ARN de sentido positivo, que comprende dos tercios del ARN viral traducidos en dos poliproteinas y el resto del genoma viral se transcribe en un conjunto anidado de ARNs mensajeros subgenómicos (De wit *et al*., 2016; Masters, 2006). Los coronavirus causan infecciones respiratorias, intestinales, hepáticas, e incluso desencadenan infecciones sistémicas en animales y humanos y son transmitidos por vías respiratorias o mediante el contacto fecal-oral (Saif, 2004; Woo *et al*., 2012). El coronavirus causante de síndrome respiratorio agudo severo (SARS-Cov) y el coronavirus responsable del síndrome respiratorio del medio oeste (MERS-Cov) han demostrado alta patogenicidad en seres humanos a comparación de las cepas de coronavirus HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 y HKU1 que causan leves síntomas respiratorios en humanos (Cui *et al*., 2019; Masters, 2019). Desde la aparición de estas enfermedades, se han realizados diversos estudios que han ayudado a entender la biología del coronavirus y la transmisión desde los animales a humanos. Estos estudios 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; Yuen *et al*., 2012).

El nuevo Betacoronavirus que apareció en diciembre de 2019 y que origino casos de neumonía en humanos de Wuhan en China, catalogado como SARS-CoV-2, se expandió rápidamente y fue propagándose a todo el mundo, convirtiéndose en la mayor pandemia de la última década (Dhama *et al*., 2020; Zhu *et al*., 2020). Estudios científicos basados en caracterizar molecularmente las proteínas de SARS CoV 2 (Lu *et al*., 2020) propusieron la similitud de la proteína S del coronavirus que se detectó en el Pangolín con

el SARS-CoV-2 del ser humano, posicionando al mamífero silvestre como posible hospedero intermediario del virus, lo que sugiere que los mamíferos silvestres pueden actuar como amplificadores de la enfermedad, siendo una preocupación para la salud pública (Zhang *et al*., 2020). Asimismo, se han reconocido variantes del SARS CoV 2 que fueron transmitidas a felinos domesticos y silvestres, hurones y visones (Abdel-Moneim y Abdelwhab, 2020; Pomorska-Mól *et al.,* 2021; Yoo y Yoo, 2020).

En el Perú se alberga una de las mayores diversidades de animales silvestres del mundo. Sin embargo, en nuestro país existe comercio ilegal de muchas especies silvestres (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). Los estudios epidemiológicos realizados por el Ministerio de Salud del Perú han indicado prevalencias de hasta 100% para SARS CoV 2 en seres humanos que laboran en mercados (MINSA, 2020). En este contexto, los animales silvestres usados en el comercio ilegal estarían muy expuestos a coronavirus emergentes. Sumado a ello, los escenarios potenciales de transmisión como los mercados, zoológicos y centros de rescate, constituyen un riesgo para la propagación del coronavirus entre especies. Por esta razón, el presente trabajo buscar identificar Coronavirus mediante la técnica RT- PCR anidado en muestras de hisopados orofaringeos y rectales de animales silvestres incautados y hallados por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre en Lima durante el periodo de enero 2020 a diciembre 2022.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Coronavirus

2.1.1. Generalidades

Los coronavirus pertenecen a la Subfamilia *Orthocoronavirinae*, Familia *Coronaviridae*, Orden Nidovirales, Clase Pisoniviricetes y Filo Pisuviricota. Su genoma consiste en una cadena simple de ARN de sentido positivo (Masters, 2006).

Los coronavirus poseen elevada frecuencia de recombinación con tendencia a expresarse en altas tasas de mutaciones (Woo *et al*., 2012; Lau. *et al*., 2013). Desde la primera aparición del virus de la bronquitis infecciosa en 1937, se ha desarrollado la vigilancia constante de coronavirus causantes de enfermedades de carácter clínico en mamíferos como los bovinos, porcinos, camélidos; así como en aves de corral y animales de compañía (Woo *et al*., 2009).

El surgimiento de un coronavirus potencialmente patógeno para el humano en el 2003, fomentó el inicio de investigaciones de estos virus en muchos reservorios animales, incluyendo los de vida silvestre y animales de compañía; en búsqueda de soluciones que frenen la cadena de transmisión zoonótica (Menachery *et al*., 2015; Monchatre-Leroy *et al*., 2017). Sin embargo, en diciembre del 2019, debido a las débiles medidas sanitarias de contención, el coronavirus SARS CoV-2 originó múltiples repercusiones para el ser humano a nivel mundial, ocasionando una pandemia (Zhang *et al*., 2020).

2.1.2. Clasificación

La Familia Coronaviridae, con base a su relación filogenética y sus estructuras genómicas se divide en cuatro géneros: Alfacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus y Deltacoronavirus. Generalmente los Alfacoronavirus y Betacoronavirus causan enfermedad respiratoria y gastrointestinal en humanos y animales. Por otro lado, los Gammacoronavirus y Deltacoronavirus infectan principalmente a las aves, pero en ocasiones pueden infectar a mamíferos (Cui *et al*., 2019).

2.1.2.1. Alfacoronavirus

Los Alfacoronavirus se dividen en 15 subgéneros nombrados como Luchacovirus, Decacovirus, Nyctacovirus, Minunacovirus, Pedacovirus, Colacovirus, Myotacovirus, Duvinacovirus Setracovirus, Rhinacovirus, Tegacovirus, Minacovirus, Sunacovirus, Soracovirus y Amalacovirus (ICTV, 2022).

Una de las especies que presentan más implicaciones en el sector veterinario es *Alfacoronavirus 1* que se encuentran dentro del subgénero Tegacovirus, conformados por el virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), coronavirus respiratorio porcino (PRCV), coronavirus felino (FCoV) y coronavirus canino (CCoV) (Wang *et al*., 2019; Saif y Jung, 2020).

El Virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) pertenece al subgénero Pedacovirus, siendo muy conocida por ocasionar graves lesiones en cerdos. Simultáneamente, otra especie de virus hallado en el cerdo es el coronavirus del síndrome agudo diarreico porcino (SADS-CoV), perteneciente al subgénero Rinoviridae (Wang *et al*., 2019).

2.1.2.2. Betacoronavirus

El género Betacoronavirus se divide en cinco subgéneros llamados Embecovirus, Hibecovirus, Merbecovirus, Nobecovirus y Sarbecovirus. Esta categorización se basa en la similitud de los segmentos genómicos conservados y en la medición de las secuencias divergentes que permitirán su separación en el árbol filogenético (Llanes *et al*., 2020).

El subgénero Embecovirus comprende a las especies *Betacoronavirus 1*, el coronavirus humano *HCoV-HKU1* y los coronavirus de roedores *China Rattus HKU24*, *Coronavirus murino* y *Coronavirus Myodes 2JL14* (ICTV, 2022).

El subgénero Merbecovirus está conformado por los coronavirus del murciélago *Tylonycteris* (BtCoV-HKU4), *Pipistrellus* (BtCoV-HKU5), el coronavirus causante del síndrome respiratorio del medio oeste (MERS-CoV) y el coronavirus 1 del hurón (ICTV, 2022).

En el subgénero Sarbecovirus se encuentran los virus causantes del síndrome respiratorio agudo severo 1 y 2 (SARS CoV 2). Por otro lado, los subgéneros Hibecovirus y Nobecovirus abarcan varias especies de coronavirus identificadas en murciélagos (ICTV, 2022).

2.1.2.3. Deltacoronavirus

Los Deltacoronavirus reunen a coronavirus de aves y cerdos, se agrupan en tres subgéneros denominados como Andecovirus, Buldecovirus y Herdecovirus, de los cuales el subgénero Buldecovirus presenta más especies virales para las aves silvestres y también incluye al Deltacoronavirus porcino (PDCoV) *(*ICTV, 2022).

2.1.2.4. Gammacoronavirus

Los Gammacoronavirus están conformados por tres subgéneros que abarcan en su mayoría coronavirus obtenidos de aves. El subgénero Igacovirus engloba las especies derivadas de aves *Avian coronavirus*, *Avian coronavirus 9203* y *Coronavirus de pato 2714*. Igualmente, el subgénero Brangacovirus posee al *Coronavirus CB17 de ganso*; mientras que el subgénero Cegacovirus posee una especie llamada *Beluga whale coronavirus SW1*, la cual se originó de un mamífero marino (ICTV, 2022).

2.1.3. Mecanismo de entrada viral

La adhesión del virus a la célula hospedera es el primer paso para expresar la patogenicidad en el órgano blanco a infectar, es así que los coronavirus codifican una glicoproteína de superficie que se unirá al receptor de la célula hospedera y mediará la entrada viral (Letfko *et al*., 2020).

2.1.4. Receptores de la célula hospedera

Los receptores del hospedero para los Betacoronavirus más estudiados incluyen a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) para el SARS-CoV 1 y 2 y la dipeptidil peptidasa-4 (DPP4) para MERS-CoV. Otros receptores como el Murine CEACAM1 y 2 y Acido siálico acetil 9-O tienen impacto en el ratón y el ganado vacuno respectivamente (Letfko *et al*., 2020).

2.1.5. Propiedades moleculares del Coronavirus

2.1.5.1. Estructura molecular del Coronavirus

El genoma del coronavirus tiene un rango de 26 a 32 kb y comprende de 6 a 11 marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican poliproteínas de 9680 aminoácidos. El primer ORF comprende el 67% del genoma que codifica 16 proteínas no estructurales (nsps), mientras que los ORF restantes codifican proteínas estructurales y accesorias (Masters, 2006).

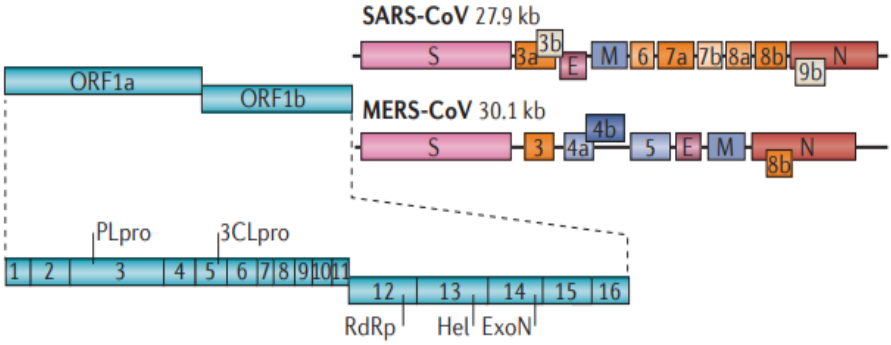

Figura 1. Representación esquemática de los genomas del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV). Se codifican dos poliproteínas, pp1a y pp1ab, que se escinden proteolíticamente en 16 proteínas no estructurales (nsps), incluida la proteasa similar a la papaína (PLpro), la proteasa similar a 3C (3CLpro), la polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp), la helicasa (Hel) y exonucleasa (ExoN) (De Wit *et al*., 2016).

a. Proteina Spike

La proteína Spike o espiga (S) contiene tres segmentos: un ectodominio grande, un ancla transmembrana de una sola entrada y una cola intracelular corta. El ectodominio

contiene a la subunidad de unión al receptor S1 y la subunidad de fusión de membrana S2. Durante la entrada del virus, S1 se une a un receptor de la superficie celular del hospedero para la unión viral, y S2 actúa como un tallo que ancla la espiga a la envoltura viral y después de la activación de la proteasa permite la fusión celular en el hospedero (Hulswit *et al*., 2016; Li, 2016).

Las subunidades S1 y S2 pueden estar separadas por un sitio de escisión que es reconocido por proteasas de tipo furina durante la biogénesis de la proteína S en la célula infectada. La subunidad S1 posee el dominio N-terminal (S1-NTD) y dominio C-terminal (S1-CTD). Uno o ambos de estos dominios S1 se unen potencialmente a receptores y funcionan como el dominio de unión al receptor (RBD) (Li, 2016).

2.1.5.2. Estructuras involucradas en la replicación viral

a. Proteínas no estructurales

La proteína no estructural 1 (nsp1) es el producto de escisión del extremo N más liberado de la poliproteína ORF1a por la acción de la Proteinasa similar a papaína (PLpro). La proteína nsp1 de SARS CoV bloquea la expresión del gen reportero bajo el control de promotores constitutivos, así como el promotor de Interferón inducible. También emplea una doble estrategia para inhibir la expresión de genes del hospedero dirigiéndose a los blancos de traducción y la estabilidad de los ARN m celulares a través de su estrecha asociación con la subunidad ribosómica 40, inactivando su función de traducción del ribosoma. Otra función de la proteína nsp1 es bloquear la activación de genes inducibles de Interferón inhibiendo el virus y las vías de señalización antiviral dependiente de Interferón (Narayanan *et al*., 2015).

La proteina no estructural 2 (nsp2) no está completamente identificada. En el estudio de Cornillez y colaboradores (2009) se sugirió que esta proteína podría estar involucrada en la disrupción de la señalización del hospedero intracelular durante las infecciones por SARS-CoV (Cornillez *et al*., 2009).

La proteina no estructural 3 (nsp3) es una proteína con múltiples dominios como el dominio similar a ubiquitina 1 (Ubl1), el dominio rico en acido glutámico (región hipervariable), un macrodominio (dominio x), el dominio similar a ubiquitina 2 (Ubl2) y la proteinasa similar a la papaína 2 (PL2pro). La proteina nsp3 es un componente esencial

del complejo transcripción – Replicación. Se ha demostrado que las actividades antagonistas de la PLpro del SARS CoV bloquean la producción de importantes citocinas involucradas en la activación de la respuesta inmune innata del hospedero contra la infección viral, incluido el interferón β de tipo I (IFNβ) y quimiocinas como CXCL10 y CCL5 (Báez-Santos *et al*., 2015; Lei *et al*., 2018).

Un estudio de la proteína no estructural 4 (nsp4) del coronavirus de MHV confirmó que la proteína participa en la replicación del virus, la síntesis de ARN y en las modificaciones de la membrana inducidas por el virus, llamadas vesículas de doble membrana (Gadlage *et al*., 2010). Se comprobó que la proteína no estructural 5 funciona como una endopeptidasa C 30 (Proteasa similar 3C), siendo una de las proteasas principales virales. La proteína nsp5 presenta una estructura conservada de 3 dominios que contiene un pliegue similar a la quimiotripsina, formado por los dominios 1 y 2, mientras que el dominio 3 no está claro su función. Esta proteína participa en la escisión de la parte nsp4 – nsp11 de la poliproteína 1a y la parte nsp4- nsp16 de la poliproteína 1ab en los sitios conservados 7 y 11 respectivamente, cumpliendo un rol importante para la replicación del virus (Snijder *et al*., 2016; Stobart *et al*., 2015; Wu *et al*., 2015).

La proteína no estructural 6 (nsp 6) se localiza en el retículo endoplásmico, posee la capacidad de proliferación de membrana, induciendo a la formación de vesículas perinucleares localizadas alrededor de los microtúbulos, siendo una proteína necesaria para la maquinaria lisosomal autofágica del virus (Angelini *et al*., 2013; Benvenuto *et al*., 2020).

Las proteínas no estructurales desde la nsp7 hasta nsp16 cumplen funciones esenciales en la síntesis y procesamiento del ARN de los coronavirus. Las proteínas nsp7 a nsp10 actúan como cofactores de las polimerasas y helicasas, igualmente las proteínas no estructurales 7, 8 y la 12 forman un supercomplejo hexadecamerico con propiedades favorables para la polimerización de nucleótidos y las proteínas nsp10, nsp14 y nsp16 participan en la formación del Complejo de Replicación- Transcripción (RTC) (Bouvet *et al*., 2014; Kirchdoerfer *et al*., 2019; Snijder *et al*., 2016; Zhai *et al*., 2005).

La proteína no estructural 12 (nsp12) contiene al menos dos dominios, una nucleotidiltransferasa asociada a RdRp de nidovirus N-terminal (NiRAN) y un dominio

RdRp C-terminal. El primer dominio es esencial para la replicación del SARS-CoV y otros nidovirus y puede estar involucrado en la unión de los ácidos nucleicos, la adición de la caperuza al ARNm y la iniciación de la síntesis de ARN. El segundo dominio posee secuencias motif comunes y características estructurales que se encuentran en otras ARN polimerasas (Snijder *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2020).

La proteína no estructural 13 (nsp13) es una proteína multifuncional con un dominio de unión a zinc en el extremo N, mientras un dominio de helicasa que presenta las secuencias motif conservadas típicas de las helicasas de la superfamilia 1 está presente en la mitad C-terminal. Las helicasas son proteínas motoras versátiles dependientes de nucleótidos trifosfatos (NTPs) que participan en el metabolismo del ARN, incluida la transcripción, el empalme, la traducción, la biogénesis del ribosoma, la expresión de genes mitocondriales y la regulación de la estabilidad del ARNm (Shi *et al*., 2005; Snijder *et al*., 2016; Subissi *et al*., 2014).

La proteína nsp14 es una proteína bifuncional que juega un papel crucial en la síntesis de ARN viral, compuesta por un dominio Exoribonucleasa (ExoN) N-terminal y un dominio N7 metiltransferasa (MTasa) C-terminal. El dominio ExoN está emparentado a la Superfamilia DEDD de las exonucleasas, ha demostrado hidrolizar ARN monocatenarios y bicatenarios a productos finales de 8-12 y 5-7 nucleotidos; y desempeña un papel de corrección para la prevención de la mutagénesis letal. El dominio C terminal de nsp14 del coronavirus causante de SARS-CoV actúa como una N7-guanina metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina (SAM) que no tiene especificidad a una secuencia de ARN, siendo un blanco atractivo para las estrategias antivirales porque exhibe características que son distintas de las metiltranferasas de la célula hospedera (Ma *et al*., 2015; Snijder *et al*., 2016; Subissi *et al*., 2014).

La proteína nsp10 está compuesta por 148 residuos, contiene dos terminales de zinc e interactúa con el dominio N-terminal de la proteína nsp14, formando un complejo, que estimula la actividad del ExoN de nsp14 (Bouvet *et al*., 2014; Ma *et al*., 2015).

La proteína no estructural 15 (nsp15) es una endoribonucleasa nidoviral específica de uridina (NendoU) en la cual los iones Mn^{2+} mejoran su actividad. A la proteína se le atribuye ser antagonista de los sensores ARN de doble hebra del hospedero durante la

infección por coronavirus y ser un inhibidor del adaptador de señalización antiviral mitocondrial que induce la apoptosis. Asimismo, se sospecha que participa en la replicación viral dado que un estudio observó la interacción de la proteína nsp15 en asociación con las proteínas nsp8 y nsp12 que participan en el supercomplejo Replicación transcripción nsp14 (Athmer *et al*., 2017; Deng *et al*., 2017; Zhang *et al*., 2018).

La proteína nsp16 presenta un dominio 2′-O-metil transferasa (2′-O-MTasa). Se demostró en un estudio in vitro que la proteína nsp10 purificada interactúa con la nsp16 y, por lo tanto, desencadena una fuerte actividad 2'-O-MTasa. Asimismo, mediante caracterizaciones bioquímicas se observó que 2'-O-metilación de la caperuza de ARN es necesaria para evitar o retrasar el reconocimiento del ARN viral por sensores de la inmunidad innata, por ello se destaca la interacción de las dos proteínas no estructurales en el hospedador con coronavirus (Bouvet *et al*., 2014; Chen *et al*., 2011; Snijder *et al.,* 2016).

b. Proteínas accesorias

Las proteínas 3a y 3b son traducidas de los ORF3a y ORF3b respectivamente. La proteína 3a es la más larga de las proteínas accesorias, presenta un extremo N extracelular y un extremo C intracelular, en este último extremo posee dos señales de migración y clasificación de proteína intracelular que participan en el transporte de la proteína 3a hacia la superficie celular, donde posteriormente esta experimenta endocitosis. Asimismo, esta proteína mejora la activación de las quimiocinas que responden al factor nuclear kapa beta y la interleucina 8. La proteína 3b ha demostrado que participa en la inducción de necrosis y apoptosis, también es capaz de inhibir la respuesta antiviral modulando la disminución del Interferón tipo 1 (IFN-β) así como la respuesta antiviral mitocondrial (Liu *et al*., 2014; Narayan *et al*., 2008).

La proteína 6 (p6) se localiza en el Complejo de Golgi y el Retículo endoplásmico. Estudios indican que la proteína está involucrada en la replicación viral y la inhibición de la vía interferón (Narayan *et al*., 2008).

La proteína 7a y 7b están localizadas en el compartimento de Golgi. La expresión de la proteína 7a mejora la producción de citoquinas proinflamatorias a través de la activación del factor nuclear kappa beta. La proteína participa en inducción de la apoptosis en varias líneas celulares a través de la vía dependiente de caspasas, inhibición de la

síntesis de la proteína celular y la activación de la proteína kinasa activada mitógena p38. En cuanto a la proteína 7b, estudios han demostrado que el ORF7b del SARS-CoV no es esencial para la replicación viral (Liu *et al.,* 2014; Narayan *et al*., 2008).

En otras proteínas accesorias, como la proteína 8a y 8b, algunos estudios han demostrado la interacción que existe entre 8a y la proteína S; así como la proteína 8b con las proteínas M, E, 3a y 7a. Las funciones precisas de las proteínas 8a ,8b y 9b aún no son totalmente claras (Narayan *et al.*, 2008).

2.1.5.3. Estructuras involucradas en el ensamblaje viral

a. Proteína de la Nucleocapside

La proteína de la Nucleocapside (N) de SARS CoV es una fosfoproteína de 46 kDa constituida por 422 aminoácidos, se puede dividir en tres regiones: un dominio N terminal (NTD) de 45-181 residuos, un dominio C-terminal (CTD) y un dominio central que actúa como el dominio de unión al ARN. La proteína N tiene como función principal empaquetar el genoma viral en una partícula de ribonucleoproteínas (RNP) para proteger el ARN genómico e integrarlo en un virión viable. Durante la infección viral, la proteína N debe disociarse fácilmente para exponer el ARN genómico para una eficiente expresión, transcripción y replicación (Chang *et al.,* 2006; Chang *et al*., 2014).

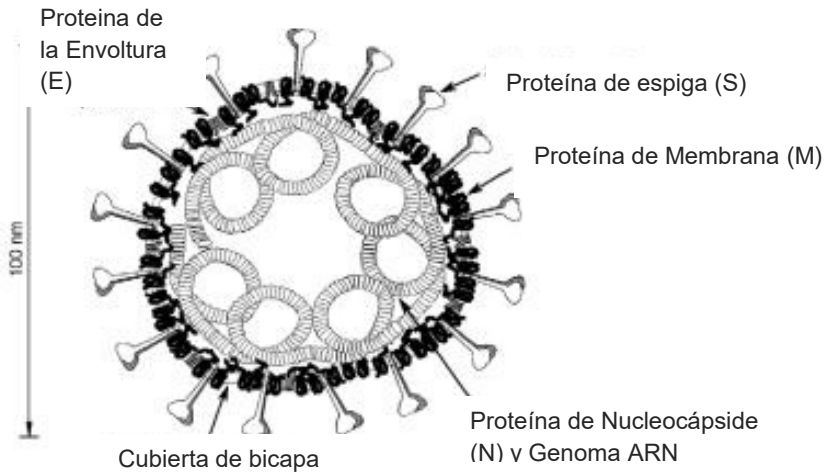

Figura 2: Coronavirus y sus proteínas estructurales (Masters, 2006).

b. Proteína de la Membrana

La proteína de Membrana (M) es la glicoproteína más abundante en la partícula viral y en las células infectadas, se caracteriza por tener tres dominios: un ectodominio N

terminal corto, un dominio transmembrana de triple extensión y un endodominio C-terminal. Participa en el ensamblaje del virus, convirtiendo las membranas celulares en equipamientos donde el virus y los factores del hospedero se unen para producir nuevas partículas virales (Narayanan *et al*., 2000; Neuman *et al.,* 2010).

c. Proteína de Envoltura

Las proteínas de Envoltura (E) son pequeñas viroporinas hidrófobas (74-109 aminoácidos) compuestas por dos dominios estructurales distintos. El N-terminal consta de una región hidrófila corta de 7-9 aminoácidos y una región hidrófoba de 21-29 aminoácidos, seguida de una región C-terminal hidrófila. Las proteínas de la envoltura (E) del SARS-CoV participan en la morfogénesis y el ensamblaje del virus. Debido a su tamaño pequeño y su naturaleza hidrófoba, las proteínas de la envoltura pueden forman canales iónicos con preferencia a los cationes Na+ y K+, y recientemente se evidencio la formación canales Proteína- lípido en las membranas del compartimiento intermedio del Retículo Endoplásmico de Golgi ERGIC/GOLGI, destacando el argumento que los disturbios iónicos pueden agravar la infección en el organismo (Nieto *et al*., 2015; Venkatagopalan *et al*., 2015; Wilson *et al*., 2015).

2.2. Coronavirus en animales

2.2.1. Coronavirus canino

Los coronavirus caninos comprenden a los alfacoronavirus (CCoV) que producen infecciones entéricas y a los betacoronavirus (CRCoV) que produce infecciones respiratorias. El CCoV se aisló por primera vez en 1971 de perros con enteritis de moderada a grave en Alemania y posteriormente, según sus características antigénicas, se dividió en CCoV tipo I y tipo II (Decaro y Buonavoglia, 2008).

La infección por CCoV se caracteriza por su alta morbilidad y baja mortalidad y su transmisión es fecal-oral; los cachorros presentan pérdida de apetito, vómitos, deshidratación y diarrea liquida. En el 2005, apareció una cepa altamente virulenta (CCoV II a) en Italia, y de rasgos pantrópicos debido a que los cachorros presentaban lesiones en múltiples órganos, asimismo, las infecciones estaban acompañadas de una severa leucopenia con ataxia y temblores (Decaro y Buonavoglia, 2008).

Posteriormente en el año 2010, el coronavirus canino de tipo II se subdivide en CCoV IIb y CCoV IIc. La primera derivada de recombinaciones del subtipo CCoV IIa con el virus gastroenteritis transmisible (TGEV) y la segunda está caracterizada en base a una proteína spike recombinante, producto de la recombinación de secuencias CCoV tipo I y tipo II, y un dominio terminal N de la proteína spike similar al serotipo I (Nguyen y Pham, 2021).

El virus de coronavirus respiratorio canino se detectó por primera vez en 2003 en perros adultos alojados en un centro de rescate del Reino Unido, siendo sus signos clínicos leves como secreción nasal, tos y estornudos. El CRCoV también se ha detectado en perros con CCoV y parvovirus canino donde ocasiono síntomas gastrointestinales. Aunado al Virus de la Parainfluenza canina y la bacteria *Bordetella bronchiseptica,* el CRCoV provoca fuertes infecciones en los bronquios con acúmulos de mucus (Erles y Brownlie, 2008).

Un estudio experimental de CRCoV en un refugio de perros replicó los signos clínicos respiratorios y encontró que la ruta de transmisión es la inhalación de secreciones respiratorias en el ambiente; sumado a los resultados de inmunohistoquimica donde utilizaron cultivos de explantes traqueales caninos, revelaron un acortamiento, aglomeración y pérdida de los cilios traqueales (Priestnall, 2020).

El virus tiene tropismo por los tejidos respiratorios y linfoides, formando agregados inflamatorios en las narinas, tráquea, agregados linfoides peribronquiales y perivasculares en el pulmón (Mitchell *et al*., 2013; Priestnall, 2020).

2.2.2. Coronavirus Felino

El coronavirus felino se subdivide en dos serotipos, el primero es el coronavirus entérico felino (FCoV I) que causa una infección leve del tracto intestinal y está presente en la microbioma de gatos sanos. Sin embargo, en el año 1990 en Japón, se alertó la presencia de un segundo serotipo denominado virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) y es consecuencia de una doble recombinación entre el FECV tipo 1 y el coronavirus canino CCoV tipo 2 (Terada *et al*., 2014; Jaimes y Whittaker, 2018).

El FIPV se describió por primera vez en 1963 como un síndrome en gatos que presentaban vasculitis inmunomediada y reacciones inflamatorias piogranulomatosas (Hartman, 2005). La enfermedad se manifiesta mayormente en gatos de 3 meses a 3 años, sin embargo, se ha reportado en gatos menores a 12 meses y en gatos viejos (mayor a 10 años). Entornos familiares con más de dos gatos están predispuestos a infectarse con el virus y mantener una forma crónica sin evidencia de sintomatología; no obstante, el 10 % de estos hogares desarrollan la enfermedad (Sykes, 2014).

El coronavirus felino se transmite por ingestión o inhalación, el coronavirus tipo I se replica en los enterocitos, provocando una infección asintomática o diarrea; mientras que el FIPV se replica en los macrófagos, y a través de la vía linfática, el virus migra a los órganos hematopoyéticos, pulmón, riñón y sistema nervioso. En el animal se visualiza una fiebre, pérdida de peso y los órganos afectados presentan inflamación granulomatosa y acúmulo de exudado en el abdomen (Hartman, 2005).

2.2.3. Coronavirus del cerdo

2.2.3.1. Alfacoronavirus del cerdo

Comprenden mayormente los coronavirus que tienen como blanco de acción el tracto gastrointestinal como el virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), virus del síndrome de diarrea aguda porcina (SADS); así también incluye al coronavirus respiratorio porcino (PRCV) (Wang *et al*., 2019).

El virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV) se manifiesta de forma aguda en los cerdos. La enfermedad se informó por primera vez en 1946 en los Estados Unidos, reportándose brotes en países de América, Asia y Europa. El virus es capaz de infectar a los lechones pudiendo ocasionar altas tasas de mortalidad después de semana 2 (Liu y Wang, 2021).

El virus de la diarrea epidémica porcina se reconoció por primera vez en el Reino Unido en 1971 con cuadros entéricos graves y en estación invernal, se reportó en Asia en 1982 y en los siguientes 20 años comenzaron los episodios de la enfermedad en países del viejo mundo. Se considera una enfermedad que genera grandes pérdidas económicas debido a que su mortalidad sobrepasa el 50% de cerdos neonatales (Turlewicz y Pomorska, 2021).

El síndrome de diarrea aguda porcina (SADS) fue identificado en el Sur de China en el 2017, afecta a cerdos recién nacidos, tuvo un particular interés debido a que su secuencia genómica fue idéntica en un 98.48% al coronavirus de murciélago que pertenece al mismo género de *Rhinolophus*, probable especie origen del SARS CoV (Zhou *et al.,* 2018; Yang *et al*., 2020). Los coronavirus entéricos comparten las características entre sí que se describen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Coronavirus con patología entérica en porcinos.

(Liu y Wang, 2021)

Virus	Género	Edad susceptible	Vía de transmisión	Tasa de prevalencia	Mortalidad en lechones neonatos	Signos clínicos	Cambios histopatológicos	Referencias
TGEV	*Alfacoronavirus*	La enfermedad es generalmente más grave, letal en lechones recién nacidos En cerdos destetados y cerdas, la morbilidad es alta pero la tasa de mortalidad es baja	Transmisión vía lactancia materna Transmisión del, tracto digestivo vía oro- fecal; Transmisión del tracto respiratorio	Menor al 3 %	Acercándose al 100 % en lechones de menos de 2 semanas	Diarrea, deshidratación, pérdida de peso, muerte	Atrofia de las vellosidades intestinales; Altura de las vellosidades y la cripta reducidas; Necrosis y desprendimiento de células del intestino delgado.	Ding et al. 2017; Garwes 1988; Guo et al. 2020; Penzes et al. 2001; Zhang et al. 2017
PEDV	*Alfacoronavirus*		Transmisión del, tracto digestivo Vía ruta oro-fecal Transmisión aérea vía ruta nasal-fecal	50.21–62.10%	Hasta alrededor del 100 % en lechones recién nacidos		Atrofia de vellosidades intestinales;; Necrosis and desprendimiento de células intestinales; lesiones pulmonares	Jung et al. 2016; Jung et al. 2020; Li et al. 2018c; Vlasova et al. 2014; Wang et al. 2019; Zhang et al. 2016
SADS-CoV	*Alfacoronavirus*		Transmisión del, tracto digestivo vía ruta oro-fecal; Transmisión del tracto respiratorio	10.29%	Hasta alrededor del 90% en lechones ≤ 5 días de edad y 5% en lechones > 8 días de edad		Atrofia de vellosidades de yeyuno e íleon; Necrosis y desprendimiento de células del intestino delgado.	Pan et al. 2017; Wang et al. 2019; Xu et al. 2019; Zhang et al. 2017; Zhou et al. 2018a, b

El coronavirus respiratorio porcino se presenta en cerdos jóvenes (1 a 3 meses). El virus surge a partir de una mutación de TGEV que consistió en la deleción de la proteína S que elimino el dominio de unión al ácido siálico. El primer reporte del virus fue en Bélgica en 1984 en cerdos, extendiéndose en los próximos años a Europa, Estados unidos y Canadá (Turlewicz y Pomorska, 2021; Saif, 2004).

Su transmisión es mediante gotas, produce una viremia transitoria que permite detectar el virus de hisopados nasales, tonsilas y tráquea. Inicia su replicación en las células epiteliales del pulmón presenta tropismo por el pulmón hasta desencadenar una neumonía intersticial (Saif, 2004).

Los principales signos son disnea, polipnea, anorexia, letargia, tos y rinitis; a pesar de la diferencia en el tropismo y la patogénesis, existe una relación estrecha ente TGEV y PRCV debido a que los anticuerpos de este virus respiratorio inducen una respuesta de anticuerpo en cerdos que lo protegen de la infección por TGEV (Turlewicz y Pomorska,2021; Saif, 2004).

2.2.3.2 Betacoronavirus porcino

El Virus de la encefalomielitis hemaglutinante porcina (PHEV) apareció por primera vez en lechones entre 1950 y 1960 en Canadá. Se aisló el virus de células de riñón de cerdo y que a través de características como degeneración neural y gliosis evidencio la encefalomielitis. En posteriores evaluaciones rutinarias a granjas, se detectó que el virus también se presentaba en cerdos con características leves transitorias sin encefalomielitis y esta presentación clínica del virus fue denominada Enfermedad de debilitamiento y vómitos. (Mora-Diaz *et al*., 2019)**.**

En 1985 se detectó la primera infección en China, desde entonces ha habido constante reportes de brotes en Asia Oriental que afectan la industria porcina (Rho *et al*., 2011; Li *et al*., 2016; Shi *et al*.,2018). Asimismo, se han manifestado brotes subclínicos en Europa, USA y Argentina (Mora-Díaz JC *et al*., 2020, 2021).

El virus se transmite vía descargas nasales y los signos clínicos incluyen estornudos, tos, debilitamiento y vómitos y su diseminación al sistema nervioso central puede generar desordenes motores (Vijgen *et al.,* 2006). Presenta una alta mortalidad de lechones infectados menores de tres semanas, mientras que en lechones adultos solo muestran signos subclínicos (Dong *et al*., 2014). El virus se replica en las células epiteliales del tracto respiratorio, su diseminación en el nervio vago permite infectar ganglios sensoriales, plexo mientérico intestinal y ganglios sensoriales de la medula espinal (Mora-Díaz *et al*., 2019).

2.2.3.3. Deltacoronavirus del porcino

El deltacoronavirus porcino fue aislado por primera vez en China en el 2011 como parte de una vigilancia epidemiológica molecular de animales, y se sospecha que su origen ha sido facilitado por el salto interespecie genómico viral en las aves (Woo *et al*, 2012). En Estados Unidos, en el año 2014, se aisló nuevamente el deltacoronavirus en cerdos

neonatales con diarrea epidémica porcina y otro estudio registró que la mortalidad en lechones alcanza el 40 % y fue menor que PEDV (Jung y Saif, 2016; Liu y Wang, 2021). Estudios experimentales realizados en Japon observaron que los cerdos recién nacidos inoculados con el virus desarrollaban diarrea acuosa y anorexia; y mediante la tinción inmunohistoquimica demostró la presencia de los antígenos en el citoplasma de las vellosidades y criptas de los enterocitos desde el yeyuno hasta el colon, demostrando que el blanco de replicación son los intestinos (Suzuki *et al*., 2018). En nuestro país, en el año 2022, se detectó secuencia genómica completa de una cepa de deltacoronavirus de cerdos jovenes provenientes de una granja que presento alta mortalidad y manifestaciones entéricas del departamento de San Martin; y mediante análisis filogenético se descubrió que esta cepa peruana perteneció a un filogrupo norteamericano de Deltacoronavirus (More-Bayona *et al*, 2022).

2.2.4. Coronavirus bovino (BCoV)

El coronavirus bovino se reportó por primera vez en tres diferentes manifestaciones clínicas, la primera fue como una forma diarreica en terneros jóvenes de una granja de los Estados Unidos (Snodgrass e*t al*., 1986). En 1988, se detectó el virus en vacas con diarrea y lo denominaron “Disentería de invierno en ganado adulto” (Saif *et al.*, 1988). Finalizando los años 90, se aisló el virus de ganado vacuno que presentaba síntomas respiratorios, esta manifestación se cataloga como enfermedad del tracto respiratorio en bovinos de todas las edades (Storz *et al*., 2000).

a. Forma entérica en Terneros

La enteritis en terneros ocurre de 1 a 3 semanas con un periodo de incubación de 3 a 4 días. El virus infecta las células epiteliales de las porciones distales del intestino delgado y grueso, también migra hacia el colon, produce atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas. Próximo a la diarrea por malabsorción se desencadena una deshidratación progresiva, acidosis, hiperpotasemia e hipoglucemia que podría generar insuficiencia circulatoria y muerte. En los terneros también se observó excreciones nasales y fecales; siendo probable que las cepas entéricas que producen diarrea se vuelvan neumoentericas. A menudo los brotes ocurren en la misma granja, de forma anual y en invierno; y los terneros reservorios pueden estar en estado subclínico o presentando la enfermedad (Saif y Jung, 2020).

b. Forma entérica en bovinos adultos

La disentería de invierno infecta al ganado adulto, su periodo de incubación es de 2 a 8 días. El virus se replica en las criptas del colon, produce necrosis de las células de la cripta y hemorragia intestinal, los animales desarrollan diarreas con moco o manchas de sangre, fiebres transitorias, leve tos y descargas nasales mucopurulentas (Boilaeau y Kapil, 2010; Hodnik *et al*., 2020; Saif y Jung, 2020).

La mortalidad es menor al 2 %, mientras que la morbilidad es alta; los episodios de disentería se han asociado a la aparición de estrés por frío debido al confinamiento estrecho del ganado (Hodnik *et al*., 2020). Entre los factores de riesgo para que se produzca brotes de disentería en los rebaños lecheros se encuentran el incremento del título de los anticuerpos de Ig G en el suero en las vacas, aumento de la prevalencia de hatos con vacas que tuvieran diarrea viral bovina y las deficiencias en el manejo de los animales (Smith *et al.*, 1998).

Un estudio de cohorte basado en los reportes de disentería invernal en rebaños durante una epidemia en Noruega (2011-2012) evaluó el efecto del brote sobre la producción y la composición de la leche, estimándose una pérdida total de 51 litros por vaca en el período de estudio y un aumento de los ácidos grasos libres en la leche, que reduciría la calidad de la leche (Toftaker *et al.*, 2017).

La enfermedad con cuadro entérico ha sido reportada en bóvidos adultos de Corea, Tailandia, Francia, Dinamarca, Suecia, Alemania, Japón y China, mientras que en terneros fue detectada en Canadá e Irán (Ko *et al.,* 2006; Gomez *et al*., 2017; Singasa *et al*., 2017; Lotfollahzadeh *et al*., 2020; Suzuki *et al.,* 2020; Zhu *et al*., 2022).

Uno de los más recientes estudios encontró una seroprevalencia del 97.98% en los rebaños analizados en Tailandia, asociándose a la edad de los bovinos (mayor a tres años), así como con la presencia de heces diarreicas (Ven *et al*., 2021).

En América latina, países como Argentina, Cuba, Brasil, Uruguay, México han presentado reportes de la forma entérica de coronavirus terneros y bovinos lecheros (Barrera *et al*., 2006; Lorenzetti *et al*., 2013; Bok *et al*., 2019; Castells *et al*., 2019; Orozco-Cabrera *et al.,* 2020).

c. Forma respiratoria

El coronavirus bovino genera un distrés respiratorio en terneros y ganado adulto y también ha sido implicado como co-agente etiológico del complejo respiratorio bovino (Decaro *et al.*, 2008; Gulliksen *et al*., 2009). El virus se replica en el epitelio del tracto respiratorio superior, las infecciones pueden ocurrir por inhalación o por viremia. Algunas investigaciones han propuesto que la replicación y excreción de BCoV en las secreciones nasales se inicia en la orofaringe y luego se propaga al tracto gastrointestinal a través de la ingestión de grandes cantidades de virus con la posterior eliminación en las heces. También se ha documentado la eliminación del coronavirus tanto en las fosas nasales como en las heces del animal (Boileu y Kapil, 2010).

En el curso de la infección, los animales presentan tos, fiebre, rinitis, disnea y una simultanea diarrea; al exacerbarse la enfermedad respiratoria se observan lesiones necrotizantes e inflamatorias en los pulmones que desencadenan bronconeumonía, pérdida de peso y muerte (Saif y Jung, 2020). Por otro lado, algunos autores sospechan que el coronavirus es un factor de entrada para las infecciones bacterianas secundarias, sin embargo, aún faltan estudios para defender ese criterio de causalidad (Hodnik *et al*., 2020).

Un estudio donde se analizaron las secuencias del gen de la proteína S de cepas de BCoV aisladas de brotes con la enfermedad en granjas lecheras entre los años 2002-2010 en Dinamarca y Suecia demostró una baja diversidad genética entre las 26 cepas de BCoV suecas y siete danesas (Bidokhti *et al*., 2013). En contraste, en Francia-2016 un estudio de vigilancia genómica realizado en 16 terneros con enfermedad respiratoria aguda estimo que un evento de recombinación en el gen S pudo ser el origen de la divergencia de sus cepas de coronavirus bovino. Adicionalmente encontraron variaciones en las tasas de evolución entre los linajes europeos y no europeos, que podría deberse a diferencias en la ecología del virus (Salem *et al*., 2020).

2.2.4.1. BCoV en pequeños rumiantes:

En ovejas, se ha detectado que el virus en crías neonatales y corderos produce un cuadro entérico en colaboración con otras bacterias y parásitos enteropatógenos (Amer, 2018). Otro estudio llevado a cabo en Ghana demostró que de una población de 1,498 que incluía ovejas, cabras y ganado bovino obtuvieron una seroprevalencia de 25.8 %, 43.1 % and 55.8 % respectivamente; mientras que al realizar la prueba molecular hallaron 4 positivos (3 en cabras y q de ganado bovino) (Burimuah *et al*., 2020).

Debido a que ocurre el cruzamiento entre especies de los coronavirus del grupo antigénico 2, se ha encontrado que especies como los caballos, búfalo de agua, camélidos y animales silvestres (ciervo, alces) y animales de zoológico como la jirafa también poseen virus muy similares a Coronavirus bovino y pueden infectar a los terneros (Boileau y Kapil, 2010).

2.2.5. Coronavirus aviar

El coronavirus causante de la bronquitis infecciosa (IBV) es un gammacoronavirus altamente contagioso en aves de producción, la transmisión ocurre mediante la inhalación e ingestión de partículas virales, los pollos con la enfermedad presentan los ojos llorosos, exceso de mucosidad en las fosas nasales y tráquea, jadeo, tos y estertores. Este virus también se ha detectado en pavos reales, gansos, palomas y patos (Jackwood y Hall, 2012; Swayne *et al.,* 2020).

El virus se replica en las células epiteliales del tracto respiratorio, renal, oviducto y testículos. El tropismo por el órgano depende de la cepa infectiva y se atribuye a que su presencia desencadene infecciones respiratorias secundarias de origen bacteriano que merme la producción en aves de corral (Swayne *et al.,* 2020).

El IBV se caracteriza por acumular mutaciones en el gen Spike a lo largo del tiempo, creando nuevas cepas y serotipos. Las cepas que afecten las vías respiratorias de los pollos lesionaran los sacos aéreos llenándolos de espuma y exudado caseoso, al contrario de las cepas neuropatogénicas que degeneraran a los riñones causando hinchazón y palidez, así como distensión de los uréteres por acumulación de uratos (Swayne *et al.,* 2020).

2.2.6. Coronavirus en murciélagos

El monitorio coronavirus en murciélagos comenzó en el año 2003, donde se han detectado más de 200 genomas parciales y completos de coronavirus en murciélagos (Ruiz-Aravena *et al*., 2022). Los coronavirus que circulan en los murciélagos son los géneros alfacoronavirus (AlfaCoV) y betacoronavirus (BetaCoV) y sus hospederos pertenecen a las familias Pteropodidae, Rhinonycteridae, Rinolophidae, Hipposiderae

clasificados en el suborden *Yinpterochiroptera y las familias* Rhinopomatidae*, Nycteridae, Emballonuridae,* Vespertilionidae*,* Miniopteridae*,* Molossidae; del suborden *Yangochiroptera* (Teeling *et al*., 2018; Ruiz-Aravena *et al.*, 2022).

Los coronavirus de murciélagos suelen presentar tropismo gastrointestinal y son excretados a través de las heces, siendo más comunes detectar el virus de muestras de hisopados rectales y de tejido intestinal (Collares y Schwemmle, 2020; Lacroix *et al*., 2020). No obstante, se ha encontrado que los coronavirus producen mínimos niveles de inflamación en los intestinos y en los pulmones de los murciélagos; este hallazgo podría deberse a que los murciélagos amortiguan su respuesta inflamatoria en casos de estrés o inducidos por virus (Ahn *et al.*, 2019; Decaro y Lorusso, 2020).

Los murciélagos transportan y transfieren los coronavirus a las poblaciones a través de la migración, y se sugiere que esta familia viral presenta picos altos de diseminación en verano y otoño (Decaro y Loruso, 2020; Ruiz-Aravena *et al*., 2022).

Los murciélagos pertenecientes a la familia Rinolophidae están dispersos en el continente asiático, americano, europeo y africano, y los coronavirus predominantes son del subgénero Sarbecovirus (BetaCoV), Rhinacovirus (AlfaCoV), continuando en una menor proporción los subgéneros Nobecovirus, Merbecovirus e Hibecovirus (BetaCoV) y Duvinacovirus (AlfaCoV). En las especies de murciélagos pertenecientes a la familia Mollosidae también se observó la circulación de alfacoronavirus y betacoronavirus (Ruiz-Aravena *et al*., 2022).

En el continente africano, se pudo aislar AlfaCoV y BetaCoV en murciélagos Hipposiderae, destacando la presencia del subgénero Duvinacovirus (AlfaCoV). Este subgénero ha estado muy relacionado con los alfaconoravirus de origen zoonótico HCOV-229E y HCoV-NL63 (Tao et al., 2017). Por otro lado, en los países de Ghana, Guinea y Mozambipe, se detectó subgénero Merbecovirus en murciélagos de la familia Nycteridae (Annan *et al*., 2013; Joffrin *et al*., 2020; Lacroix *et al.,* 2020).

En cuanto los murciélagos de la familia Vespertilionidae, encontraron alfacoronavirus y betacoronavirus en esta familia, del cual sobresalía el subgénero Merbecovirus. La generación de nuevas variantes en los Merbecovirus se puede deber a la

alta capacidad de divergencia de las secuencias del gen S como se observó en los estudios filogenéticos los murciélagos insectívoros *Pipistrellus abramus* (Lau *et al.,* 2013; Lau *et al.,* 2021). Los murciélagos de la familia Pteropodidae presentaron en mayoría coronavirus del subgénero Nobecovirus detectados en los continentes asiático-africano, algunas especies del subgénero Duvinacovirus e Hibecovirus solo se detectaron en África, mientras que el subgénero Merbecovirus (BCoV) fue detectado en la especie *Rousettus leschenaultii* de China (Ruiz-Aravena *et al*., 2022).

El subgénero Setracovirus, Merbecovirus, y Nobecovirus estaba presente en murciélagos de la familia Rhynonycteridae en África, mientras que en Oceanía se halló el subgénero Hibecovirus. Por otro lado, un estudio en Arabia Saudita del año 2013, encontró dos muestras positivas a Betacoronavirus (Nobecovirus y Sarbecovirus) en murciélagos de la familia Rhinopomatidae (Ruiz-Aravena *et al*., 2022). De la familia Miniopteridae, se ha conseguido detectar los subgéneros Sarbecovirus y Merbecovirus; así también en los murciélagos de la familia Emballonuridae se encontró Merbecovirus y Nobecovirus, todos descubiertos en el continente asiático (Ruiz-Aravena *et al*., 2022).

Estudios sugieren que la tasa de contacto y el movimiento estacional de los murciélagos promueve la rápida difusión de los coronavirus, en vista de que se detectó alfacoronavirus de diferentes familias de murciélagos que estaban posados en un mismo lugar (Willoughby *et al*., 2017; Ar Gouilth *et al.*, 2018; Manganga *et al*., 2020). Asimismo, se asoció una alta prevalencia de betacoronavirus con las colonias de maternidad de la especie *Rinolophus ferrumequinum*; pudiéndose deber a la reproducción sincrónica y la alta densidad de individuos que generan crías susceptibles (Willoughby *et al.,* 2017; Ar Gouilth *et al*., 2018).

Para conocer la diversidad de coronavirus en murciélagos provenientes de países con interfaces de alto riesgo de zoonosis, se capturo murciélagos y otras especies de países de Asia, África y Latinoamérica. La vigilancia epidemiológica recolecto fluidos e hisopados orales y fecales, entre otras variables trazadas bajo un análisis predictivo biológico, concluyo que la presencia de coronavirus depende de la ecología de los murciélagos, el cambio entre los distintos hospederos fue proporcional a la variación regional y destaca la constante amenaza de los coronavirus en África y Asia (Anthony *et al*., 2017).

2.3. Potencial zoonótico del Coronavirus

2.3.1. Coronavirus en Humanos

Los virus causantes de los síndromes respiratorio humanos en el mundo han generado un gran impacto por las consecuencias catastróficas a nivel sanitario, económico y social en los últimos veinte años (De Wit *et al.,* 2016; Dhama *et al.,* 2020). La evolución de los coronavirus en humanos como agente infeccioso ha dado un gran salto a partir del 2003, cuando brotes masivos de pacientes con falla respiratoria progresiva eran reportados en China (Drosten *et al*., 2003; Zhong *et al*., 2003).

El primer síndrome respiratorio SARS CoV se caracterizaba por una neumonía severa en adultos y se manifestaba en un inicio por una fiebre, dolor de cabeza y disnea; comprometiendo gravemente los órganos respiratorios, desencadenando altas cifras de morbilidad y mortalidad a lo largo del territorio asiático (Drosten *et al*., 2003; Zhong *et al*., 2003).

Debido a la emergencia por el nuevo coronavirus, las poblaciones adjuntas al escenario del brote fueron analizadas y rastreadas para detener la expansión de la enfermedad. En la provincia de Guangdong en China se identificó la presencia de Betacoronavirus relacionados a SARS CoV en civetas (*Paguma larvata*) y mapaches *Nyctereutes procyonoides*, se obtuvo anticuerpos neutralizantes al nuevo coronavirus (Guan *et al*., 2003). Asimismo, se descubrió que el murciélago *Rhinolophus sp* poseía un Betacoronavirus con un acercamiento filogenético más próximo al SARS CoV, indicando que esta especie de mamífero podría ser el reservorio del coronavirus emergente (Luk *et al*., 2019).

En el año 2012, Arabia Saudita reportó el deceso de un paciente afectado por una severa neumonía. Este nuevo brote fue desencadenado por otra especie de Betacoronavirus llamada MERS CoV, que en el humano era capaz de iniciar infecciones graves del tracto respiratorio inferior con compromiso extrapulmonar, llegando a causar altas tasas de mortalidad. (Chan et al., 2015; Mackay y Arden, 2015). La enfermedad originada por el coronavirus humano se expandía por todo el Oriente Medio, propagándose a Europa, África, Asia y América del Norte (Chan *et al*., 2015).

Los análisis filogenéticos atribuyeron una estrecha relación de los coronavirus de murciélagos *Tylonycteris* bat CoV HKU4 y *Pipistrellus* bat CoV HKU5 con MERS (Cui *et al*., 2019). Asimismo, los análisis de seropositividad y filogenéticos en camellos son evidencia que los dromedarios pueden ser considerados como portadores o reservorios asintomáticos de este nuevo coronavirus y que a través del contacto con las secreciones del animal pudieron infectar al humano (Reusken *et al.,* 2013; Azhar *et al.,* 2014).

La tercera pandemia por otro betacoronavirus emergente inicio a fines del 2019 en China, los brotes de pacientes hospitalizados fueron descritos como una neumonía grave vinculada epidemiológicamente con el mercado de animales y mariscos de la provincia de Wuhan, China. El virus tuvo una rápida propagación en marzo del año 2020, infectó a más de 381 000 personas en 195 países y las cifras de mortalidad ascendían a las 16 000 personas (Tay *et al*., 2020; Zhu *et al*., 2020).

El SARS CoV 2 se diferenció filogenéticamente de otros coronavirus humanos porque su identidad de dominios replicasa conservados es inferior al 90 % (Zhu *et al.,* 2020; mientras que los coronavirus RaTG13 del murcielago *Rhinolophus affinis* y el coronavirus del pangolin *Manis javanica* presentan niveles de afinidad filogenética mayores (96% y 91.02%) y se propone que estas especies cumplan un papel reservorio en el SARS CoV 2 (Zhang *et al*., 2020).

a. Modelos Experimentales

Para conocer la patogenia de los Betacoronavirus emergentes en humanos, se desarrollaron modelos animales que fueron inoculados con cepas de SARS CoV 1, MERS y SARS CoV 2 y que proponen una mayor visualización del daño y lesiones que generaban en diferentes mamíferos (Gretebeck y Subbarao, 2015).

Debido a las similaridades anatomicas, fisiológicas e inmunológicas, los primates no humanos son considerado el modelo ideal de estudio (Gretebeck y Subbarao, 2015). En el cuadro 2 se describen los animales para investigación infectados con coronavirus emergentes de humano.

Cuadro 2. Modelos experimentales de SARS, MERS, SARS CoV 2 en Primates no humanos (Gong y Bao, 2018; Abdel-Moneim *et al.,* 2020).

Especie de animal	Virus	Subtipo de Virus; Ruta de inoculación y dosis	Aislamiento Viral	Signos clínicos	Lesiones histopatológicas	Referencias
Macaco Rhesus	SARS	TOR-2; IV o IT; 10^7 PFU	No	Una cuarta parte de los animales estaban agitados y agresivos.	Edema intersticial leve e inflamación alveolar en el pulmón	Rowe *et al*., 2004
		PUMC01; IN; 10^5 PFU	Hisopado orofaríngeo nasal	Sin signos	Neumonía intersticial aguda; infiltración de linfocitos y macrófagos en áreas nodulares en pulmón	Qin *et al*., 2005
	MERS	EMC/2012; IO, IT, o IV; 7×10^6 $TCID_{50}$	Hisopado nasal, orofaríngeo y cloacal	Neumonía, respiración abdominal profunda, tos, fiebre y anorexia	Lesiones macroscópicas en pulmón; Microscópicamente neumonía broncointersticial o neumonía intersticial	Wit ED *et al*., 2013; Munster *et al*., 2013
	SARS COV 2	nCoV-WA1-2020; 2.6 $\times 10^6$ $TCID_{50}$, IT, IN, OC y OR	Hisopados nasales, faríngeos, rectales; pulmones, lavado bronquioalveolar, ganglios linfáticos, tejidos GIT	Cambios en el patrón respiratorio, piloerección, apetito reducido, postura encorvada, apariencia pálida y deshidratación	Infiltrados pulmonares , neumonía intersticial, edema pulmonar	Munster *et al*., 2020

Especie de animal	Virus	Subtipo de Virus; Ruta de inoculación y dosis	Aislamiento Viral	Signos clínicos	Lesiones histopatológicas	Referencias
Macaco cangrejero	SARS	Paciente 5688; IT, IN, CJ; 10^6	Hisopados nasales, faríngeos ; heces	Letárgico; dificultad respiratoria	Consolidación pulmonar multifocal severa	Fouchier *et al.*, 2003
		TOR-2; IT; 10^7 PFU	Hisopados nasales y orales	Tos leve	Algunas adherencias pleurales dispersas	Rowe *et al.*, 2004
		Urbani; IB, IN, CJ; $3x10^{6.3}$ PFU	Hisopados nasales, faríngeos; orina, hisopados rectales, heces	Letargo; congestión nasal; respiración levemente dificultosa	no se detecto	McAuliffe *et al.*, 2004
		HKU39849; IN, IG, IT, IV; 10^3-10^8 TCID50	Hisopados nasales, faríngeos y rectales	Solo se observó seroconversión	Sólo la dosis alta provocó edema; inflamación; virus infeccioso detectado en el recto	Nagata *et al.*, 2007
	SARS COV 2	BetaCoV/Munich/Bav Pat1/2020 IT and IN, 10^6 $TCID_{50}$	Hisopados nasales, faríngeos, rectales	Un animal tuvo una descarga serosa nasal	Tejidos pulmonares consolidados	Rockx *et al.,2020*
		SARS-CoV-2 Victoria/01/2020 ; IN, IT 5×10^6 PFU	Lavados nasales, hisopados faríngeos y rectales	No se observo	Áreas coalescentes a multifocales neumónicas del parénquima pulmonar, hiperplasia de los neumocitos tipo 2, células mononucleares dispersas en las paredes alveolares	Salguero *et al.*, 2021
Mono juvenil verde africano	SARS	Urbani; IB , IN; $3 \times 10^{6.3}$ $TCID_{50}$	Hisopados en el tracto respiratorio, heces	No se hallo	Algunos animales presentaban neumonitis intersticial focal	McAuliffe *et al.*, 2004
	SARS COV 2	USA-WA1/2020 ; IT,IN, OC; 1.05×10^6 PFU	Hisopados nasales, faríngeos, pulmón	Letargia; dificultad respiratoria	Neumonitis intersticial y alveolar	Singh *et al.*, 2021

Especie de animal	Virus	Subtipo de Virus; Ruta de inoculación y dosis	Aislamiento Viral	Signos clínicos	Lesiones histopatológicas	Referencias
Mono titi	SARS	Urbani; IT; 10^6 PFU	No	Temperatura levemente elevada; algunos animales tenían diarrea; algunos animales fueron anestesiados	Neumonitis intersticial multifocal a coalescente, presencia de sincitios multinucleados; hiperplasia de neumocitos tipo 2; hepatitis linfocítica multifocal; colitis intersticial difusa leve	Greenough *et al.*, 2005
	MERS	EMC/2012; IO, IT o IV; 5-10^6 $TCID_{50}$ to 5-10^7 PFU	Hisopados nasales y orales	Aumento de la frecuencia respiratoria, movimientos reducidos; pérdida de apetito y peso	Neumonía; consolidación multifocal y decoloración rojo oscuro; infiltración intersticial difusa leve a marcada en los lóbulos pulmonares inferiores	Falzarano *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2015
	SARS COV 2	Cepa china; IN, 10^6 PFU	Hisopados nasal , faríngeo y anal	No hubo	Infección leve	Lu *et al.*, 2020
		USA-WA1/2020 ; IT,IN, OC; 1.05×10^6 PFU	Hisopados nasales , faríngeos y pulmón.	No se reporto	Infección leve	Singh *et al.*, 2021
Mono Saimiri	SARS COV 2	nCoV-WA1-2020; IT,IN; 2.6×10^4 $TCID_{50}$	No	No se reporto	No hubo inmunoreactividad al virus, sin embargo presento una leve-moderada neumonía intersticial	Clancy *et al.*,2021

Los modelos infecciosos en ratas de laboratorio fueron exitosos SARS y SARS CoV 2; mas no para MERS porque el dominio de unión al receptor de la proteína viral S (DPP4) del roedor tiene sitios de glicosilación que bloquean el reconocimiento viral (Gong y Bao, 2018). A pesar que SARS y SARS CoV 2 no desarrollaron síntomas respiratorios, hubo evidencias de daño leve a nivel pulmonar cuando el virus se inoculo a ratas de cepas albino (Subbarao *et al*., 2004; Boudewijns *et al*., 2020). Cuando se inocularon SARS CoV 2 en cepas de ratones modificadas se observó lesiones asociadas a neumonía (Bao *et al*., 2020).

El modelo experimental en hurones con SARS y SARS CoV 2 proporciono datos compatibles al síndrome respiratorio en humanos, con severas lesiones en los bronquios y pulmones (Van den Bran *et al.,* 2008; Abdel-Moneim *et al.,* 2020).

En mascotas, la inoculación experimental de SARS y SARS CoV 2 informo que los gatos y los hamsters dorados desarrollan daños histológicos en las vías respiratorias, mientras que en los perros infectados no se logró detectar ARN viral (Gong y Bao, 2018; Abdel-Moneim *et al.,* 2020).

Cuadro 3. Modelos experimentales de SARS y SARS CoV 2 en Ratones de laboratorio (Gong y Bao, 2018; Abdel-Moneim *et al.,* 2020).

Especie de animal	Virus	Subtipo de Virus; Ruta de inoculación y dosis	Aislamiento Viral	Signos clínicos	Lesiones histopatológicas	Referencias
	SARS	Urbani; IN; 10^5 $TCID_{50}$	No	No se encontró	No se manifestó patología	Subbarao *et al.*, 2004
Mus musculus cepa albina	SARS	Urbani; IN; 10^5 $TCID_{50}$	No	Pérdida de peso significativa; encorvado; pelo erizado y ligera deshidratación medida por la turgencia de la piel	Daño alveolar que incluye infiltrado intersticial y linfohistiocitico; depósitos proteicos alrededor de las paredes alveolares; edema intraalveolar; infiltrados perivasculares	Subbarao et al., 2004
	SARS COV 2	Belgium/GHB-03021/2020 ; IN ; 2×10^5 $TCID_{50}$	No	No se encontró	Patología pulmonar leve	Boudewijns *et al., 2020*
Mus musculus SCID (que carecen de células T y B funcionales)	SARS COV 2	Belgium/GHB-03021/2020 ; IN, 2×10^5 $TCID_{50}$	No	No se encontró	Patología pulmonar leve, regulación positiva de moléculas efectoras antivirales	Boudewijns *et al., 2020*
Mus musculus cepa C57BL/6 y ifnar 1	SARS COV 2	Belgium/GHB-03021/2020 ; IN, 2×10^5 $TCID_{50}$	No	No se encontró	Niveles incrementados de hemorragia intraalveolar, inflamación peribronquiolar	Boudewijns *et al., 2020*
Mus musculus modificado transgénico		BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB169 01/2020; IN, 10^5 $TCID_{50}$/50 µL	No	Ratón hACE2 con pérdida de peso , pelo erizado ligeramente	Pulmón decolorado, dañado, tumefacto, agrandado; neumonía con acumulación de linfocitos y monocitos, macrófagos, linfocitos T y B	Bao *et al., 2020*

Cuadro 4. Modelos experimentales de SARS y SARS CoV 2 en Mascotas (Gong y Bao, 2018; Abdel-Moneim *et al.,* 2020).

Especie de animal	Virus	Subtipo de Virus; Ruta de inoculación y dosis	Aislamiento Viral	Signos clínicos	Lesiones histopatológicas	Referencias
Hámster dorado	SARS	Urbani; IN; 10^3 $TCID_{50}$	No	No se hallo	El epitelio respiratorio de la tráquea, incluida la tráquea y los bronquios, mostró hinchazón y ampollas en el citoplasma luminal; pérdida focal de cilios	Roberts *et al.*, 2005
		Hong Kong strain; IN, 10^5 PFU/0.1 mL	No	Taquipnea, pérdida de peso corporal	Daño alveolar difuso, hemorragia pulmonar severa, Fase proliferativa de reparación tisular. Atrofia linfoide y esplénica asociada a la activación de citoquinas	Chan et al., 2020
	SARS COV 2	Cepa BetaCoV/Hong Kong/VM20001061/2020 ; IN, 8×10^4 $TCID_{50}$/80µL	No	Piel arrugada, pérdida de peso corporal	Neumonía, consolidación pulmonar Linfocitos T CD3 positivos en la región peribronquial	Sia et al., 2020
		Belgium/GHB-03021/2020; 2×10^5 $TCID_{50}$, IN	No		Bronquiolitis necrotizante multifocal, infiltración masiva de leucocitos y edema	Boudewijns *et al., 2020*
Gato	SARS	HKU39849 (4 pasajes); IT; 10^6 $TCID_{50}$	No	No se encontró	Leve a moderado daño alveolar difuso exudativo multifocal, leve-moderada traqueo-bronqueo adenitis multifocal ; hiperplasia linfoide en los ganglios linfáticos traqueobronquiales , mesentéricos , placas de Peyer y bazo	Van den Brand *et al.*, 2008
	SARS COV 2	SARS-CoV-2/CTan/human/2020/Wuhan; IN; 10^5 PFU	No	No se encontró	Lesiones en el epitelio de la mucosa nasal, traqueal y en los pulmones	Shi et al., 2020

Cuadro 5. Modelos experimentales de SARS y SARS CoV 2 en Hurones (Van den Bran *et al.,* 2008; Abdel-Moneim *et al.,* 2020).

Especie de animal	Virus	Subtipo de Virus; Ruta de inoculación y dosis	Aislamiento Viral	Signos clínicos	Lesiones histopatológicas	Referencias
Hurón	SARS	HKU39849 (4 pasajes); IT; 10^6 $TCID_{50}$	No	Letargia y mortalidad	Leve a severo daño alveolar difuso subagudo multifocal con presencia de neutrófilos y macrófagos, hiperplasia multifocal e hipertrofia de neumocitos tipo II y células epiteliales bronquiolares, hiperplasia del tejido linfoide asociado a los bronquios; lipidosis, congestión y leve hemorragia hepática; hiperplasia linfoide de los ganglios linfáticos traqueobronquiales y en el bazo	Van den Brand *et al.*, 2008
	SARS COV 2	NMC-nCoV02, $10^{5.5}$ $TCID_{50}$	Hisopados nasales y saliva	Actividad reducida, temperatura corporal elevada y tos esporadica	Bronquiolitis aguda, antígenos virales en cornete nasal, tráquea, pulmones e intestino Aumento de la infiltración de células inmunitarias en el tracto respiratorio	Kim et al.,2020
		SARS-CoV-2/CTan/ human/2020/ Wuhan; IN; 10^5 PFU	Cornetes nasales	Fiebre y pérdida de apetito	Severa perivasculitis y vasculitis linfoplasmocítica; incrementado número de neumocitos tipo II, macrófagos y neutrófilos en los tabiques alveolares y la luz alveolar; y peribronquitis leve en los pulmones .	Shi et al., 2020
		SARS-CoV-2 2019_nCoV Muc-IMB-1 ; IN; 10^5 $TCID_{50}$	Cornetes nasales, pulmón y tráquea	No	Rinitis con degeneración y necrosis del epitelio respiratorio y leve edema de la mucosa	Schlottau *et al., 2020*

La musaraña del árbol (*Tupaia belangeri chinensis)* fue evalda en un ensayo experimental con SARS CoV 2, presentando alteraciones patológicas en los pulmones y en otros órganos (Zhao *et al.,* 2020). Por otro lado, el conejo blanco de Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) fue inoculado con MERS y presento lesiones a nivel de las cavidades nasales (Haagmans *et al.,* 2015). También, como parte de un monitoreo epidemiológico, se inoculo SARS CoV 2 en venados de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), demostrando que el virus se pudo aislar de hisopados nasales, orales y rectales; y que afecto las vías respiratorias (Martins *et al.,* 2022).

Con el fin de encontrar otros reservorios animales que puedan ser infectados con los coronavirus humanos emergentes, animales de producción como la alpaca y cabras dieron positivo al aislamiento viral después que se infectaran con MERS, desarrollando lesiones a nivel de los cornetes nasales. Por otro lado, los inóculos de SARS CoV 2 en Visones (*neovison vison*) que provenían de granjas europeas desarrollaron síntomas respiratorios y severas lesiones a nivel de los cornetes nasales, bronquios y pulmones.

Cuadro 6. Modelos experimentales de SARS, MERS, SARS CoV 2 en otros animales (Haagmans *et al.,* 2015; Zhao *et al.,* 2020; Martins *et al.,* 2022).

Especie de animal	Virus	Subtipo de Virus; Ruta de inoculación y dosis	Aislamiento Viral	Signos clínicos	Lesiones histopatológicas	Referencias
Musaraña del árbol	SARS COV 2	IN, 10^6 PFU	Pulmón	Transitoria elevación de temperatura	Alteraciones patológicas en los pulmones, intestinos, bazo, cerebro, corazón, hígado, páncreas	Zhao *et al*., 2020
Conejo blanco de Nueva Zelanda	MERS	EMC/2012; IN; 4×10^6 $TCID_{50}$	Hisopados nasales, faríngeos y rectales	No se observo	Infiltración leve a moderada de leucocitos heterófilos en cavidad nasal	Hagamans *et al., 2015*
Venado de cola blanca	SARS COV 2	NYI67-20, IN; 5 x $10^{6.38}$ $TCID_{50}$.ml-1	Hisopados nasales, orales y rectales	Ligero aumento de la temperatura	Cornetes nasales con infiltrados linfoplasmocitarios en la submucosa y exudación de neutrófilos en la mucosa; Depleción linfoide moderada, hemorragias multifocales en el epitelio de las tonsilas y en la submucosa de las vías respiratorias altas; Congestión en los alveolos, infiltrados linfohistiociticos perivasculares e intersticiales en el pulmón. Hiperplasia de los linfocitos tipo II	Martins *et al*., 2022

Cuadro 7. Modelos experimentales de MERS y SARS CoV 2 en animales de producción (Gong y Bao, 2018; Adney *et al*., 2021; Virtanen *et al*., 2022).

Especie de animal	Virus	Subtipo de Virus; Ruta de inoculación y dosis	Aislamiento Viral	Signos clínicos	Lesiones histopatológicas	Referencias
Alpaca	MERS	EMC/2012; IN; 10^7 PFU	Hisopados nasales	No se observo	Leve metaplasia escamosa del epitelio de los cornetes; hipertrofia folicular e hiperplasia de los ganglios linfáticos de drenaje	Adney *et al.*, 2016
Cabras	MERS	EMC/2012; IN; 1.4×10^6-1.9×10^6 PFU	Hisopados nasales	No se observo	Una cabra presento áreas multifocales de pérdida de células caliciformes; Necrosis epitelial o metaplasia escamosa y atenuación y/o erosión	Adney *et al.*, 2016
Visón	SARS COV 2	hCoV-319 19/England/204820 464/2020, EPI_ISL_683466; IN, IT; 10^5 $TCID_{50}$	No	Pérdida de peso, postura encorvada, letargia, aumento del esfuerzo respiratorio, taquipnea, descarga nasal esporadica con epistaxis y de consistencia serosa	Rinitis con neutrofilia marcada, degeneración y necrosis del epitelio respiratorio. Congestión vascular moderada con engrosamiento de los tabiques alveolares por edema, fibrina e infiltrado celular. Luz alveolar con edema, fibrina y macrófagos.	Adney *et al.*, 2021
		hCoV-19/Finland/ THL-202126660/ 2021,EPI_ISL_ 8768822; IN; 4×10^5 PFU	No	Letargia, anorexia, diarrea, secreción nasal y lagrimal ; estornudos	Degeneración y pérdida del epitelio respiratorio nasal, infiltración neutrofílica en la mucosa y/o submucosa. Hiperplasia del epitelio de los bronquios con aumento de células caliciformes, edema perivascular y peribronquial. Daño alveolar multifocal a coalescente con degeneración y/o necrosis de septos alveolares, proliferación de neumocitos tipo II; luz alveolar con macrófagos, desprendimiento celular, edema y hemorragia.	Virtanen et al., 2022

2.3.2. Coronavirus en la Interface Humano-Animal

Debido al carácter zoonótico de los Betacoronavirus (SARS, MERS y SAR CoV 2) y la constante recombinación, los coronavirus potencialmente patógenos en el ser humano han sido hallados en animales de crianza, producción, hogares familiares y zoológicos, dando a conocer que los animales pueden cumplir el rol de hospedar o amplificar el virus y potenciar la transmisión intraespecies e interespecies (Wang y Eaton, 2007; Mackay y Arden, 2015; Yoo y Yoo, 2020).

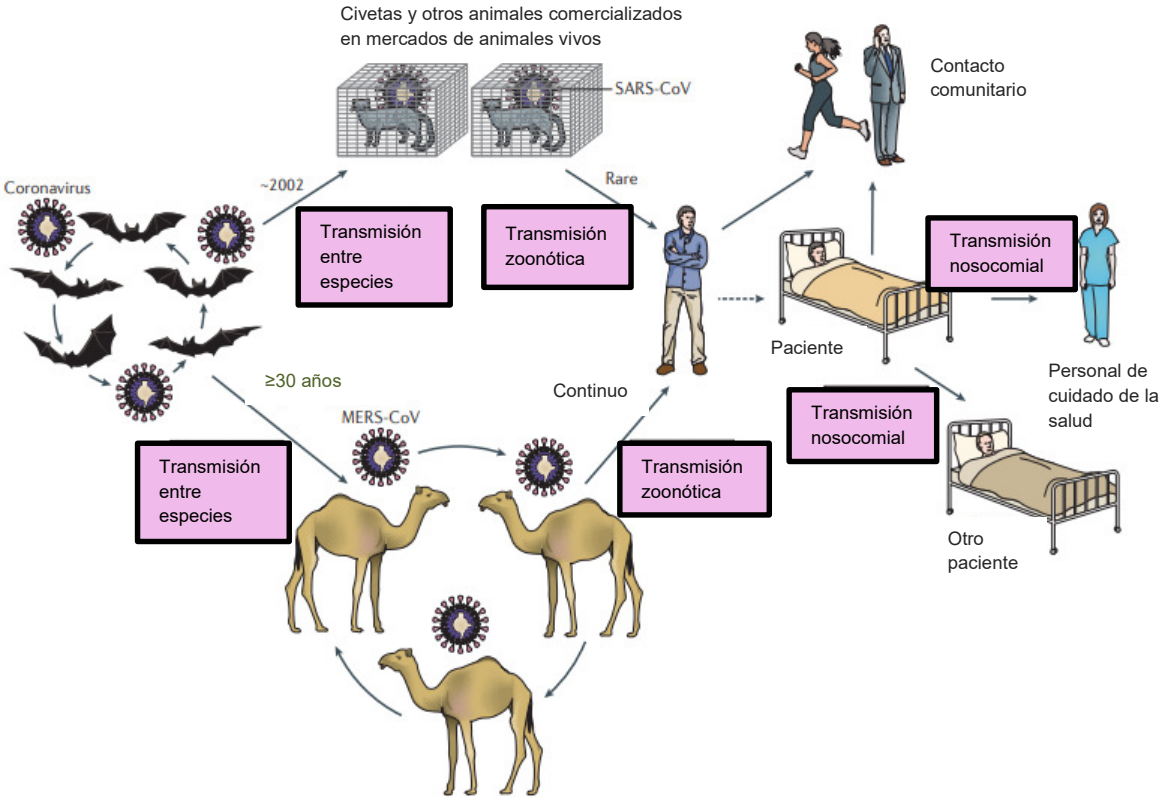

Figura 3. Escenarios antropozoonóticos que favorecieron la dispersión de SARS y MERS en los humanos (De Wit *et al*., 2016).

El estudio de SARS en animales inicio en los mercados que comercializaban animales en China debido a que los primeros humanos infectados con el virus habrían desempeñado ocupaciones de estrecha relación con los animales silvestres (manipulación, sacrificio y venta) y la preparación de estos animales en restaurantes (Wang y Eaton, 2007). Consecuentemente, estudios en fauna silvestre in situ revelaron que las cepas encontradas en murciélago *Rhinolophus* en países europeos, Sudeste del Asia y China son variantes del SARS; mientras que los murciélagos Hipposideros de África son menos próximos a SARS CoV (Ge *et al.,* 2013; Cui *et al*., 2019). Por otro lado, los coronavirus de

las civetas provenientes del mercado de Guangdong tuvieron similaridades en su estructura genómica con el SARS CoV excepto las variaciones como la diferencia de residuos de aminoácidos (479 Y 787) en el RBD de la subunidad S1 del gen S y en la deleción de 82 nucleótidos del gen accesorio *orf 8* (Cui *et al*., 2019).

El virus de MERS está fuertemente asociado con los dromedarios, dado que estos animales sirven en el transporte de mercancías y viajeros, así como una fuente de alimento en Oriente Medio; y se plantea que uno de los factores que ha contribuido al aumento de interacciones camellos- humanos es la concentración de pastoreo de camellos en las áreas urbanas del Medio Oriente (Chan *et al*., 2015). Aunque una proporción de casos humanos afirma no haber tenido contacto con estos animales, la identificación de muestras de sueros de camellos colectadas en el año 1983 que estuvieron infectadas con este coronavirus es un claro indicio que el virus ha estado en recombinación constante para adaptarse al hospedero humano (Chan *et al*., 2015; Cui *et al*., 2019). Asimismo, el árbol de relaciones evolutivas de secuencias genómicas de los Merbecovirus ha constatado el parentesco de Coronavirus de murciélagos con MERS de humanos (Figura 3) y explica que los humanos y los camellos comparten un mismo origen. La alta estabilidad genética del virus y su dinámica epidemiológica dentro de la población humana continúa siendo una preocupación en los diversos territorios de la península arábica (Chan *et al*.,2015; Cui *et al*., 2019).

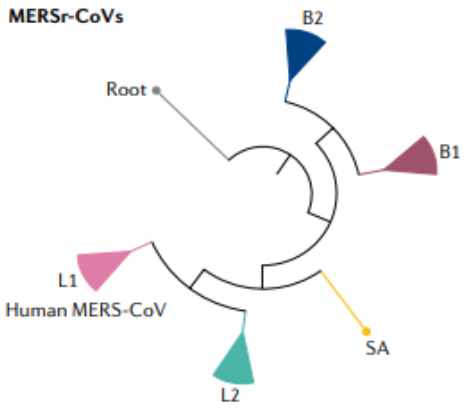

Figura 4. Árbol filogenético simplificado de los coronavirus relacionados con el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERSr-CoV) que forman dos linajes virales principales, L1 y L2. El linaje L1 se encuentra en humanos y camellos, mientras que L2 se encuentra solo en camellos. Dos clusters pequeños B1 (murciélago 1) y B2, y un solo virus, SA, de Sudáfrica, se encontraron en murciélagos (Cui *et al*., 2019).

Los animales susceptibles a SARS CoV2 derivaron de muchos escenarios antropozonóticos como los mercados de ventas de animales, zoológicos y los hogares de distintas partes del mundo (Yoo y Yoo, 2020).

Siendo China el epicentro de la pandemia, los animales que poseían estrecha relación filogenética al novel virus, como lo son los murciélagos y los pangolines, marcaron trascendencia para la investigación en evolución y posibles huéspedes de SARS CoV 2 en animales (Zhang *et al*., 2020).

Un estudio que comparaba los receptores ACE2 de mamíferos y que predecía la habilidad para unirse al SARS CoV2, determino que los primates de viejo mundo, roedores, cérvidos, oso gigante y tamandúa tendrían más probabilidad de ser susceptibles al nuevo coronavirus (Damas *et al*., 2020).

Debido a que SARS CoV 2 es compatible al receptor de muchos mamíferos, un monitoreo serológico en gatos de la provincia de Wuhan, China informo que los felinos domésticos presentaban anticuerpos contra el SARS CoV 2. Los gatos con título altos de la prueba de neutralización pertenecían a pacientes con COVID 19 en contraposición a los gatos callejeros que presentaban titulación mínima (Abdel-Moneim y Abdelwhab, 2020; Zhang *et al.,* 2020). Otro caso en China y en otros países como Bélgica, Estados Unidos, España, Francia notificaron la presencia de SARS CoV 2 en gatos que tuvo mucha correlación con dueños enfermos (Abdel-Moneim y Abdelwhab, 2020). De este modo se devela que los gatos son muy susceptibles al nuevo coronavirus y que su posible transmisión tenga conexión con el humano (Yoo y Yoo, 2020).

Otro mamífero reportado como susceptible al nuevo coronavirus es el perro, el primer caso fue un Pomerania con altas cargas virales proveniente de Hong Kong y los otros dos fueron pastores alemanes de Hong Kong y Estados Unidos (Hobbs y Reid, 2021). A pesar de que el perro de Norteamérica fue positivo a SARS CoV 2 y manifesto sintomatología respiratoria, un estudio experimental muestra que los perros presentan leve susceptibilidad al coronavirus pandémico (Hobbs y Reid, 2021; Shi *et al*., 2020).

En Estados Unidos, diferentes zoológicos reportaron que tigres de Malaya *Panthera tigris*, leones *Panthera leo*, leopardo de las nieves *Panthera uncia* y un gorila

Gorilla gorilla tenían síntomas respiratorios y los análisis serológicos y moleculares dieron a SARS CoV 2; y se presume que los animales se contagiaron por la exposición con cuidadores asintomáticos a SARS CoV 2 (Hobbs 2021; OIE, 2021). Asimismo, en Sudáfrica, un puma y tres leones de un zoológico presentaron descargas nasales, anorexia y diarrea fueron positivas al SARS CoV 2, estos casos fueron en diferentes años y da soporte a la hipótesis que es una transmisión humano- animal (Koeppel *et al.,* 2022).

Altas prevalencias de SARS CoV 2 experimentaron visones de Granjas en diferentes partes de Europa, mostrando que un 70 % de ellas cursaban con sintomatología clínica. Los animales afectados eran juveniles y adultos, sus principales síntomas eran descarga nasal, diarrea, depresión y estornudos. La ingestión reducida de alimentos y la mortalidad alcanzo a más de la mitad de granjas infectadas (Pomorska-Mól *et al.,* 2021). Los ensayos clínicos con mustélidos prueban que estas especies poseen una gran susceptibilidad a contraer enfermedades de origen humano. (Van den Bran *et al.,* 2008; Abdel-Moneim y Abdelwhab, 2020).

2.4. Pruebas Diagnósticas

2.4.1 Aislamiento viral

Los cultivos celulares son una mezcla de células obtenidas de la disociación de células mediante rotura mecánica y un tratamiento con enzimas proteolíticas, que después son suspendidos en medio de cultivo y colocados en frascos de plástico o placas cubiertas (Flint *et al*., 2015; Procop *et al.,* 2017). El aislamiento de virus en este medio facilita la producción de un banco de virus vivo para posteriores análisis antigénicos y genómicos. (Procop *et al.,* 2017; MacLachlan y Dubovi, 2017).

Las líneas celulares provienen de los cultivos celulares primarios que son subcultivados repetidamente *in vitro* por un tiempo indefinido. El cultivo de coronavirus en líneas celulares es concebido para fines de investigación en laboratorio (Procop *et al.,* 2017). Cuando la célula es infectada con el virus, empiezan a visualizarse cambios que se denominan como efectos citopaticos (ECP) (Flint *et al*., 2015).

Los coronavirus se han aislado en líneas celulares animales y humanas. La línea animal más utilizada es la Vero E6 (derivada de riñón de mono verde africano) (Chan *et al*., 2013; Chu *et al*., 2020) Otras líneas celulares que presentaron altas cargas de

coronavirus en diferentes animales y el ser humano, se muestran en el cuadro 8. La cuantificación viral nos permite medir la infectividad del coronavirus en células vero E6 mediante los métodos de ensayo de placa y ensayo de dilución de punto final (Ryu, 2017).

En el ensayo de placa, los títulos virales se califican contando las unidades formadoras de placa (ufp), este método requiere diluciones seriadas (10 veces) del virus en una monocapa celular y una tinción como un anticuerpo marcado o enzima. La célula infectada por el virus se lisará y se propagará a las células adyacentes y formará la placa (Ryu, 2017; Specter *et al.,* 2009). Asimismo, otra unidad de título viral es el valor de multiplicidad de infección, donde el inóculo de coronavirus deberá contener una multiplicidad de infección de 0.1 (positivo) y 0.01 (positivo bajo) (Jerome, 2010; Ryu, 2017).

En el ensayo de dilución de punto final, los cambios morfológicos como los ECP se cuantifican en base al criterio de valoración que es el recíproco de la mayor dilución de virus que infecta el 50% del sistema del hospedero o definida como la dosis infectiva del cultivo (TCID 50). El titulo viral se determina con más exactitud mediante la titulación del 0.5 log10 de diluciones del virus (Ryu, 2017; Specter *et al.,* 2009).

Cuadro 8. Líneas celulares utilizadas para aislamiento de coronavirus. (Elaboración propia).

Especie	Línea celular	Nombre	Referencias
Bovino	BEL	Pulmón embrionado de bovino	Saif, 1988
Canino	A72	Fibrosarcoma canino	Ntafis et al., 2011
	MDCK	Riñón canino de Mardin-Darby	Chu *et al*., 2020
Felino	CRFK	Riñón de felino	Chu *et al*., 2020
Conejo	RK-13	Riñón de conejo	Chu *et al*., 2020
Cerdo	PK-15	Riñón de cerdo	Chu *et al*., 2020
Primates no humanos	MARC-145	Riñón de mono verde africano	Jung and Saif,2015
	FRhK4	Riñón fetal Rhesus	Chu *et al*., 2020
Humanos	HRT-18	Adenocarcinoma humano rectal	Tsunamis *et al.,1991*
	A549 , Calu-3	Adenocarcinoma del pulmón	Chan *et al*., 2013
	Huh- 7	Carcinoma hepatocelular	Chan *et al*., 2013
	Células CaCo2	Células de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano	Chan *et al*., 2013
	HeLa	Adenocarcinoma cervical	Chan *et al*., 2013

2.4.2. Detección de antígenos virales

Inmunofluorescencia directa detecta y visualiza las proteínas virales expresadas en las células a través de la reacción antígeno-anticuerpo. En esta prueba las células infectadas se cultivan en un portaobjeto, las células crecen en una monocapa y para visualizar el antígeno, las células se fijan con paraformaldehido, formando un complejo inmunitario estable. Luego las células se permeabilizan con un detergente adecuado, como Triton X-100, se aplica un anticuerpo primario y de esta manera se unen al antígeno viral. Luego se aplica un anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína, permitiendo la posterior observación de los antígenos a través del microscopio de fluorescencia (Louten, 2016; Ryu, 2017).

2.4.3. Diagnostico Serológico

a. ELISA INDIRECTO

Por medio de la técnica de ELISA Indirecta, se desarrolla la cuantificación de anticuerpos de la muestra del espécimen, la cual es medida según la intensidad de luz que emita el espectrofotómetro. En esta prueba, los anticuerpos primarios (muestra) son agregados a las placas recubiertas de antígeno, donde se formará un complejo antígeno-anticuerpo y que después de un lavado se agregarán los anticuerpos secundarios los cuales serán marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP) o fosfatasa alcalina (PA) que reconocen los anticuerpos primarios. Se incuba y nuevamente pasa por la fase de lavado, finalmente se añadirá el sustrato que promoverá la reacción enzimática (el cambio de color) (Louten, 2017; Ryu, 2017; Dowlatshashi *et al*, 2021).

b. Ensayo de neutralización

El ensayo de neutralización mide la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión del receptor del virus, limitando la infectividad y citotoxicidad del virus. La prueba de neutralización por reducción de placa utiliza células vero E6 mantenidas en medio de Eagle modificado de Dulbelcco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (estreptomicina o penicilina) en una incubadora de CO_2. Las células se siembran en una placa de múltiples pocillos y se infectan con el virus al día siguiente. El virus se replica dentro de la célula causando su lisis y la formación de placas que son medidas en unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/ML), para evitar contaminaciones las células infectadas se superponen en un medio que contiene carboximetilcelulosa (Fields *et al*., 2001).

La muestra de suero que fue inactivada con calor se mezcla con la solución viral. Si el suero añadido contiene anticuerpos neutralizantes, este inhibirá la infección de la célula Vero E6, lo que reduciría el conteo de unidades formadoras de placa después de los 2 a 3 días de incubación (Fields *et al*., 2001; Septisetyani *et al.,* 2021).

Otra prueba que utilizan es el ensayo de neutralización basado en pseudovirus, este prototipo de virus expresara las proteínas de superficie de un virus y el núcleo de otro virus, siendo de mayor utilidad cuando se trabajan con coronavirus de alto riesgo. Para la preparación del nuevo virus con el núcleo del coronavirus se han utilizado sistemas hospederos como los cultivos celulares e inoculación en ratones, en el cual se desarrolla la pseudoparticula que cargara el reportero de proteína verde fluorescente con el gen de la proteína Spike (Spencer *et al.,* 2009; Fritz *et al.,* 2021).

c. Ensayo de Inmunofluorescencia indirecta:

Esta prueba corresponde a la unión del anticuerpo con el antígeno, caracterizándose porque la lámina con la preparación viral estará fijada en anticuerpos de fluorescencia y que estarán superpuestas con el suero del animal. Se desarrollará procesos de incubación y lavado de los portaobjetos. Asimismo, se pueden utilizar anticuerpos de cabra o conejo marcado con fluorocromo dirigido contra Inmunoglobulina; así como conjugados marcados con enzimas (peroxidasa de rábano picante) (Fields *et al.*, 2001; Procop *et al.,* 2017).

Las muestras que hayan sido marcadas con los fluorocromos serán inspeccionadas en el microscopio de fluorescencia; esto no sucede con las pruebas de enzimas conjugadas que dan lugar a un precipitado coloreado que se observara en el microscopio óptico (Procop *et al.,* 2017).

d. Inmunotransferencia o Western Blot

El procedimiento se lleva a cabo con antígenos virales de células infectadas, en las que sus proteínas son desnaturalizadas, más adelante son separadas mediante electroforesis utilizando un gel de poliacrilamida, luego las proteínas son transferidas a una membrana hecha de nitrocelulosa. Posteriormente, los anticuerpos ligados a enzimas frente a proteínas que se han separado, son añadidos en un tampón líquido a la membrana y se unirán

específicamente a las bandas de antígenos proteicos, se incorporará un substrato y las enzimas producirán una luz o fluorescencia (Fields *et al.,* 2001; Louten, 2016).

2.4.4 Diagnóstico Molecular

Las técnicas moleculares son eje clave del diagnóstico de enfermedades virales en animales, resaltando su contribución en el genotipado de muchos coronavirus endémicas de distintas regiones del mundo, así como las variantes reemergentes en humanos y animales (Terada *et al*., 2014, Menachari *et al*., 2015; Amer *et al*.,2018; Zhu *et al*., 2020; Turlewicz y Pomorska, 2021).

El PCR de transcripción reversa (rt PCR) es una de las técnicas moleculares que nos permite detectar secuencias consenso del coronavirus, utilizando cebadores que son diseñados después de una alineación de todos los genes de polimerasa de ARN dependientes de ARN de coronavirus. (De Souza *et al.*, 2007; Poon *et al.*, 2005). Otro tipo de rt-PCR utilizado que detecta todos los géneros de coronavirus es el PCR nested (nPCR) de pancoronavirus, que también está basado en la secuencia RdRp (Vijgean *et al*., 2008).

También se ha desarrollado otras técnicas con resultados más rápidos como el rt PCR en tiempo real, caracterizada porque el producto del PCR se monitorea en tiempo real, observándose que los restos de unión de ADN alteran la fluorescencia al unirse al ADN amplificado. Este método se puede desarrollar mediante la agregación de un colorante fluorescente a la mezcla del PCR como el SYBR Green o mediante la adición de un oligonucleótido marcado con fluorescencia entre los cebadores llamado sonda. (Cunha y Inácio, 2015).

Los RT-PCR MULTIPLEX, nos permite la identificar varios coronavirus sin necesidad de realizar una secuenciación, siendo un modelo práctico utilizado en el diagnóstico de coronavirus en porcinos. (Zhang, 2016).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Lugar de Estudio

El estudio fue ejecutado en el departamento de Lima, en animales silvestres incautados y rescatados por el Servicio Nacional de Forestal y de Fauna Silvestre de Lima, Perú, cuyas instalaciones se encuentran localizadas en el distrito de Ate-Lima. El diagnóstico molecular se llevo a cabo en el Laboratorio de Epidemiologia e Economía Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La facultad se encuentra localizada en el distrito de San Borja, provincia de Lima, departamento de Lima. La toma de muestras fue ejecutada en el periodo de enero del 2020 a diciembre del 2022.

3.1.2. Tamaño muestral:

En este estudio se utilizó todos los animales incautados y/o rescatados por SERFOR- Lima durante el periodo enero 2020 a diciembre 2022. Se colectaron 159 muestras de animales silvesetres correspondientes a 28 mamiferos y 131 aves. Las muestras biológicas colectadas fueron hisopados orofaríngeos y rectales o cloacales de cada animal. Por lo tanto, se analizaron 159 muestras de hisopados orofaringeos y 159 de hisopados rectales

Los criterios de inclusión y exclusión para el estudio fueron los siguientes:

Criterios de inclusión

- Todos los mamíferos y aves silvestres decomisados o rescatados por SERFOR LIMA durante el periodo enero del 2020 a diciembre del 2022.

- Toma de las muestras orofaringeas y rectales o cloacales de mamíferos y aves silvestres decomisados o rescatados por SERFOR.

- La muestra provino de todos los mamíferos y aves silvestres vivos o muertos decomisados o rescatados por SERFOR LIMA.

Criterios de exclusión

- Exclusión de toma de muestra en animales silvestres que no han sido decomisados o rescatados por SERFOR LIMA.

- Exclusión de toma de muestra de animales que no sean mamíferos o aves silvestres.

- Exclusión de muestras biológicas que no provengan de las vías orofaríngeas, recto o cloaca.

3.2.Métodos

3.2.1. Colección de la Muestra

Las muestras fueron colectadas por el personal veterinario del SERFOR-Lima y donadas para el presente estudio. Para cada especie animal, se colectaron muestras de mucosa mediante un hisopado orofaríngeo y muestras de heces mediante un hisopado rectal o cloacal. Para ambos muestreos se utilizaron un hisopo estéril, los cuales posterior al muestreo fueron almacenados en medio de transporte universal (UTM-RT™) a -20°C hasta su procesamiento (extracción de material genético), dentro de las 24-48 horas posterior a la colecta (ANEXO 3).

3.2.2. Extracción de ARN

El ARN de todas las muestras se extrajo siguiendo el protocolo indicado por el mini kit de ARN viral PureLink™ (Invitrogen) que se encuentra validado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 (OMS, 2020). Todas las muestras se almacenaron a -20°C.

3.2.3. 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, 20 µM del cebador reverso (Cor-Rv: 5′ − TCR CAY TTD GGR TAR TCC CA − 3′) (Moës *et al.,* 2005), 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 finalmente a 4°C.

- **RT- PCR anidado para la región de codificación de RdRp (nsp12)**

Se utilizo un protocolo de PCR anidado para amplificar un fragmento de la region ORF1ab correspondiente a la secuencia que codifica la proteína no estructural 12 (NSP12), responsable de la actividad ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). El PCR primario se realizó utilizando 5 µL ADNc, 12.5 µL de GoTaq Green Master mix (PROMEGA, USA), 0.4 µM de cada primer (Cor-FW: 5′ − ACW CAR HTV AAY YTN AAR TAY GC − 3′ and Cor-RV: 5′ − TCR CAY TTD GGR TAR TCC CA − 3′) (Moes *et al*., 2005) y agua ultrapura para completar un volumen total de 25 µL. Las condiciones del termociclador para el PCR fueron 94 ◦C por 40 s, 48 ◦C por 1 min, y 72 ◦C por 1 min, en 50 cycles, la extensión a 72 ◦C por 10 min, y un paso final a 4 ◦C. El amplicon obtenido para este protocolo de PCR fue de 251 pb.

La PCR secundaria se realizó utilizando 2 µL de producto del PCR primario, 12.5 µL de GoTaq Green Master mix (PROMEGA, USA), 0.4 µM de cada primer (Beta.CoV.F : 5′ − ATT AGT GCW AAG AAT AGA GCY CGC AC − 3′ y Beta.CoV.R: 5′ − TCA CAY TTW GGR TAR TCC CAD CCC A − 3′) (Castilla *et al*., 2021), y agua ultrapura para completar un volumen total de 25 µL. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 95° C por 3 min, seguido de 35 ciclos de PCR (94° C por 40 s, 57° C por 1 min, y 72° C por 40 s), extensión a 72° C por 10 min, y un enfriamiento a 4° C por un tiempo indefinido. Se utilizó un aislado del virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV) de pollo como control positivo, y agua ultrapura como control negativo. El amplicon esperado de esta reacción fue de 227 pb. Todos los

productos de PCR se analizaron en un sistema de electroforesis utilizando geles de agarosa al 1,5 % teñidos con SYBR-Safe (Invitrogen, EE. UU.) y visualizados en un transiluminador UV.

3.2.4. Análisis de Secuencias

Para la secuenciación, los productos positivos en el PCR secundario fueron enviados a secuenciar en la empresa Macrogen, Inc. (Corea del Sur). La secuenciación fue bidireccional utilizando los mismos cebadores del PCR secundario (Beta. CoV.F y Beta.CoV.R). Todas las secuencias se compararon con las secuencias de referencias en el GenBank utilizando Blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov). Todas nuestras secuencias obtenidas fueron registradas en el GenBank.

El polimorfismo de nucleótidos fue evaluado en el programa BioEdit (https://bioedit.software.informer.com/7.2/). El análisis filogenético se realizó sobre una región parcial de 227 nucleótidos de la región ORF1ab utilizando el programa MEGA-X (http://www.megasoftware.net/). Se utilizó el modelo de sustitución GTR + G + I (Tiempo general reversible) como el modelo óptimo mediante una función implementada en MEGA-X. Los árboles filogenéticos fueron inferidos utilizando el enfoque bayesiano implementado en el paquete Beast, con modelos óptimos GTR (Tiempo reversible general) y TN93 (Tamura-Neï 1993).

IV. RESULTADOS

4.1 Mamíferos

En este estudio se incluyeron un total de 28 mamíferos, distribuidos en dos órdenes. El orden Rodentia estuvo representado exclusivamente por ardillas de la especie *Simosciurus nebouxii* (n = 6) y el orden Carnivora incluyó cinco especies: *Lycalopex sechurae* (n = 1), *Nasua nasua* (n = 8), *Potos flavus* (n = 1), *Procyon cancrivorus* (n = 1) y *Otaria flavescens* (n = 11) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Mamíferos decomisados y rescatados por SERFOR en Lima, Perú (periodo enero 2020 – diciembre 2022).

Orden	Familia	Especie	Número de especimens (%)	
			n	%
Rodentia	Sciuridae	*Simosciurus nebouxii*	6	21.4
Carnivora	Canidae	*Lycalopex sechurae*	1	3.6
Carnivora	Procyonidae	*Nasua nasua*	8	28.6
Carnivora	Procyonidae	*Potos flavus*	1	3.6
Carnivora	Procyonidae	*Procyon cancrivorus*	1	3.6
Carnivora	Otaridae	*Otaria flavescens*	11	39.3
		Total	**28**	**100**

Cuatro mamíferos resultaron positivos para pancoronavirus, con una frecuencia del 14.3%. Entre los animales positivos se incluyeron el mapache cangrejero (*Procyon cancrivorus*) y el lobo marino sudamericano (*Otaria flavescens*). El lobo marino sudamericano represento la mayor proporción de casos positivos (Cuadro 10, Figura 5). Todas las muestras positivas correspondieron a hisopados orofaringeos; no se detectaron resultados positivos en las muestras rectales (Cuadro 11).

Cuadro 10. Frecuencia de detección de pancoronavirus en mamiferos

Orden	Familia	Especie	N° Total	N° Positivos	% de Positivos
Carnivora	Procionidae	*Procyon cancrivorus*	1	1	100.0
	Otariidae	*Otaria flavescens*	11	3	27.3

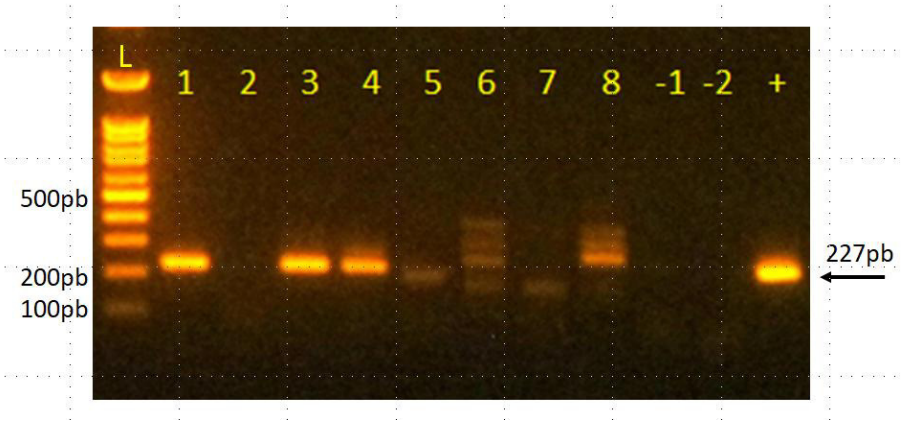

Figura 5. Diagnóstico molecular del coronavirus en aniamles silvestres mediante un análisis de RT-PCR anidada de la región ORF1ab de Pancoronavirus. Carril L: marcador molecular de 100 pb; Carril +: control positivo (virus de la bronquitis infecciosa aviar, *Gammacoronavirus*); Carril -1 y -2: controles negativos (agua ultrapura); Carril 1 = muestra de hisopado orofaringeo de lobo marino (*Otaria flavescens*); Carril 3 = muestra de hisopado orofaringeo de gavilan acanelado (*Parabuteo unicinctus*); Carril 4 = muestra de hisopado orofaringeo de pelicano (*Pelecanus thagus*).

La secuenciación de nucleótidos de las muestras positivas por PCR reveló que todos los coronavirus identificados pertenecían al género *Alphacoronavirus*, específicamente al subgénero *Pedacovirus*. Las secuencias obtenidas de las cuatro muestras provenientes de carnívoros fueron idénticas entre sí y presentaron 100% de identidad con secuencias del virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV, *Pedacovirus*) registradas en primates no humanos de Perú (números de acceso en el GenBank: PP896867-71) y hasta un 99.1 % de identidad con secuencias del virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV, *Pedacovirus*) registradas en GenBank (números de acceso: MN692791, MN692788, KX981440, MK702008 y OQ269589).

Cuadro 11. Identificación molecular de coronavirus en mamiferos incautados y rescatados por SERFOR en Lima, Perú (periodo enero 2020 – diciembre 2022).

Orden	Familia	Especie	Fecha de Colecta	PCR positivo	Virus (%)*
				Orofaríngeo	
Carnivora	Procionidae	*Procyon cancrivorus*	03/09/2021	+	Virus de la diarrea epidémica porcina (98.0 – 99.1%)
Carnivora	Otaridae	*Otaria flavescens*	14/07/2021	+	Virus de la diarrea epidémica porcina (98.0 – 99.1%)
Carnivora	Otaridae	*Otaria flavescens*	16/07/2021	+	Virus de la diarrea epidémica porcina (98.0 – 99.1%)
Carnivora	Otaridae	*Otaria flavescens*	03/02/2022	+	Virus de la diarrea epidémica porcina (98.0 – 99.1%)

* Virus identificado mediante la alineación de secuencia y porcentaje de identidad entre paréntesis(%).

Se construyó un árbol filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud, el cual mostró tres grupos principales: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* y *Gammacoronavirus*. Los *Pedacovirus* detectados en animales silvestres de Perú compartieron una alta similitud en su secuencia de nucleótidos con los virus PEDV provenientes de diferentes países, agrupándose dentro del mismo clado (Figura 6).

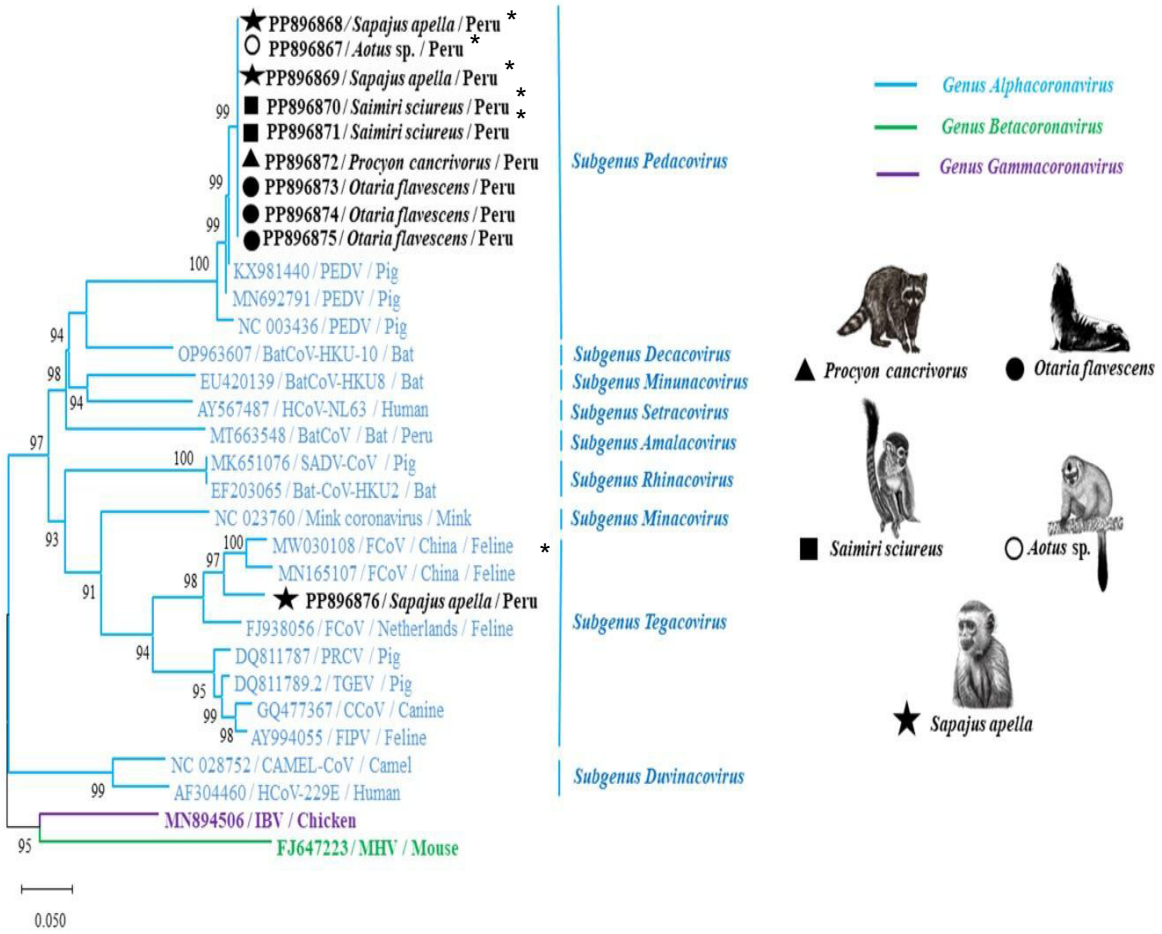

Figura 6. Árbol filogenético topográfico de los coronavirus (*Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* y *Gammacoronavirus*), construido a partir de 27 cepas de referencia y cuatro cepas identificadas en este estudio. Las cepas de referencia registradas previamente en Perú (Sánchez-Chicana, 2023) están marcadas con un asterisco (*). El análisis filogenético se realizó sobre una región parcial de 227 nucleótidos de ORF1ab de Pancoronavirus. Los colores indican los diferentes coronavirus detectados en mamíferos y aves, agrupados en *AlphaCoV* (azul), *BetaCoV* (verde) y *GammaCoV* (violeta). Las muestras de este estudio se resaltan en negro, junto con información sobre el país de origen, el número de acceso en GenBank y la especie hospedera. La escala de distancia representa el número de sustituciones por sitio.

3.2 Aves

En este estudio se analizaron muestras biológicas de 131 especies de aves silvestres pertenecientes a los órdenes Accipitriformes (n = 47), Cathartiformes (n = 34), Charadriiformes (n = 9), Falconiformes (n = 1), Pelecaniformes (n = 13), Procellariiformes (n = 1), Psittaciformes (n = 12), Sphenisciformes (n = 6) y Suliformes (n = 8). La identificación de las especies se realizó mediante caracteres morfológicos, incluyendo el color de las plumas (Cuadro 12).

Cuadro 12. Aves silvestres decomisadas y rescatadas por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre del Perú (periodo enero 2020 – diciembre 2022).

Orden	Familia	Especie	Número de especimenes (%)	
			n	%
Accipitriformes	Accipitridae	*Parabuteo unicinctus*	47	35.9
Cathartiformes	Cathartidae	*Coragyps atratus*	34	26.0
Charadriiformes	Burhinidae	*Burhinus superciliaris*	1	0.8
Charadriiformes	Laridae	*Larus* sp.	7	5.3
Charadriiformes	Rynchopidae	*Rynchops niger*	1	0.8
Falconiformes	Falconidae	*Falco peregrinus*	1	0.8
Pelecaniformes	Pelecanidae	*Pelecanus thagus*	12	9.2
Pelecaniformes	Ardeidae	*Ardea* sp.	1	0.8
Procellariiformes	Hydrobatidae	*Oceanodroma* sp.	1	0.8
Psittaciformes	Psittacidae	*Psittacara erythrogenys*	12	9.2
Sphenisciformes	Spheniscidae	*Spheniscus humboldti*	6	4.6
Suliformes	Phalacrocoracidae	*Phalacrocorax bougainvillii*	1	0.8
Suliformes	Sulidae	*Sula variegata*	7	5.3
		Total	**131**	**100**

Se procesaron un total de 262 muestras, correspondientes a 131 hisopados cloacales y 131 hisopados orofaríngeos, la amplificación de la región ORF1ab permitió identificar aves positivas al pancoronavirus. Se obtuvieron amplicones de tamaño adecuado en muestras de hisopados cloacales (n = 3) y orofaríngeos (n = 3), correspondientes a seis

aves de los órdenes Accipitriformes, Pelecaniformes y Suliformes (Cuadro13). La caracterización molecular de las secuencias amplificadas de estas seis muestras positivas por PCR permitió identificar tres cepas de coronavirus pertenecientes a los géneros, *Deltacoronavirus* (n = 1), *Gammacoronavirus* (n = 2) y *Alphacoronavirus* (n = 3).

Cuadro 13. Frecuencia de detección de pancoronavirus en aves

Orden	Familia	Especie	N° Total	N° Positivos	% de Positivos
Accipitriformes	Accipitridae	*Parabuteo unicinctus*	47	2	4.3
Pelecaniformes	Pelecanidae	*Pelecanus thagus*	12	2	16.7
Suliformes	Sulidae	*Sula variegata*	7	2	28.6

Una muestra orofaríngea de un gavilán acanelado (*Parabuteo unicinctus*, orden Accipitriformes) resultó positiva para un virus del género *Deltacoronavirus*, con número de acceso en GenBank PQ212702. Este virus mostró una similitud de hasta el 99.03 % con el coronavirus del halcón Peregrino (referencia de secuencia en GenBank: LC364342).

Por otro lado, se identificaron dos secuencias obtenidas de hisopados cloacales de pelícanos peruanos (*Pelecanus thagus*), con números de acceso en GenBank PQ212703 y PQ212704, que presentaron hasta un 97.5 % de similitud con el coronavirus del pato (subgénero *Igacovirus*, género *Gammacoronavirus*), según la referencia de secuencia en GenBank MT993597 (Cuadro 14, Figura 7).

En relación con el género *Alphacoronavirus*, se identificó un virus del subgénero *Pedacovirus* en aves de los órdenes Suliformes (n = 2) y Accipitriformes (n = 1). Estas correspondieron al piquero peruano (*Sula variegata*), con números de acceso en GenBank PP896864 y PP896866, y al gavilán acanelado (*Parabuteo unicinctus*), con número de acceso en GenBank PP896864, respectivamente. Al igual que los Coronavirus de mamíferos, las secuencias de *Pedacovirus* en aves silvestres mostraron 100% de identidad con secuencias del virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV, Pedacovirus) resgistradas en primates no humanos de Peru (números de acceso en el GenBank: PP896867-71). Además, las secuencias genéticas del virus mostraron una identidad de hasta el 99.1 % con el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), según la referencia de GenBank

MF807951. Es relevante destacar que las muestras positivas se obtuvieron de hisopados orofaríngeos en el piquero peruano y de hisopados cloacales en el gavilán acanelado.

Cuadro 14. Identificación molecular de coronavirus en aves silvestres incautadas y rescatadas por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre del Perú (periodo enero 2020 – diciembre 2022).

Orden	Familia	Especie	Fecha de Colecta	PCR positivo		Virus (%)**
				OF*	Cloacal	
Accipitriformes	Accipitridae	*Parabuteo unicinctus*	25/02/2022	-	+	Virus de la diarrea epidémica porcina (99.1%)[a]
Accipitriformes	Accipitridae	*Parabuteo unicinctus*	19/05/2021	+	-	Falcon coronavirus(99.03%)[b]
Pelecaniformes	Pelecanidae	*Pelecanus thagus*	03/01/2022	-	+	Duck coronavirus (97.5%)[c]
Pelecaniformes	Pelecanidae	*Pelecanus thagus*	23/02/2022	-	+	Duck coronavirus (97.5%)[c]
Suliformes	Sulidae	*Sula variegata*	21/04/2021	+	-	Virus de la diarrea epidémica porcina (99.1%) [a]
Suliformes	Sulidae	*Sula variegata*	18/06/2021	+	-	Virus de la diarrea epidémica porcina (99.1%) [a]

* OF = orofaríngeo

** Virus identificado mediante la alineación de secuencias y porcentaje de identidad entre paréntesis (%)

[a] *Alphacoronavirus* , [b] *Deltacoronavirus*, y [c] *Gammacoronavirus*.

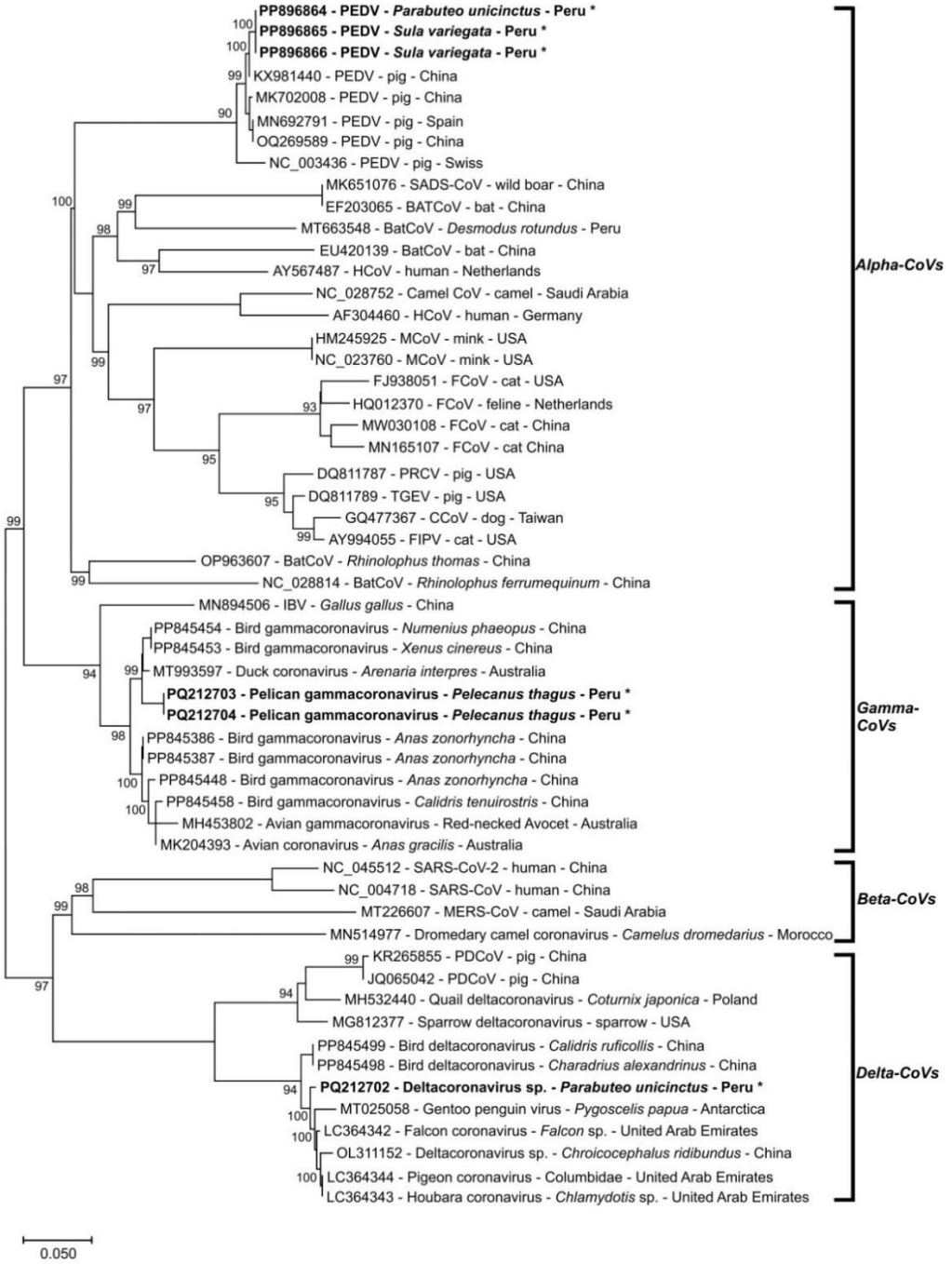

Figura 7. Árbol filogenético topográfico de los coronavirus (grupos *AlphaCoV*, *BetaCoV* y *GammaCoV*) utilizando 49 cepas de referencia y seis cepas identificadas en este estudio. El análisis filogenético se basa en una región parcial de 227 nt de la región ORF1ab. Las muestras de este estudio se indican en negrita y se denotan con un asterisco (*). Para cada virus, se indican el número de acceso de GenBank, la especie de virus, el hospedero y el país de origen. Se eliminaron todas las posiciones con una cobertura del sitio inferior al 95%, es decir, se permitieron menos del 5 % de espacios de alineación, datos faltantes y

bases ambiguas en cualquier posición (opción de eliminación parcial). La escala de distancia representa el número de sustituciones por sitio.

V. DISCUSIÓN

Los coronavirus son patógenos que afectan tanto a humanos como a una amplia variedad de animales, causando principalmente enfermedades respiratorias o entéricas (Masters, 2006). Debido a la alta plasticidad de su genoma y a los errores que ocurren durante la replicación, los coronavirus pueden modificar su rango de hospederos y su patogenicidad (Donnik *et al*., 2021). Este estudio identificó por primera *Alphacoronavirus* en mamíferos y aves silvestres de Sudamérica. Mediante el análisis de la región ORF1ab de Pancoronavirus, se identifico al subgénero de *Alphacoronavirus*: *Pedacovirus*, el cual mostraron una estrecha relación con las secuencias ORF1ab de las especies PEDV. Se detectó *Pedacovirus* en un prociónido (*Procyon cancrivorus*) y un pinnípedo (*Otaria flavescens*). Asimismo, los coronavirus detectados en las aves silvestres peruanas mostraron una estrecha relación con especies pertenecientes a los géneros *Deltacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Alphacoronavirus*.

En nuestros resultados, únicamente las muestras de hisopados orofaríngeos resultaron positivas para *Pedacovirus* en mamíferos silvestres. Este hallazgo constituye el primer reporte de *Pedacovirus* en prociónidos y pinnípedos. Hasta la fecha, el cerdo doméstico (*Sus scrofa domesticus*) es el único hospedero natural conocido del PEDV, la única especie descrita dentro del subgénero *Pedacovirus*. A pesar de ello, un estudio previo también identificó molecularmente a *Pedacovirus* en primates no humanos de Perú, y mostraron una identidad del 100% con las muestras del presente estudio (Sánchez-Chicana, 2023). Aunque existe un reporte de detección molecular de PEDV en el pulmón de una cebra de Burchell (*Equus burchellii*) (Zou *et al*., 2022), no se han registrado casos de infección por PEDV en humanos ni en otras especies domésticas (Pospischil *et al*., 2002). Sin embargo, investigaciones recientes han identificado PEDV en jabalíes en Corea del

Norte y Polonia, aunque con una baja prevalencia (Li *et al*., 2018; Antas *et al*., 2021). Por otro lado, en condiciones de laboratorio, se ha demostrado que múltiples líneas celulares derivadas de murciélagos, patos, humanos y primates no humanos permiten la propagación exitosa de PEDV (Gallagher y Perlman, 2013). Este virus puede infectar células de diversas especies utilizando receptores celulares que han perdurado evolutivamente, como la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), la dipeptidil peptidasa-IV y la aminopeptidasa N (APN). Esto sugiere que el virus posee la capacidad de adaptarse a un amplio rango de especies silvestres (Li *et al*., 2020; Song y Park, 2012). A pesar de ello, serán necesarios estudios adicionales para comprender de manera más detallada el papel patogénico del PEDV en los mamíferos silvestres afectados.

La principal vía de transmisión del PEDV es fecal-oral, propagándose mediante fómites contaminados, como alimentos y equipos de remolque. Una vez que el virus alcanza las células epiteliales intestinales, provoca disfunción intestinal (Jung y Saif, 2015). No obstante, en nuestro estudio, todas las muestras positivas correspondieron a hisopados orofaríngeos, mientras que los hisopados rectales resultaron negativos, lo que sugiere que este virus también podría estar asociado a afecciones respiratorias. Recientemente, se ha propuesto una vía alternativa de transmisión fecal-nasal. En este caso, el PEDV llegaría a la mucosa nasal a través de aerosoles, ocasionando una infección respiratoria transitoria. Las células dendríticas capturarían las partículas virales y las presentarían a las células T CD3+. Estas células, transportadas por la circulación sanguínea, migrarían al intestino, donde el virus infectaría las células epiteliales intestinales (Li *et al*., 2018; Lei *et al*., 2024).

Es altamente probable que la transmisión del PEDV esté relacionada con la cría de cerdos en las ciudades de la costa peruana, dado que Lima concentra la mayor parte de los productores porcinos del país (Sasaki *et al*., 2016). Este virus ha estado circulando en el Perú durante más de una década, y estudios previos reportaron que el 97.1% de las granjas porcinas en Lima dieron positivo para PEDV (Castro-Sanguinetti, 2017), evidenciando la rápida propagación en las granjas peruanas. Un caso análogo ocurrió durante la epidemia de influenza aviar H1N1, en la que las granjas porcinas desempeñaron un papel crucial en la transmisión del virus debido a las estrechas interacciones entre aves, cerdos y humanos (McCune *et al*., 2012).

Por otro lado, los vertidos de aguas residuales, que incluyen heces, desechos hospitalarios, sanitarios y otros contaminantes, pueden facilitar la entrada de virus en fuentes de agua como los mares, donde habitan animales como el lobo marino sudamericano (*Otaria flavescens*) (Nuñez *et al*., 2021). Estudios moleculares han confirmado la presencia del SARS-CoV-2 en aguas residuales (Bouseettine *et al*., 2019), lo que sugiere que este virus podría propagarse, ya que puede sobrevivir en superficies acuáticas durante varios días (Zamhuri *et al*., 2022). Hasta la fecha, solo unos pocos estudios han reportado la presencia de coronavirus en pinnípedos. Por ejemplo, el virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGE), el virus de la peritonitis infecciosa felina (PIF) y el coronavirus canino (CCoV) se han identificado en focas comunes (*Phoca vitulina*) mediante estudios microscópicos (Bossart y Schwartz, 1990; Van Bolhuis *et al*., 2007). Por lo tanto, este sería el primer reporte de PEDV en el lobo marino sudamericano.

En nuestro estudio, se detectó ARN del *Pedacovirus* muy semejante a PEDV en una muestra de hisopado orofaríngeo de un mapache cangrejero (*Procyon cancrivorus*). Investigaciones previas en mapaches han documentado la presencia de *Alphacoronavirus*. Por ejemplo, un análisis serológico realizado en Japón encontró que siete de 100 mapaches (*Procyon lotor*) resultaron positivos para el coronavirus canino (CCoV) (Aoki *et al*., 2017). Asimismo, un estudio en mapaches de América del Norte reportó la presencia de *Alphacoronavirus* en dos de los seis animales analizados, así como en un mapache moribundo. Sin embargo, no fue posible caracterizar genéticamente estos virus (Ip *et al*., 2021; Martin y Zeidner, 1992). Estos hallazgos sugieren que los mapaches pueden actuar como hospedero de *Alphacoronavirus*. No obstante, es fundamental profundizar en nuestra comprensión sobre su posible papel en la transmisión del PEDV.

Los resultados de este estudio han contribuido significativamente al conocimiento sobre la historia natural de los coronavirus aviares, al lograr su detección en diversas especies de aves silvestres. La prevalencia de coronavirus identificada fue del 4.6 % (6/131), lo que se encuentra dentro del rango reportado en investigaciones previas sobre aves silvestres (1.0 %–15.3 %) (Chu *et al*., 2011; Chamings *et al*., 2018; Hu *et al*., 2018; Paim *et al*., 2019; Domanska-Blicharz *et al*., 2021). No obstante, comparar estas estimaciones de prevalencia con estudios anteriores presenta ciertas limitaciones debido a la diversidad en los métodos de diagnóstico empleados, como PCR convencional y PCR multiplex, PCR en tiempo real, así como a diferencias en la distribución de especies y

variaciones estacionales. A pesar de estas restricciones, este estudio respalda investigaciones previas que destacan la importancia de las aves silvestres como reservorios potenciales de coronavirus (Chu *et al*., 2011; Domanska-Blicharz *et al*., 2021; Rahman *et al*., 2021; Wille y Holmes, 2020).

Diversos coronavirus, incluidos patógenos de relevancia económica, han sido documentados circulando entre aves silvestres (Rafique *et al*., 2024; Recht *et al.*, 2020). Entre ellos, el principal coronavirus aviar es el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), un *Gammacoronavirus* altamente contagioso que ocasiona pérdidas económicas significativas en la industria avícola a nivel mundial (Falchieri *et al*., 2024). La compleja evolución del IBV a lo largo del tiempo, junto con la aparición de numerosos tipos antigénicos o genotípicos, comúnmente denominados variantes, ha representado un desafío considerable para su control (Peng *et al*., 2022). Por esta razón, el monitoreo constante de coronavirus en aves migratorias resulta esencial para prevenir posibles brotes. Sin embargo, este estudio no detectó la presencia del IBV en ninguna de las aves analizadas, a pesar de los reportes previos sobre su presencia en aves domésticas en Lima (Icochea *et al*., 2023).

Las aves habitan una amplia variedad de ambientes y desempeñan múltiples funciones ecológicas en diversos ecosistemas (Leveau, 2018), lo que se ve potenciado por su capacidad de migrar largas distancias (Flack *et al*., 2022). Esta migración suele estar motivada por la búsqueda de recursos estacionales, la reproducción y la necesidad de evitar inviernos severos (Salewski y Bruderer, 2007). Sin embargo, su capacidad de dispersión también facilita la propagación de microorganismos que pueden afectar tanto a animales como a humanos (Nelson *et al*., 2016). Por ello, resulta fundamental implementar sistemas de alerta temprana y vigilancia para detectar virus potencialmente patógenos en aves silvestres.

Algunas especies de aves silvestres, como el gavilán acanelado (*Parabuteo unicinctus*) y el gallinazo (*Coragyps atratus*), han logrado adaptarse a paisajes urbanizados, lo que incrementa las posibilidades de interacción con los humanos (Takano y Castro, 2007). El potencial de transmisión de patógenos entre diferentes especies de aves, incluyendo aquellas silvestres y las que comparten espacios en cautiverio, podría originar brotes en aves de corral, especialmente en sistemas de cría extensiva. Esto podría ocasionar pérdidas económicas significativas en una extensa área geográfica.

Las aves silvestres, tanto acuáticas como terrestres, de diversos países son portadoras de múltiples especies de *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (Chu *et al*., 2011; Domanska-Blicharz *et al*., 2023; Jordan *et al*., 2015). Esta situación representa un riesgo significativo de transmisión viral hacia especies domésticas. Aunque numerosos estudios han detectado coronavirus en aves silvestres, ninguno de ellos se había llevado a cabo en Perú. Las aves silvestres pueden ocupar una variedad de nichos ecológicos, ya sean migratorias o residentes (Leveau, 2018). En nuestro estudio, identificamos una especie de coronavirus estrechamente relacionada con la cepa detectada en aves falconiformes (*Falco* sp.), específicamente *Falco coronavirus*, perteneciente al género *Deltacoronavirus,* subgénero *Buldecovirus*. Este virus fue identificado en el gavilán acanelado (*Parabuteo unicinctus*). La presencia documentada del halcón peregrino (*Falco peregrinus*) en Perú (Gomez-Puerta *et al*., 2014), considerado hospedero natural de este virus (Lau *et al*., 2018), podría explicar por qué el gavilán acanelado ha surgido como un nuevo hospedero para esta variante viral.

Investigaciones recientes han demostrado que el *Deltacoronavirus*, que afecta a halcones y palomas, puede saltar entre especies, posiblemente como resultado de interacciones depredador-presa dentro de la cadena alimentaria (Lau *et al*., 2018). Es probable que este fenómeno también ocurra con el *Deltacoronavirus* detectado en los gavilanes acanelados. Es importante destacar que el gavilán acanelado, el halcón peregrino y las palomas son aves con comportamientos y hábitats únicos (Takano and Castro, 2007). Mientras que el gavilán acanelado y el halcón peregrino son rapaces de tamaño mediano, las palomas (Columbiformes) son aves relativamente más pequeñas con una distribución global. Sin embargo, estas especies están ecológicamente interrelacionadas, ya que tanto el gavilán acanelado como el halcón peregrino son depredadores conocidos de palomas, de las cuales se alimentan (Bednarz, 1988). Por lo tanto, la transmisión del coronavirus detectado en el gavilán acanelado podría ser una consecuencia directa de estas interacciones depredador-presa. Para confirmar esta hipótesis, será necesario evaluar la presencia de coronavirus en aves rapaces y palomas en la ciudad de Lima. Por otro lado, dado que el gavilán acanelado pertenece al grupo de las aves rapaces, otra posibilidad es que el virus detectado sea propio de esta especie. En consecuencia, serán necesarios futuros estudios epidemiológicos moleculares para abordar ambas hipótesis.

Dos pelícanos peruanos (*Pelecanus thagus*) dieron positivo en el análisis molecular para un coronavirus estrechamente relacionado con el coronavirus del pato (Gammacoronavirus, *Igacovirus*). Este virus ha sido detectado en patos domésticos y salvajes en diversas regiones del mundo, incluidas China (Chen *et al*., 2013) y Polonia (Domanska-Blicharz *et al*., 2021). Además, el coronavirus del pato también se ha identificado en otras especies de aves, principalmente acuáticas y migratorias. Por ejemplo, Jordan *et al*. lo detectaron en el vuelvepiedras rojizo (*Arenaria interpres*) en el este de los Estados Unidos (Jordan *et al*., 2015). Asimismo, este virus ha sido hallado en aves de la familia *Laridae*, como la gaviota reidora (*Chroicocephalus ridibundus*) y la gaviota común o gaviota marina (*Larus canus*), en Polonia (Domanska-Blicharz *et al*., 2023). El pelícano peruano comparte hábitats con gaviotas y patos silvestres, lo que sugiere una posible transmisión del virus entre estas especies.

Respecto al género *Alphacoronavirus*, se identificó un virus perteneciente al subgénero *Pedacovirus* en el piquero peruano (*Sula variegata*) (GenBank No. PP896864 y PP896866) y el gavilán acanelado (*Parabuteo unicinctus*) (GenBank No. PP896864). Las secuencias del material genético del virus mostraron hasta un 100% de identidad con el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV). Como bien se sabe, los *Alphacoronavirus* son virus exclusivos de mamíferos y no infectan aves (Donnik *et al*., 2021). El hallazgo de PEDV en las aves podría estar relacionado con la contaminación de las playas por actividades asociadas a criaderos de cerdos ubicados en las cercanías (McCune *et al*., 2012). Los criaderos de cerdos representan una fuente potencial de excreción viral, dado que el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) puede ser eliminado en heces y contaminar el ambiente circundante. La proximidad de las playas a estas instalaciones (McCune *et al*., 2012; Tinoco *et al*., 2016) incrementa la probabilidad de que materiales contaminados lleguen al hábitat de las aves marinas mediante la escorrentía o el transporte por vectores mecánicos. Además, la interacción directa o indirecta entre aves silvestres y cerdos, como el aprovechamiento de recursos alimenticios en áreas comunes, podría facilitar la transmisión viral inter-especies, constituyendo un escenario plausible para la deteccion de *Alphacoronavirus* en las aves estudiadas.

Una de las principales limitaciones de nuestro estudio es la falta de información sobre el origen de los animales silvestres, que con frecuencia son víctimas del tráfico ilegal. Conocer el origen de estos animales resulta fundamental para evaluar

adecuadamente la dinámica de transmisión de los virus detectados. Además, el número limitado de especies incluidas en el análisis, como *Potos flavus*, *Lycalopex sechurae*, *Ardea* sp., y *Oceanodroma* sp., representa otra restricción. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que estas especies puedan actuar como reservorios del virus.

El segmento genómico del coronavirus analizado en este estudio corresponde a una de las regiones más conservadas del gen que codifica la polimerasa viral (Moes *et al*., 2005; Wilkinson *et al*., 2020). Esta área genómica es frecuentemente secuenciada, y numerosos estudios emplean PCR dirigida a esta región para identificar coronavirus en animales silvestres (Alves *et al*., 2022; Han *et al*., 2023; Hu *et al*., 2018; Italiya *et al*., 2023; Nga *et al*., 2022; Shan *et al*., 2022; Vijgen *et al*., 2008). Sin embargo, dado que el segmento examinado representa aproximadamente el 1% del genoma completo del coronavirus, cualquier inferencia sobre las relaciones filogenéticas debe interpretarse con precaución. El análisis filogenético realizado en este estudio mostró cierta agrupación de los virus identificados según su subgénero y especie, un patrón que también ha sido reportado en investigaciones previas (Chu *et al*., 2011; Han *et al*., 2023).

Los resultados subrayan la importancia de profundizar en las investigaciones sobre los diversos mecanismos de transmisión de los virus detectados, en particular la vía fecal-nasal, para entender mejor su relevancia en la propagación viral y su impacto en el desarrollo de enfermedades respiratorias. Asimismo, se recomienda la implementación de programas de vigilancia epidemiológica en granjas, especialmente en aquellas ubicadas en áreas donde humanos, cerdos y otras especies animales interactúan estrechamente. Esto es especialmente relevante debido a la alta prevalencia del PEDV en las granjas porcinas y al potencial de transmisión interespecies.

Actualmente los reportes sobre detección o caracterización molecular del PEDV en el Peru son limitados (Castro, 2016, Sánchez-Chicana, 2023), lo cual resulta fundamental para evaluar posibles similitudes entre las variantes que afectan a cerdos y gatos. Asimismo, es imprescindible investigar las rutas y mecanismos relacionados con el tráfico ilegal de fauna silvestre para comprender mejor cómo se propagan estos virus entre distintas especies y regiones geográficas. La implementación de medidas de control y prevención es esencial para disminuir el riesgo de transmisión de enfermedades zoonóticas.

Nuestro estudio confirmó molecularmente la presencia de coronavirus en pinnípedos, mapaches, aves marinas y aves rapaces. Es fundamental implementar medidas preventivas para salvaguardar la salud de estas especies, dado que los coronavirus poseen una elevada capacidad de recombinación y mutación, lo que puede conducir al surgimiento de enfermedades infecciosas emergentes con potencial zoonótico. Además, recomendamos intensificar los análisis en estas especies, especialmente en aquellas como las ardillas y los mapaches, que están expandiéndose y convirtiéndose en especies invasoras. También sería pertinente llevar a cabo vigilancia epidemiológica de las especies decomisadas en otras regiones del Perú, así como de aquellas que permanecen en cautiverio en zoológicos.

VI. CONCLUSIONES

- Se detectó Coronavirus en 4 mamiferos del orden Carnívora correspondientes a las especies *Procyon cancrivorus y Otaria flavescens.*
- Los coronavirus de los mamiferos silvestres presentaron 99.1 % de similitud con el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV).
- Se detectó Pancoronavirus en 6 aves silvestres del orden Accipitriformes, Pelecaniformes y Suliformes correspondientes a las especies *Parabuteo unicinctus*, *Pelecanus thagus* y *Sula variegata.*
- Los agentes virales identificados en aves presentaron similitudes de 99.03 % con el coronavirus del halcón peregrino, 97.5 % con el coronavirus del pato y un 99.1% con el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV).

LITERATURA CITADA

1. ***Abdel-Moneim AS, Abdelwhab EM. 2020.*** Evidence for SARS-CoV-2 Infection of Animal Hosts. Pathogens 9(7):529. doi: 10.3390/pathogens9070529.

2. ***Adney D, Lovaglio J, Schulz J, Yinda C, Avanzato V, Haddock E , Port J, Holbrook M, Patrick W. Hanley, Saturday G, Scott D, Spengler J, Tansey C, Cossaboom C, Wendling N, Martens C, Easley J, Yap S, Seifert S, Munster V. 2022.*** Severe acute respiratory disease in American mink (Neovison vison) experimentally infected with SARS-CoV-2. bioRxiv 477164. doi: https://doi.org/10.1101/2022.01.20.477164. Disponible en: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.01.20. 477164v1

3. ***Ahn M, Anderson DE, Zhang Q, Tan CW, Lim BL, Luko K, Wen M, Chia W, Mani S, Wang LC, Ng JHJ, Sobota RM, Dutertre CH, Ginhoux F, Shi ZL, Irving A, Wang LF. 2019.*** Dampened NLRP3-mediated inflammation in bats and implications for a special viral reservoir host. Nat Microbiol 4:789–799. https://doi.org/10.1038/s41564-019-0371-3

4. ***Alves RS, do Canto Olegário J, Weber MN, da Silva MS, Canova R, Sauthier JT, Baumbach LF, Witt AA, Varela APM, Mayer FQ, da Fontoura Budaszewski R, Canal CW. 2022.*** Detection of coronavirus in vampire bats (Desmodus rotundus) in southern Brazil. Transbound Emerg Dis 69(4):2384-2389. doi: 10.1111/tbed.14150.

5. ***Amer HM. 2018***. Bovine-like coronaviruses in domestic and wild ruminants. Anim Health Res Rev 19(2):113-124. doi: 10.1017/S1466252318000117. PMID: 30683171; PMCID: PMC7108644.

6. ***Angelini M, Akhlaghpour M, Neuman B, Buchmeier M. 2013.*** Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. MBio 4(4): e00524-13. doi:10.1128/mBio.00524-13.

7. ***Annan A, Baldwin HJ, Corman VM, Klose SM, Owusu M, Nkrumah EE, Badu EK, Anti P, Agbenyega O, Meyer B, Oppong S, Sarkodie YA, Kalko EK, Lina PH, Godlevska EV, Reusken C, Seebens A, Gloza-Rausch F, Vallo P, Tschapka M, Drosten C, Drexler JF. 2013.*** Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. Emerg Infect Dis 19:456–459.

8. ***Antas M, Olech M, Szczotka-Bochniarz A. 2021***.Porcine Enteric Coronavirus Infections in Wild Boar in Poland - a Pilot Study. J Vet Res 65(3):265-269. doi: 10.2478/jvetres-2021-0041.

9. ***Aoki E, Soma T, Yokoyama M, Matsubayashi M, Sasai K.. 2017.*** Surveillance for antibodies against six canine viruses in wild raccoons (Procyon Lotor) in Japan. Journal of Wildlife Diseases 53: 761–768 https://doi.org/10.7589/2016-11-253.

10. ***Anthony S, Johnson CK, Greig DJ, Kramer S, Che X, Wells H, Hicks A, Joly D, Wolfe N, Daszak P, Karesh W, Lipkin W, Morse S, PREDICT Consortium, Mazet J, Goldstein T, 2017.*** Global patterns in coronavirus diversity. Virus Evol 3:1-15

11. ***Ar Gouilh M, Puechmaille SJ, Diancourt L, Vandenbogaert M, Serra-Cobo J, Lopez Roïg M, Brown P, Moutou F, Caro V, Vabret A, Manuguerra JC, EPICOREM consortium. 2018.*** SARS-CoV related Betacoronavirus and diverse Alphacoronavirus members found in western old-world. Virology 517:88-97. doi: 10.1016/j.virol.2018.01.014. Epub 2018 Feb 23. PMID: 29482919; PMCID: PMC7112086.

12. ***Athmer J, Fehr A, Grunewald M, Smith E, Denison M, Perlman S. 2017.*** In Situ Tagged nsp15 Reveals Interactions with Coronavirus Replication/Transcription Complex-Associated Proteins. mBio 8(1):e02320-16. doi:10.1128/mBio.02320-16.

13. ***Azhar EI, El-Kafrawy SA, Farraj SA, Hassan AM, Al-Saeed MS, Hashem AM, Madani TA. 2014.*** Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. N Engl J Med 370(26):2499-505. doi: 10.1056/NEJMoa1401505. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24896817.

14. ***Báez-Santos Y, St John S, Mesecar A. 2015.*** The SARS-coronavirus papain-like protease: Structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. Antiviral Res 115:21-38. doi:10.1016/j.antiviral.2014.12.015

15. ***Barrera M, Rodriguez, Betancourt A. 2006.*** Short communication. First report in Cuba of bovine coronavirus detection in a winter dysentery outbreak. Spanish J Agr Res 4(3):221–224.

16. ***Bao L, Deng W, Huang B, Gao H, Liu J, Ren L, Wei Q, Yu P, Xu Y, Qi F, Qu Y, Li F, Lv Q, Wang W, Xue J, Gong S, Liu M, Wang G, Wang S, Song Z, Zhao L, Liu P, Zhao L, Ye F, Wang H, Zhou W, Zhu N, Zhen W, Yu H, Zhang X, Guo L, Chen L, Wang C, Wang Y, Wang X, Xiao Y, Sun Q, Liu H, Zhu F, Ma C, Yan L, Yang M, Han J, Xu W, Tan W, Peng X, Jin Q, Wu G, Qin C. 2020***. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. Nature 583(7818):830-833. doi: 10.1038/s41586-020-2312-y. Epub 2020 May 7. PMID: 32380511.

17. ***Bednarz JC. 1998.*** Cooperative Hunting Harris' Hawks (Parabuteo unicinctus). Science 239(4847):1525-7.doi: 10.1126/science.239.4847.1525.

18. ***Bidokhti MRM, Tråvén M, Krishna NK, Munir M, Belák S, Alenius S, Cortey M. 2013.*** Evolutionary dynamics of bovine coronaviruses: natural selection pattern of the spike gene implies adaptive evolution of the strains. J Gen Virol 94(Pt 9):2036-2049. doi: 10.1099/vir.0.054940-0.

19. ***Boileau MJ, Kapil S. 2010.*** Bovine coronavirus associated syndromes. Vet Clin North Am Food Anim Pract 26(1):123-46, table of contents. doi: 10.1016/j.cvfa.2009.10.003. PMID: 20117547; PMCID: PMC7125561.

20. ***Bok M, Miño S, Rodriguez D, Badaracco A, Nuñes I, Souza SP, Bilbao G, Louge Uriarte E, Galarza R, Vega C, Odeon A, Saif LJ, Parreño V. 2015.*** Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during

1994-2010. Vet Microbiol. 2015 Dec 31;181(3-4):221-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.10.017.

21. ***Bossart G, Schwartz J. 1990***. Acute Necrotizing Enteritis Associated with Suspected Coronavirus Infection in Three Harbor Seals (Phoca vitulina). Journal of Zoo and Wildlife Medicine 21(1): 84–87. http://www.jstor.org/stable/20095024

22. ***Boudewijns R, Thibaut H, Kaptein S,Li R, Vergote V, Seldeslachts L, De Keyzer C, Bervoets L, Sharma S, Weyenbergh J, Liesenborghs L, Ma J, Jansen S, Van Looveren D, Vercruysse T, Jochmans D, Wang X, Martens E, Roose K, De Vlieger D, Schepens B, Van Buyten T, Jacobs S, Liu Y, Martí-Carreras J, Vanmechelen B, Wawina-Bokalanga T, Delang L, Rocha-Pereira J, Coelmont L, Chiu W, Leyssen P, Heylen E, Schols D, Wang L, Close L, Matthijnssens J, Van Ranst M, Compernolle V, Schramm G, Van Laere K, Saelens X, Callewaert N, Opdenakker G, Maes P, Weynand B, Cawthorne C, Velde GV, Wang Z, Neyts J, Dallmeier K. 2020***. STAT2 signaling as double-edged sword restricting viral dissemination but driving severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters. Nat Commun 11(1):5838. doi: 10.1038/s41467-020-19684-y. PMID: 33203860; PMCID: PMC7672082.

23. ***Bouseettine R, Hassou N, Bessi H, Ennaji MM. 2019.*** Waterborne Transmission of Enteric Viruses and Their Impact on Public Health. En Mouallif M, eds. Emerging and Reemerging Viral Pathogens: Fundamental and Basic Virology Aspects of Human, Animal and Plant Pathogens London, UK. Elsevier Inc. ISBN 9780128194003.

24. ***Bouvet M, Lugari A, Posthuma CC, Zevenhoven J, Bernard S, Betzi S, Imbert I, Canard B, Guillemot J, Lécine P, Pfefferle S, Drosten C, Snijder E, Decroly E, Morelli X . 2014.*** Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes. J Biol Chem 289(37):25783-25796. doi:10.1074/jbc.M114.577353

25. ***Benvenuto D, Angeletti S, Giovanetti M, Bianchi M, Pascarella S,Cauda R, Ciccozzi M, Cassone A. 2020.*** Evolutionary analysis of SARS-CoV-2: how mutation of Non-Structural Protein 6 (NSP6) could affect viral autophagy. J Infect 81(1): e24-e27. doi:10.1016/j.jinf.2020.03.058

26. ***Burimuah V, Sylverken A, Owusu M, El-Duah P, Yeboah R, Lamptey J, Frimpong YO, Agbenyega O, Folitse R, Tasiame W, Emikpe B, Owiredu EW, Oppong S, Adu-Sarkodie Y, Drosten C. 2020***. Sero-prevalence, cross-species infection and serological determinants of prevalence of Bovine Coronavirus in Cattle, Sheep and Goats in Ghana. Vet Microbiol 241:108544. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.108544.

27. ***Castells M, Giannitti F, Caffarena RD, Casaux ML, Schild C, Castells D, Riet-Correa F, Victoria M, Parreño V, Colina R. 2019.*** Bovine coronavirus in Uruguay: genetic diversity, risk factors and transboundary introductions from neighboring countries. Arch Virol 164(11):2715-2724. doi: 10.1007/s00705-019-04384-w.

28. ***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 11(5):1455. doi: 10.3390/ani11051455.

29. ***Castro G. 2016.*** Caracterización molecular y filogenética de cepas emergentes del virus de la diarrea epidémica porcina detectadas en el Perú. Tesis de Magister en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 46 p.

30. ***Castro-Sanguinetti G, Ramírez Me, More J, Manchego A, Rivera H. 2017***. Aislamiento y detección molecular de cepas emergentes del virus de la diarrea epidémica porcina en Lima, Perú. Rev investig Vet 28(4): 1010-1019. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172017000400027&lng=es.

31. ***Chamings A, Nelson T, Vibin J, Wille M, Klaassen M, Alexandersen S. 2018.*** Detection and characterisation of coronaviruses in migratory and non-migratory Australian wild birds. Sci. Rep 8:5980. doi: 10.1038/s41598-018-24407-x

32. ***Chan JF, Chan KH, Choi GK, To KK, Tse H, Cai JP, Yeung ML, Cheng VC, Chen H, Che XY, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. 2013.*** Differential Cell Line Susceptibility to the Emerging Novel Human Betacoronavirus 2c EMC/2012: Implications for Disease Pathogenesis and Clinical Manifestation. J Infect Dis 207(11):1743–1752. https://doi.org/10.1093/infdis/jit123.

33. ***Chan JF, Lau SK, To KK, Cheng VC, Woo PC, Yuen KY. 2015.*** Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. Clin Microbiol Rev 28(2):465-522. doi: 10.1128/CMR.00102-14.

34. ***Chang C, Sue S, Yu T, Hsieh C, Tsai C, Chiang Y, Lee S, Hsiao H, Wu W, Chang W, Lin C, Huang T. 2006.*** Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. J Biomed Sci 13:59–72. https://doi.org/10.1007/s11373-005-9035-9

35. ***Chang C, Hou M, Chang C, Hsiao C, Huang T. 2014.*** The SARS coronavirus nucleocapsid protein - Forms and functions. Antiviral Res 103 (1): 39-50. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.12.009

36. ***Chen Y, Su C, Ke M, Jin X, Xu L, Zhang Z, Wu A, Sun Y, Yang Z, Tien P, Ahola T, Liang Y, Liu X, Guo D. 2011.*** Biochemical and structural insights into the mechanisms of SARS coronavirus RNA ribose 2'-O-methylation by nsp16/nsp10 protein complex. PLoS Pathog 7(10): e1002294. doi:10.1371/journal.ppat.1002294

37. ***Chen GQ, Zhuang QY, Wang KC, Liu S, Shao JZ, Jiang WM, Hou GY, Li JP, Yu JM, Li YP, Chen JM. 2013.*** Identification and survey of a novel avian coronavirus in ducks. PLoS One 8(8):e72918. doi: 10.1371/journal.pone.0072918. PMID: 24023656; PMCID: PMC3758261.

38. ***Chu DK, Leung CY, Gilbert M, Joyner PH, Ng EM, Tse TM, Guan Y, Peiris JS, Poon LL. 2011***. Avian coronavirus in wild aquatic birds. J Virol 85(23):12815-20. doi: 10.1128/JVI.05838-11

39. ***Chu H, Chan JF, Yuen TT, Shuai H, Yuan S, Wang Y, Hu B, Yip CC, Tsang JO, Huang X, Chai Y, Yang D, Hou Y, Chik KK, Zhang X, Fung AY, Tsoi HW, Cai JP, Chan WM, Ip JD, Chu AW, Zhou J, Lung DC, Kok KH, To KK, Tsang OT, Chan KH, Yuen KY. 2020.*** Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. Lancet Microbe 1(1):e14-e23. doi: 10.1016/S2666-5247(20)30004-5.

40. ***Collares E, Schwemmle M. 2020.*** Bats and Viruses: Current Research and Future Trends. UK. Caister Academic Pres.230p.

41. ***Cornillez C, Liao L, Yates P, Buchmeier M. 2009.*** Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling. J Virol 83(19):10314-10318. doi:10.1128/JVI.00842-09

42. ***Cui J, Li F, Shi Z. 2019.*** Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nat Rev Microbiol 17(3):181-192. doi:10.1038/s41579-018-0118-9

43. ***Cunha M, Inácio J. 2015.*** Veterinary Infection Biology: Molecular Diagnostics and High-Throughput Strategies. USA: Human Press.557p

44. ***Daut EF, Lahodny G Jr, Peterson MJ, 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(1):e0147517. doi: 10.1371/journal.pone.0147517.

45. ***Damas J, Hughes GM, Keough KC, Painter CA, Persky NS, Corbo M, Hiller M, Koepfli KP, Pfenning AR, Zhao H, Genereux DP, Swofford R, Pollard KS, Ryder OA, Nweeia MT, Lindblad-Toh K, Teeling EC, Karlsson EK, Lewin HA. 2020.*** Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates. Proc Natl Acad Sci 117(36):22311-22322. doi: 10.1073/pnas.2010146117.

46. ***Decaro N, Buonavoglia C. 2008***. An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. Vet Microbiol 132(3-4):221-34. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.06.007

47. ***Decaro N, Campolo M, Desario C, Cirone F, D'Abramo M, Lorusso E, Greco G, Mari V, Colaianni ML, Elia G, Martella V, Buonavoglia C. 2008.*** Respiratory disease associated with bovine coronavirus infection in cattle herds in Southern Italy. J Vet Diagn Invest 20(1):28-32. doi: 10.1177/104063870802000105. PMID: 18182504.

48. ***Decaro N, Lorusso A. 2020.*** Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. Vet Microbiol 244:108693. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108693.

49. ***Decaro N, Mari V, Desario C, Campolo M, Elia G, Martella V, Greco G, Cirone F, Colaianni ML, Cordioli P, Buonavoglia C. 2008.*** Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season. Vet Microbiol 126(1-3):30-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.06.024. Epub 2007 Jun 28. PMID: 17669602; PMCID: PMC7117129.

50. ***Deepak, Aly SS, Love WJ, Blanchard PC, Crossley B, Van Eenennaam AL, Lehenbauer TW. 2021.*** Etiology and risk factors for bovine respiratory disease in pre-weaned calves on California dairies and calf ranches. Prev Vet Med 197:105506. doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105506.

51. ***Deng X, Hackbart M, Mettelman R, O'Brien A, Mielech A, Yi G, Kao C, Baker S. 2017.*** Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 114(21):E4251-E4260. doi:10.1073/pnas.1618310114

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

53. ***Domańska-Blicharz K, Miłek-Krupa J, Pikuła A. 2021***. Diversity of Coronaviruses in Wild Representatives of the Aves Class in Poland. Viruses 13:1497. doi: 10.3390/v13081497.

54. ***Domanska-Blicharz K, Milek-Krupa J, Pikula A. 2023.*** Gulls as a host for both gamma and deltacoronaviruses. Scientific reports 13(1):15104 doi:10.1038/s41598-023-42241-8

55. ***Dong B, Lu H, Zhao K, Liu W, Gao W, Lan Y, Zhao J, Tang B, Song D, He W, Gao F. 2014.*** Identification and genetic characterization of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus from domestic piglets in China. Arch Virol 159(9):2329-37. doi: 10.1007/s00705-014-2070-y. Epub 2014 Apr 23. PMID: 24756345; PMCID: PMC7087033.

56. ***Donnik IM, Popov IV, Sereda SV, Popov IV, Chikindas ML, Ermakov AM. 2021.*** Coronavirus Infections of Animals: Future Risks to Humans. Biol Bull Russ Acad Sci 48(1):26-37. doi: 10.1134/S1062359021010052.

57. ***Dowlatshahi S, Shabani E, Abdekhodaie MJ. 2021.*** Serological assays and host antibody detection in coronavirus-related disease diagnosis. Arch Virol 166(3):715-731. doi: 10.1007/s00705-020-04874-2. Epub 2021 Jan 25. PMID: 33492524; PMCID: PMC7830048.

58. ***De Souza Luna LK, Heiser V, Regamey N, Panning M, Drexler JF, Mulangu S, Poon L, Baumgarte S, Haijema BJ, Kaiser L, Drosten C. 2007***. Generic detection of coronaviruses and differentiation at the prototype strain level by reverse transcription-PCR and nonfluorescent low-density microarray. J Clin Microbiol 45(3):1049-52. doi: 10.1128/JCM.02426-06.

59. ***De Wit E, Van Doremalen N, Falzarano D, Munster V. 2016.*** SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. Nat Rev Microbiol 14:523–534. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81.

60. ***Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguière AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Müller S, Rickerts V, Stürmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. 2003.*** Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med 348(20):1967-76. doi: 10.1056/NEJMoa030747.

61. ***Erles K, Brownlie J. 2008***. Canine respiratory coronavirus: an emerging pathogen in the canine infectious respiratory disease complex. Vet Clin North Am Small Anim Pract 38(4):815-25. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.02.008.

62. ***Falchieri M, Coward VJ, Reid SM, Lewis T, Banyard AC. 2024.*** Infectious bronchitis virus: an overview of the "chicken coronavirus". J Med Microbiol 73(5):001828. doi: 10.1099/jmm.0.001828.

63. ***Fields B, Peter M, Howley MD, Griffin R,Lamb, Malcom A, Martin MD, Roizman B, Straus MD, David M, Knipe. 2001***.Fields Virology. 4 ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins Publishers. 2501p

64. ***Flack A, Aikens EO, Kölzsch A, Nourani E, Snell KRS, Fiedler W, Linek N, Bauer HG, Thorup K, Partecke J, Wikelski M, Williams HJ. 2022***. New frontiers in bird migration research. Curr Biol 32(20): R1187-R1199. doi: 10.1016/j.cub.2022.08.028. PMID: 36283388.

65. ***Flint J, Racaniello V, Rall G, Skalka A, Enquist L. 2015***. Principles of Virology. 4ª ed. USA: ASM PRESS. 1060 p.

66. ***Fritz M, Rosolen B, Krafft E, Becquart P, Elguero E, Vratskikh O, Denolly S, Boson B, Vanhomwegen J, Gouilh MA, Kodjo A, Chirouze C, Rosolen SG, Legros V, Leroy EM. 2021.*** High prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in pets from COVID-19+ households. One Health 11:100192. doi: 10.1016/j.onehlt.2020.100192

67. ***Gadlage M, Sparks J, Beachboard D, Cox R, Doyle J, Stobart C, Denison M. 2010.*** Murine hepatitis virus nonstructural protein 4 regulates virus-induced membrane modifications and replication complex function. J Virol 84(1):280-290. doi:10.1128/JVI.01772-09.

68. ***Gallagher T, Perlman S. 2013.*** Public health: Broad reception for coronavirus. Nature 495(7440):176-7. doi: 10.1038/495176a.

69. ***Ge XY, Li JL, Yang XL, Chmura AA, Zhu G, Epstein JH, Mazet JK, Hu B, Zhang W, Peng C, Zhang YJ, Luo CM, Tan B, Wang N, Zhu Y, Crameri G, Zhang SY, Wang LF, Daszak P, Shi ZL. 2013.*** Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. Nature 503:535–538.

70. ***Gouilh MA, Puechmaille SJ, Gonzalez JP, Teeling E, Kittayapong P, Manuguerra JC. 2011.*** SARS-Coronavirus ancestor's foot-prints in South-East Asian bat colonies and the refuge theory. Infect Genet Evol 11(7): 1690-1702. doi: 10.1016/j.meegid.2011.06.021

71. ***Gomez-Puerta LA, Ospina PA, Ramirez MG, Cribillero NG. 2014.*** Primer registro de Serratospiculum tendo (Nematoda: Diplotriaenidae) para el Perú. Rev Per de Biol 21(1):111-114 doi:http://doi.org/10.15381/rpb.v21i1.8256

72. ***Gomez DE, Arroyo LG, Poljak Z, Viel L, Weese JS. 2017.*** Detection of Bovine Coronavirus in Healthy and Diarrheic Dairy Calves. J Vet Intern Med 31(6):1884-1891. doi: 10.1111/jvim.14811. Epub 2017 Sep 15. PMID: 28913936; PMCID: PMC5697193.

73. ***Gong SR, Bao LL. 2018.*** The battle against SARS and MERS coronaviruses: Reservoirs and Animal Models. Animal Model Exp Med 1(2):125-133. doi: 10.1002/ame2.12017.

74. ***Gretebeck LM, Subbarao K. 2015***. Animal models for SARS and MERS coronaviruses. Curr Opin Virol 13:123-129. doi:10.1016/j.coviro.2015.06.009

75. ***Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, Luo SW, Li PH, Zhang LJ, Guan YJ, Butt KM, Wong KL, Chan KW, Lim W, Shortridge KF, Yuen KY, Peiris JS, Poon LL. 2003***. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. Science 302(5643):276-8. doi: 10.1126/science.1087139.

76. ***Gulliksen SM, Jor E, Lie KI, Løken T, Akerstedt J, Østerås O. 2009.*** Respiratory infections in Norwegian dairy calves. J Dairy Sci 92(10):5139-46. doi: 10.3168/jds.2009-2224. PMID: 19762832; PMCID: PMC7126448.

77. ***Haagmans BL, van den Brand JM, Provacia LB, Raj VS, Stittelaar KJ, Getu S, de Waal L, Bestebroer TM, van Amerongen G, Verjans GM, Fouchier RA, Smits SL, Kuiken T, Osterhaus AD. 2015.*** Asymptomatic Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in rabbits. J Virol 89(11):6131-5. doi: 10.1128/JVI.00661-15.

78. ***Han Y, Xu P, Wang Y, Zhao W, Zhang J, Zhang S, Wang J, Jin Q, Wu Z. 2023.*** Panoramic analysis of coronaviruses carried by representative bat species in Southern China to better understand the coronavirus sphere. Nat Commun 14(1):5537. doi: 10.1038/s41467-023-41264-z. PMID: 37684236; PMCID: PMC10491624.

79. ***Hartmann K. 2005.*** Feline infectious peritonitis. Vet Clin North Am Small. Anim Prac 35(1):39-79. doi: 10.1016/j.cvsm.2004.10.011.

80. ***Hasoksuz M, Kayar A, Dodurka T, Ilgaz A. 2005.*** Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in Northwestern Turkey. Acta Vet Hung 53(1):137-46. doi: 10.1556/AVet.53.2005.1.13.

81. ***Hobbs EC, Reid TJ. 2021.*** Animals and SARS-CoV-2: Species susceptibility and viral transmission in experimental and natural conditions, and the potential implications for community transmission. Transbound Emerg Dis 68(4):1850-1867. doi: 10.1111/tbed.13885.

82. ***Hodnik JJ, Ježek J, Starič J. 2020.*** Coronaviruses in cattle. Trop Anim Health Prod 52(6):2809-2816. doi: 10.1007/s11250-020-02354-y.

83. ***Hu H, Jung K, Wang Q, Saif LJ, Vlasova AN. 2018***. Development of a one-step RT-PCR assay for detection of pancoronaviruses (α-, β-, γ-, and δ-coronaviruses) using newly designed degenerate primers for porcine and avian `fecal samples. J Virol Methods 256:116-122. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.02.021..

84. ***Hulswit R, de Haan C, Bosch B. 2016.*** Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. Adv Virus Res 96:29-57. doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.004.

85. ***Icochea E, González R, Castro-Sanguinetti G, Maturrano L, Alzamora L, Sesti L, Chacón J, More-Bayona J. 2023.*** Genetic Analysis of Infectious Bronchitis Virus S1 Gene Reveals Novel Amino Acid Changes in the GI-16 Lineage in Peru. Microorganisms 11(3):691. doi: 10.3390/microorganisms11030691.

86. ***ICTV. 2022***. Coronavirus Taxonomy Information. USA: International Committee on Taxonomy of Viruses [Internet]. [02 mayo 2022]. Disponible en: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/

87. ***Ip HS, Griffin KM, Messer JD, Winzeler ME, Shriner SA, Killian ML, K Torchetti M, DeLiberto TJ, Amman BR, Cossaboom CM, Harvey RR, Wendling NM, Rettler H, Taylor D, Towner JS, Barton Behravesh C, Blehert DS. 2021.*** An Opportunistic Survey

Reveals an Unexpected Coronavirus Diversity Hotspot in North America. Viruses 13(10):2016. doi: 10.3390/v13102016.

88. ***Italiya J, Vacek V, Matějů P, Dering C, Celina SS, Ndiaye A, Černý J. 2023.*** First Detection of SARS-CoV-2 in White Rhinoceros during a Small-Scale Coronavirus Surveillance in the Bandia Reserve, Senegal. Animals (Basel) 13(16):2593. doi: 10.3390/ani13162593.

89. ***Jackwood MW, Hall D, Handel A. 2012. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses.*** Infect Genet Evol 12(6):1305-11. doi: 10.1016/j.meegid.2012.05.003.

90. ***Jaimes JA, Whittaker GR. 2018***. Feline coronavirus: Insights into viral pathogenesis based on the spike protein structure and function. Virology 517:108-121. doi: 10.1016/j.virol.2017.12.027.

91. ***Jerome K.2010***. Lennette's Laboratory Diagnosis ofViral Infections. 4ª ed. USA: Informa Healthcare. 512p.

92. ***Joffrin L, Goodman SM, Wilkinson DA, Ramasindrazana B, Lagadec E, Gomard Y, Minter G, Dos Santos A, Corrie-Schoeman M, Sookhareea R, Tortosa P, Julienne S, Gudo E, Mavingui P, Lebarbenchon C. 2020***. Bat coronavirus phylogeography in the Western Indian Ocean. Sci Rep 10:6873. https://doi.org/10.1038/s41598-020-63799-7.

93. ***Jordan BJ, Hilt DA, Poulson R, Stallknecht DE, Jackwood MW. 2015.*** Identification of avian coronavirus in wild aquatic birds of the central and eastern USA. J Wildl Dis 51(1):218-21. doi: 10.7589/2014-03-070.

94. ***Jung K, Saif LJ. 2015.*** Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. The Veterinary Journal 204 (2): 134-143. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.02.017

95. ***Jung K, Hu H, Saif LJ. 2016.*** Porcine deltacoronavirus infection: Etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis. Virus Res 226:50-59. doi: 10.1016/j.virusres.2016.04.009.

96. ***Kirchdoerfer R, Ward A. 2019.*** Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. Nat Commun 10(1):2342. doi:10.1038/s41467-019-10280-3.

97. ***Ko CK, Kang MI, Lim GK, Kim GY, Yoon SS, Park JT, Jeong C, Park SH, Park SJ, Kim YJ, Jeong JH, Kim SK, Park SI, Kim HH, Kim KY, Cho KO. 2006***. Molecular characterization of HE, M, and E genes of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2003. Virus Genes 32(2):129-36. doi: 10.1007/s11262-005-6867-3. PMID: 16604443; PMCID: PMC7089456.

98. ***Koeppel KN, Mendes A, Strydom A, Rotherham L, Mulumba M, Venter M. 2022.*** SARS-CoV-2 Reverse Zoonoses to Pumas and Lions, South Africa. Viruses. 2022 Jan 11;14(1):120. doi: 10.3390/v14010120.

99. ***Lacroix A, Vidal N, Keita AK, Thaurignac G, Esteban A, De Nys H, Diallo R, Toure A, Goumou S, Soumah AK, Povogui M, Koivogui J, Monemou J-L, Raulino R, Nkuba A, Foulongne V, Delaporte E, Ayouba A, Peeters M. 2020***. Wide Diversity of Coronaviruses in Frugivorous and Insectivorous Bat Species: A Pilot Study in Guinea, West Africa. Viruses 12(8):855. https://doi.org/10.3390/v12080855.

100. ***Lau SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, Wong BH, Wong SS, Leung SY, Chan KH, Yuen KY. 2005.*** Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. Proc Natl Acad Sci USA 102(39):14040-5. doi: 10.1073/pnas.0506735102. Epub 2005 Sep 16. PMID: 16169905; PMCID: PMC1236580.

101. ***Lau SK, Li KS, Tsang AK, Lam CS, Ahmed S, Chen H, Chan KH, Woo PC, Yuen KY. 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. J Virol 87(15): 8638-8650. doi: 10.1128/JVI.01055-13.

102. ***Lau SKP, Wong EYM, Tsang CC, Ahmed SS, Au-Yeung RKH, Yuen KY, Wernery U, Woo PCY. 2018.*** Discovery and Sequence Analysis of Four Deltacoronaviruses from Birds in the Middle East Reveal Interspecies Jumping with Recombination as a Potential

Mechanism for Avian-to-Avian and Avian-to-Mammalian Transmission. J Virol 92(15):e00265-18. doi: 10.1128/JVI.00265-18.

103. ***Lau SKP, Lung DC, Wong EYM, Aw-Yong KL, Wong ACP, Luk HKH, Li KSM, Fung J, Chan TTY, Tang JYM, Zhu L, Yip CCY, Wong SCY, Lee RA, Tsang OTY, Yuen KY, Woo PCY. 2021***. Molecular Evolution of Human Coronavirus 229E in Hong Kong and a Fatal COVID-19 Case Involving Coinfection with a Novel Human Coronavirus 229E Genogroup. mSphere 6(1):e00819-20. doi: 10.1128/mSphere.00819-20. PMID: 33568452; PMCID: PMC8544887.

104. ***Lei J, Kusov Y, Hilgenfeld R. 2018***. Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral Res* 149:58-74. doi:10.1016/j.antiviral.2017.11.001.

105. ***Lei J, Miao Y, Bi W, Xiang C, Li W, Zhang R, Li Q, Yang Z. 2024.*** Porcine Epidemic Diarrhea Virus: Etiology, Epidemiology, Antigenicity, and Control Strategies in China. Animals (Basel) 14(2):294. doi: 10.3390/ani14020294. PMID: 38254462; PMCID: PMC10812628.

106. ***Letko M, Seifert SN, Olival KJ, Plowright RK, Munster VJ. 2020.*** Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. Nat Rev Microbiol 18(8):461-471. doi: 10.1038/s41579-020-0394-z.

107. ***Leveau LM. 2018.*** Urbanization, environmental stabilization and temporal persistence of bird species: a view from Latin America. PeerJ 6:e6056. doi: 10.7717/peerj.6056.

108. ***Li F. 2016.*** Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. Annu Rev Virol. 3(1):237-261. doi:10.1146/annurev-virology-110615-042301

109. ***Li Y, Wu Q, Huang L, Yuan C, Wang J, Yang Q. 2018***. An alternative pathway of enteric PEDV dissemination from nasal cavity to intestinal mucosa in swine. Nat. Commun 9:3811. doi: 10.1038/s41467-018-06056-w.

110. ***Li S, Yang J, Zhu Z, Zheng H. 2020.*** Porcine Epidemic Diarrhea Virus and the Host Innate Immune Response. Pathogens 9(5):367. doi: 10.3390/pathogens9050367. PMID: 32403318; PMCID: PMC7281546.

111. ***Liu L, Hägglund S, Hakhverdyan M, Alenius S, Larsen LE, Belák S. 2006.*** Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. J Clin Microbiol. 44(3):957-60. doi: 10.1128/JCM.44.3.957-960.2006. Erratum in: J Clin Microbiol. 2006 May;44(5):1924. PMID: 16517883; PMCID: PMC1393089.

112. ***Li Z, He W, Lan Y, Zhao K, Lv X, Lu H, Ding N, Zhang J, Shi J, Shan C, Gao F. 2016.*** The evidence of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus induced nonsuppurative encephalitis as the cause of death in piglets. PeerJ 4:e2443. doi: 10.7717/peerj.2443. PMID: 27672502; PMCID: PMC5028786.

113. ***Liu D, Fung T, Chong K, Shukla A, Hilgenfeld R. 2014.*** Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. Antiviral Res 109:97-109. doi:10.1016/j.antiviral.2014.06.013.

114. ***Lorenzetti E, Leme Raquel de Arruda, Ribeiro J, Rodrigues V, Fernandes A, Alfieri A.A. 2013.*** Neonatal diarrhea by bovine coronavirus (BCoV) in beef cattle herds. Semin Ciências Agrárias 34:3795–3800.

115. ***Lotfollahzadeh S, Madadgar O, Reza Mohebbi M, Reza Mokhber Dezfouli M, George Watson D. 2020.*** Bovine coronavirus in neonatal calf diarrhoea in Iran. Vet Med Sci 6(4):686-694. doi: 10.1002/vms3.277. Epub 2020 Apr 29. PMID: 32349194; PMCID: PMC7267123.

116. ***Louten J. 2016***. Detection and Diagnosis of Viral Infections. En: Louten J. Essential Human Virology. USA: Academic Press. p. 111–32

117. ***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 WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W. 2020.*** Genomic characterisation and

epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. Lancet 395(10224): 565-574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8

118. ***Luk HKH, Li X, Fung J, Lau SKP, Woo PCY. 2019.*** Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. Infect Genet Evol 71:21-30. doi: 10.1016/j.meegid.2019.03.001. Epub 2019 Mar 4. PMID: 30844511; PMCID: PMC7106202.

119. ***Liu Q, Wang HY. 2021.*** Porcine enteric coronaviruses: an updated overview of the pathogenesis, prevalence, and diagnosis. Vet Res Commun.45(2-3):75-86. doi: 10.1007/s11259-021-09808-0.

120. ***Ma Y, Wu L, Shaw N, Gao Y, Wang J, Sun Y, Lou Z, Yan L, Zhang R, Rao Z. 2015.*** Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex. Proc Natl Acad Sci U S A 112(30):9436-9441. doi:10.1073/pnas.1508686112

121. ***MacLachlan NJ, Dubovi EJ. 2017***. Fenner's Veterinary Virology. 5 ed. USA: Academic Press.570p

122. ***Mackay IM, Arden KE. 2015*** Middle East respiratory syndrome: An emerging coronavirus infection tracked by the crowd. Virus Res 202:60-88. doi: 10.1016/j.virusres.2015.01.021.

123. ***Maganga G, Pinto A, Mombo, IM, Madjitobaye M, Beyeme AMM, Boundenga L, Ar Gouilh M, N'Dilimabaka N, Drexler JF, Drosten C, Leroy EM. 2020.*** Genetic diversity and ecology of coronaviruses hosted by cave-dwelling bats in Gabon. Sci Rep 10:7314. https://doi.org/10.1038/s41598-020-64159-1.

124. ***Martin HD, Zeidner NS. 1992.*** Concomitant cryptosporidia, coronavirus and parvovirus infection in a raccoon (Procyon lotor). J Wildl Dis 28(1):113-5. doi: 10.7589/0090-3558-28.1.113. PMID: 1312645.

125. ***Martins M, Boggiatto PM, Buckley A, Cassmann ED, Falkenberg S, Caserta LC, Fernandes MHV, Kanipe C, Lager K, Palmer MV, Diel DG. 2022***. From Deer-to-Deer: SARS-CoV-2 is efficiently transmitted and presents broad tissue tropism and replication

sites in white-tailed deer. PLoS Pathog 18(3):e1010197. doi: 10.1371/journal.ppat.1010197.

126. ***Masters P. 2006.*** The molecular biology of coronaviruses. Adv Virus Res 65: 193-292. doi:10.1016/S0065-3527(06)66005-3

127. ***McCune S, Arriola CS, Gilman RH, Romero MA, Ayvar V, Cama VA, Montgomery JM, Gonzales AE, Bayer AM. 2012.*** Interspecies interactions and potential Influenza A virus risk in small swine farms in Peru. BMC Infect Dis 12:58. doi: 10.1186/1471-2334-12-58.

128. ***Mekata H, Hamabe S, Sudaryatma PE, Kobayashi I, Kanno T, Okabayashi T. 2020.*** Molecular epidemiological survey and phylogenetic analysis of bovine respiratory coronavirus in Japan from 2016 to 2018. J Vet Med Sci 82(6):726-730. doi: 10.1292/jvms.19-0587. Epub 2020 Apr 9. PMID: 32269197; PMCID: PMC7324836.

129. ***Menachery V, Yount B, Debbink K, Agnihothram S, Gralinski L, Plante JA, Graham RL, Scobey T, Ge XY, Donaldson E, Randell S, Lanzavecchia A, Marasco W, Shi ZL, Baric R. 2015.*** A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. Nat Med 21:1508–1513. https://doi.org/10.1038/nm.3985.

130. ***MINSA 2020.*** Covid-19 tiene comportamiento diferente en los mercados. Ministerio de Salud. [01 junio 2022]. Disponible en https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/158836-minsa-covid-19-tiene-comportamiento-diferente-en-los-mercados.

131. ***Mitchell JA, Brooks HW, Szladovits B, Erles K, Gibbons R, Shields S, Brownlie J. 2013.*** Tropism and pathological findings associated with canine respiratory coronavirus (CRCoV). Vet Microbiol 162(2-4):582-594. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.11.025.

132. ***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 Infect Dis 5:6. doi: 10.1186/1471-2334-5-6.

133. ***Monchatre-Leroy E, Boué F, Boucher JM, Renault C, Moutou F, Ar Gouilh M, Umhang G. 2017.*** Identification of Alpha and Beta Coronavirus in Wildlife Species in France: Bats, Rodents, Rabbits, and Hedgehogs. Viruses 29;9(12):364. doi: 10.3390/v9120364.

134. ***Mora-Díaz JC, Piñeyro PE, Houston E, Zimmerman J, Giménez-Lirola LG. Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus: A Review. 2019***. Front Vet Sci 6:53. doi: 10.3389/fvets.2019.00053. PMID: 30873421; PMCID: PMC6402421.

135. ***Mora-Díaz JC, Magtoto R, Houston E, Baum D, Carrillo-Ávila JA, Temeeyasen G, Zimmerman J, Piñeyro P, Giménez-Lirola L. 2020.*** Detecting and Monitoring Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus, an Underresearched Betacoronavirus. mSphere 5(3):e00199-20. doi: 10.1128/mSphere.00199-20.

136. ***Mora-Díaz JC, Temeeyasen G, Magtoto R, Rauh R, Nelson W, Carrillo-Ávila JA, Zimmerman J, Piñeyro P, Giménez-Lirola L. 2021.*** Infection and immune response to porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus in grower pigs. Vet Microbiol 253:108958. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108958. Epub 2020 Dec 16. PMID: 33387911.

137. ***More-Bayona JA, Ramirez-Velasquez M, Hause B, Nelson E, Rivera-Geronimo H. 2022.*** First isolation and whole genome characterization of porcine deltacoronavirus from pigs in Peru. Transbound Emerg Dis 69(5):e1561-e1573. doi: 10.1111/tbed.14489.

138. ***Narayanan K, Maeda A, Maeda J, Makino S. 2000.*** Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. J Virol 74(17):8127-8134. doi:10.1128/jvi.74.17.8127-8134.2000.

139. ***Narayanan K, Huang C, Makino S. 2008.*** SARS coronavirus accessory proteins. Virus Res 133(1):113-121. doi:10.1016/j.virusres.2007.10.009

140. ***Ntafis V, Mari V, Decaro N, Papanastassopoulou M, Papaioannou N, Mpatziou R, Buonavoglia C, Xylouri E. 2011.*** Isolation, tissue distribution and molecular characterization of two recombinant canine coronavirus strains. Vet Microbiol 151(3-4):238-44. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.03.008

141. ***Narayanan K, Ramirez S, Lokugamage K, Makino S. 2015.*** Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression. Virus Res 202:89-100. doi:10.1016/j.virusres.2014.11.019.

142. ***Nelson MI, Pollett S, Ghersi B, Silva M, Simons MP, Icochea E, Gonzalez AE, Segovia K, Kasper MR, Montgomery JM, Bausch DG. 2016.*** The Genetic Diversity of Influenza A Viruses in Wild Birds in Peru. PLoS One 11(1):e0146059. doi: 10.1371/journal.pone.0146059.

143. ***Neuman B, Kiss G, Kunding , Bhella D, Baksh M, Connelly S, Droese B, Klaus J, Makino S, Sawicki S, Siddell S, Stamou D, Wilson I, Kuhn P, Buchmeier M. 2011.*** A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. J Struct Biol 174(1):11-22. doi:10.1016/j.jsb.2010.11.021

144. ***Nieto J, Verdia C, Jimenez J, Regla J, Castaño C, Fernández R, Torres J, Aguilella V, Enjuanes L. 2015.*** Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. Virology 485:330-339. doi:10.1016/j.virol.2015.08.010.

145. ***Nga NTT, Latinne A, Thuy HB, Long NV, Ngoc PTB, Anh NTL, Thai NV, Phuong TQ, Thai HV, Hai LK, Long PT, Phuong NT, Hung VV, Quang LTV, Lan NT, Hoa NT, Johnson CK, Mazet JAK, Roberton SI, Walzer C, Olson SH, Fine AE. 2022.*** Evidence of SARS-CoV-2 Related Coronaviruses Circulating in Sunda pangolins (Manis javanica) Confiscated From the Illegal Wildlife Trade in Viet Nam. Front Public Health 10:826116. doi: 10.3389/fpubh.2022.826116.

146. ***Nguyen TL, Pham Thi-HH.2021.*** Genome-wide comparison of coronaviruses derived from veterinary animals: A canine and feline perspective. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 76:101654. doi: 10.1016/j.cimid.2021.101654.

147. ***Núñez-Nogueira G, Valentino-Álvarez JA, Granados-Berber AA, Ramírez-Ayala E, Zepeda-González FA, Tintos-Gómez A. 2021.*** Aquatic Biota Is Not Exempt from Coronavirus Infections: An Overview. Water 13(16):2215. https://doi.org/10.3390/w13162215

148. ***OIE 2021.*** Sars-Cov-2 in Animals – Situation Report 5. USA: Organización Mundial de Sanidad Animal [Internet]. [01 junio 2022]. Disponible en https://www.woah.org/app/uploads/2021/10/sars-cov-2-situation-report-5.pdf.

149. ***OMS 2020***. Molecular assays to diagnose COVID-19: Summary table of available protocols. Disponible en: https://www.who.int/es/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance.

150. ***Orozco C, López G, Muñoz L, Gaxiola M, Castro-del Campo N, Cueto S, Guerrero J, Moreno K, Espinoza K, Gomez S, Travisña E, Monge-Navarro F. 2020***. Detección molecular de coronavirus bovino asociado al complejo respiratorio bovino en ganado de engorda del valle de Mexicali, Baja California, México. Rev. mex. de cienc. Pecuarias 11(4): 933-945. Disponible en https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7710461.

151. ***Paim FC, Bowman AS, Miller L, Feehan BJ, Marthaler D, Saif LJ, Vlasova AN. 2019***. Epidemiology of Deltacoronaviruses (δ-CoV) and Gammacoronaviruses (γ-CoV) in Wild Birds in the United States. Viruses 11(10):897. doi: 10.3390/v11100897. PMID: 31561462; PMCID: PMC6832366.

152. ***Park SJ, Jeong C, Yoon SS, Choy HE, Saif LJ, Park SH, Kim YJ, Jeong JH, Park SI, Kim HH, Lee BJ, Cho HS, Kim SK, Kang MI, Cho KO. 2006.*** Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult cattle with diarrhea during the warmer seasons. J Clin Microbiol 44(9):3178-88. doi: 10.1128/JCM.02667-05. PMID: 16954245; PMCID: PMC1594715.

153. ***Peng S, Wang Y, Zhang Y, Song X, Zou Y, Li L, Zhao X, Yin Z. 2022*** Current Knowledge on Infectious Bronchitis Virus Non-structural Proteins: The Bearer for Achieving Immune Evasion Function. Front Vet Sci 9:820625. doi: 10.3389/fvets.2022.820625.

154. ***Poon LL, Chu DK, Chan KH, Wong OK, Ellis TM, Leung YH, Lau SK, Woo PC, Suen KY, Yuen KY, Guan Y, Peiris JS. 2005***. Identification of a novel coronavirus in bats. J Virol 79(4):2001-9. doi: 10.1128/JVI.79.4.2001-2009.2005.

155. ***Pomorska-Mól M, Włodarek J, Gogulski M, Rybska M. 2021***. Review: SARS-CoV-2 infection in farmed minks - an overview of current knowledge on occurrence, disease and epidemiology. Animal 15(7):100272. doi: 10.1016/j.animal.2021.100272.

156. ***Pospischil A, Stuedli A, Kiupel M. 2002***. Diagnostic notes: update on porcine epidemic diarrhea. Journal of Swine Health and Production 10(2): 81-85

157. ***Priestnall SL. 2020***. Canine Respiratory Coronavirus: A Naturally Occurring Model of COVID-19?. Vet Pathol 57(4):467-471. doi: 10.1177/0300985820926485

158. ***Procop G, Church D, Hall G, Janda W, Koneman E, Schereckenberger P, Woods G. 2017***. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 7ª ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins Publishing. 2733 p.

159. ***Rafique S, Jabeen Z, Pervaiz T, Rashid F, Luo S, Xie L, Xie Z. 2024.*** Avian infectious bronchitis virus (AIBV) review by continent. Front Cell Infect Microbiol 14:1325346. doi: 10.3389/fcimb.2024.1325346.

160. ***Rahman MM, Talukder A, Chowdhury MMH, Talukder R, Akter R. 2021.*** Coronaviruses in wild birds - A potential and suitable vector for global distribution. Vet Med Sci 7(1):264-272. doi: 10.1002/vms3.360.

161. ***Reusken CB, Haagmans BL, Müller MA, Gutierrez C, Godeke GJ, Meyer B, Muth D, Raj VS, Smits-De Vries L, Corman VM, Drexler JF, Smits SL, El Tahir YE, De Sousa R, van Beek J, Nowotny N, van Maanen K, Hidalgo-Hermoso E, Bosch BJ, Rottier P, Osterhaus A, Gortázar-Schmidt C, Drosten C, Koopmans MP. 2013.*** Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. Lancet Infect Dis 13(10):859-66. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70164-6.

162. ***Recht J, Schuenemann VJ, Sánchez-Villagra MR. 2020.*** Host Diversity and Origin of Zoonoses: The Ancient and the New. Animals 10 (9):1672. doi: 10.3390/ani10091672.

163. ***Rho S, Moon HJ, Park SJ, Kim HK, Keum HO, Han JY, Van Nguyen G, Park BK. 2011.*** Detection and genetic analysis of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus in South Korea. Virus Genes. 2011 Feb;42(1):90-6. doi: 10.1007/s11262-010-0551-y.

164. ***Ruiz-Aravena M, McKee C, Gamble A, Lunn T, Morris A, Snedden CE, Yinda C,Port J, Buchholz D, Yeo Yao, Faust C, Jax E, Dee L, Jones D, Kessler M, Falvo C, Crowley D, Bharti N, Brook C, Aguilar H, Peel A, Restif O, Schountz T, Parrish C, Gurley E, Lloyd-Smith J, Hudson P, Munster V, Plowright R. 2022.*** Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats. Nat Rev Microbiol 20:299–314. https://doi.org/10.1038/s41579-021-00652-2

165. ***Ryu WS. 2017.*** Diagnosis and Methods. En Ryu WS. Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses. USA: Academic Press. p 47–62

166. ***Saif LJ, Heckert RA, Miller KL, Tarek MM. 1988.*** Cell culture propagation of bovine coronavirus. J Tissue Cult Methods 11(3):139-145. doi: 10.1007/BF01404267. PMID: 32214596; PMCID: PMC7088767.

167. ***Saif LJ, Redman DR, Brock KV, Kohler EM, Heckert RA. 1988.*** Winter dysentery in adult dairy cattle: detection of coronavirus in the faeces. Vet Rec 123(11):300-1. doi: 10.1136/vr.123.11.300. PMID: 2848350.

168. ***Saif LJ. 2004***. Animal coronaviruses: what can they teach us about the severe acute respiratory syndrome?. Rev Sci Tech 23(2):643-60. doi: 10.20506/rst.23.2.1513.

169. ***Saif LJ, Jung K.2020***. Comparative Pathogenesis of Bovine and Porcine Respiratory Coronaviruses in the Animal Host Species and SARS-CoV-2 in Humans. J Clin Microbiol 58(8): e01355-20. doi: 10.1128/JCM.01355-20.

170. ***Salem E, Dhanasekaran V, Cassard H, Hause B, Maman S, Meyer G, Ducatez MF. 2020.*** Global Transmission, Spatial Segregation, and Recombination Determine the Long-Term Evolution and Epidemiology of Bovine Coronaviruses. Viruses 12(5):534. doi: 10.3390/v12050534. PMID: 32414076; PMCID: PMC7290379.

171. ***Salewski V, Bruderer B. 2007.*** The evolution of bird migration--a synthesis. Naturwissenschaften 94(4):268-79 doi:10.1007/s00114-006-0186-y

172. ***Sánchez-Chicana CA. 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. 86p.

173. ***Sasaki Y, Alvarez J, Sekiguchi S, Sueyoshi M, Otake S, Perez A. 2016.*** Epidemiological factors associated to spread of porcine epidemic diarrhea in Japan. Prev Vet Med 123:161-167. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.11.002. Epub 2015 Nov 7. PMID: 26588869.

174. ***Shan T, Yang S, Wang H, Wang H, Zhang J, Gong G, Xiao Y, Yang J, Wang X, Lu J, Zhao M, Yang Z, Lu X, Dai Z, He Y, Chen X, Zhou R, Yao Y, Kong N, Zeng J, Ullah K, Wang X, Shen Q, Deng X, Zhang J, Delwart E, Tong G, Zhang W. 2022.*** Virome in the cloaca of wild and breeding birds revealed a diversity of significant viruses. Microbiome 10(1):60. doi: 10.1186/s40168-022-01246-7.

175. ***Shi S, Lai M. 2005.*** Viral and cellular proteins involved in coronavirus replication. Curr Top Microbiol Immunol 287:95–131. doi:10.1007/3-540-26765-4_4

176. ***Shi J, Zhao K, Lu H, Li Z, Lv X, Lan Y, Guan J, He W, Gao F. 2018***. Genomic characterization and pathogenicity of a porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus strain isolated in China. Virus Genes 54(5):672-683. doi: 10.1007/s11262-018-1591-y. Epub 2018 Aug 4. PMID: 30078094; PMCID: PMC7089186.

177. ***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. 2020. 368(6494):1016-1020. doi: 10.1126/science.abb7015.

178. ***Septisetyani EP, Prasetyaningrum PW, Anam K, Santoso A. 2021.*** SARS-CoV-2 Antibody Neutralization Assay Platforms Based on Epitopes Sources: Live Virus,

Pseudovirus, and Recombinant S Glycoprotein RBD. Immune Netw 21(6):e39. https://doi.org/10.4110/in.2021.21.e39

179. ***Smith DR, Fedorka-Cray PJ, Mohan R, Brock KV, Wittum TE, Morley PS, Hoblet KH, Saif LJ. 1998.*** Epidemiologic herd-level assessment of causative agents and risk factors for winter dysentery in dairy cattle. Am J Vet Res 59(8):994-1001. PMID: 9706203.

180. **Singasa K, Songserm T, Lertwatcharasarakul P, Arunvipas P. 2017.** Molecular and phylogenetic characterization of bovine coronavirus virus isolated from dairy cattle in Central Region, Thailand. Trop Anim Health Prod 49(7):1523-1529. doi: 10.1007/s11250-017-1358-9. Epub 2017 Jul 18. PMID: 28721511; PMCID: PMC7089240.

181. ***Snijder E, Decroly E, Ziebuhr J. 2016***. The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. Adv Virus Res 96:59-126. doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.008

182. ***Snodgrass DR, Terzolo HR, Sherwood D, Campbell I, Menzies JD, Synge BA. 1986.*** Aetiology of diarrhoea in young calves. Vet Rec 119(2):31-4. doi: 10.1136/vr.119.2.31. PMID: 3750766.

183. ***Song D, Park B. 2012.*** Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. Virus Genes 44(2):167-75. doi: 10.1007/s11262-012-0713-1.

184. ***South N, Wyatt T. 2011.*** Comparing Illicit Trades in Wildlife and Drugs: An exploratory study. Deviant Behaviour 32:538-561. doi: https://doi.org/10.1080/01639625.2010.483162

185. ***Specter S, Hodinka R, Young S, Wiedbrank. 2009.*** Clinical Virology Manual. 4ª ed. USA: ASM PRESS. 704p.

186. ***Stobart C, Sexton N, Munjal H, Lu X, Molland K, Tomar S, Mesecar A, Denison M. 2013.*** Chimeric exchange of coronavirus nsp5 proteases (3CLpro) identifies common

and divergent regulatory determinants of protease activity. J Virol 87(23):12611-12618. doi:10.1128/JVI.02050-13

187. ***Storz J, Purdy CW, Lin X, Burrell M, Truax RE, Briggs RE, Frank GH, Loan RW. 2000.*** Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytocidal viruses, and Pasteurella spp. from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. J Am Vet Med Assoc 216(10):1599–1604. doi: 10.2460/javma.2000.216.1599.

188. ***Subbarao K, McAuliffe J, Vogel L, Fahle G, Fischer S, Tatti K, Packard M, Shieh WJ, Zaki S, Murphy B. 2004.*** Prior infection and passive transfer of neutralizing antibody prevent replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in the respiratory tract of mice. J Virol 78(7):3572-7. doi: 10.1128/jvi.78.7.3572-3577.2004. PMID: 15016880; PMCID: PMC371090.

189. ***Subissi L, Imbert I, Ferron F, Collet A, Coutard B, Decroly E, Canard B. 2014***. SARS-CoV ORF1b-encoded nonstructural proteins 12-16: replicative enzymes as antiviral targets. Antiviral Res 101:122-130. doi:10.1016/j.antiviral.2013.11.006

190. ***Suzuki T, Shibahara T, Imai N, Yamamoto T, Ohashi S. 2018***. Genetic characterization and pathogenicity of Japanese porcine deltacoronavirus. Infect Genet Evol 61:176-182. doi: 10.1016/j.meegid.2018.03.030.

191. ***Suzuki T, Otake Y, Uchimoto S, Hasebe A, Goto Y. 2020.*** Genomic Characterization and Phylogenetic Classification of Bovine Coronaviruses Through Whole Genome Sequence Analysis. Viruses 12(2):183. doi: 10.3390/v12020183. PMID: 32041103; PMCID: PMC7077292.

192. ***Swayne D, Boulianne M, Logue C, McDougald L, Nair V, Suarez D. 2020.*** Diseases of Poultry.14ª ed. USA: Wiley Blackwell. 1471p

193. ***Sykes JE. 2014***. Canine Distemper Virus Infection. En: Sykes JE, eds. Canine and Feline Infectious Diseases, China. Elsevier Saunders. 152-165p.

194. ***Takano F, Castro N. 2007***. Avifauna en el campus de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM), Lima – Perú. Ecologia Aplicada 6:149-154

195. ***Tao Y, Shi M, Chommanard C, Queen K, Zhang J, Markotter W, Kuzmin IV, Holmes EC, Tong S. 2017***. Surveillance of Bat Coronaviruses in Kenya Identifies Relatives of Human Coronaviruses NL63 and 229E and Their Recombination History. J Virol 91(5): e01953-16. doi: 10.1128/JVI.01953-16. PMID: 28077633; PMCID: PMC5309958.

196. ***Terada Y, Matsui N, Noguchi K, Kuwata R, Shimoda H, Soma T, Mochizuki M, Maeda K. 2014.*** Emergence of pathogenic coronaviruses in cats by homologous recombination between feline and canine coronaviruses. PLoS ONE 9:e106534

197. ***Teeling EC, Vernes SC, Dávalos LM, Ray DA, Gilbert MTP, Myers E. 2018.*** Bat1K Consortium. Bat Biology, Genomes, and the Bat1K Project: To Generate Chromosome-Level Genomes for All Living Bat Species. Annu Rev Anim Biosci 6:23-46. doi: 10.1146/annurev-animal-022516-022811. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29166127.

198. ***Tinoco YO, Montgomery JM, Kasper MR, Nelson MI, Razuri H, Guezala MC, Azziz-Baumgartner E, Widdowson MA, Barnes J, Gilman RH, Bausch DG, Gonzalez AE. 2016.*** Transmission dynamics of pandemic influenza A(H1N1) pdm09 virus in humans and swine in backyard farms in Tumbes, Peru. Influenza Other Respir Viruses 10(1):47-56. doi: 10.1111/irv.12329. PMID: 26011186; PMCID: PMC4687498.

199. ***Toftaker I, Holmøy I, Nødtvedt A, Østerås O, Stokstad M. 2017***. A cohort study of the effect of winter dysentery on herd-level milk production. J Dairy Sci 100(8):6483-6493. doi: 10.3168/jds.2017-12605.

200. ***Tsunemitsu H, Yonemichi H, Hirai T, Kudo T, Onoe S, Mori K, Shimizu M. 1991***. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. J Vet Med Sci 53(3):433-7. doi: 10.1292/jvms.53.433. PMID: 1653037.

201. ***Turlewicz-Podbielska H, Pomorska-Mól M. 2021.*** Porcine Coronaviruses: Overview of the State of the Art. Virol Sin 36(5):833-851. doi: 10.1007/s12250-021-00364-0.

202. ***van Bolhuis GH, Philippa JD, Gajadhar AA, Osterhaus AD, Kuiken T. 2007.*** Fatal enterocolitis in harbour seals (Phoca vitulina) caused by infection with Eimeria phocae. Vet Rec 160(9):297-300. doi: 10.1136/vr.160.9.297. PMID: 17337607.

203. ***Van Den Brand JM, Haagmans BL, Leijten L, van Riel D, Martina BE, Osterhaus AD, Kuiken T. 2008.*** Pathology of experimental SARS coronavirus infection in cats and ferrets. Vet Pathol 45(4):551-62. doi: 10.1354/vp.45-4-551. PMID: 18587105.

204. ***Vijgen L, Keyaerts E, Lemey P, Maes P, Van Reeth K, Nauwynck H, Pensaert M, Van Ranst M. 2006***. Evolutionary history of the closely related group 2 coronaviruses: porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, bovine coronavirus, and human coronavirus OC43. J Virol 80(14):7270-4. doi: 10.1128/JVI.02675-05. PMID: 16809333; PMCID: PMC1489060.

205. ***Vijgen L, Moës E, Keyaerts E, Li S, Van Ranst M. 2008.*** A pancoronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. Methods Mol Biol 454:3-12. doi: 10.1007/978-1-59745-181-9_1.

206. ***Ven S, Arunvipas P, Lertwatcharasarakul P, Ratanapob N. 2021.*** Seroprevalence of bovine coronavirus and factors associated with the serological status in dairy cattle in the western region of Thailand. Vet World 14(8):2041-2047. doi: 10.14202/vetworld.2021.2041-2047. Epub 2021 Aug 9. PMID: 34566319; PMCID: PMC8448641.

207. ***Venkatagopalan P, Daskalova S, Lopez L, Dolezal K, Hogue B. 2015.*** Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. Virology 478:75-85. doi:10.1016/j.virol.2015.02.005

208. ***Virtanen J, Aaltonen K, Kegler K, Venkat V, Niamsap T, Kareinen L, Malmgren R, Kivelä O, Atanasova N, Österlund P, Smura T, Sukura A, Strandin T, Dutra L, Vapalahti O, Nordgren H, Kant R, Sironen T. 2022.*** Experimental infection of mink with SARS-COV-2 Omicron (BA.1) variant leads to symptomatic disease with lung pathology and transmission. bioRxiv 480524. doi: https://doi.org/10.1101/2022.02.16.480524. Hallado en: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.02.16.480524v2.

209. ***Wang LF, Eaton BT. 2007***. Bats, civets and the emergence of SARS. Curr Top Microbiol Immunol 315:325-44. doi: 10.1007/978-3-540-70962-6_13.

210. ***Wang Q, Vlasova AN, Kenney SP, Saif LJ. 2019.*** Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs. Curr Opin Virol 34:39-49. doi: 10.1016/j.coviro.2018.12.001.

211. ***Wille M, Holmes EC. 2020.*** Wild birds as reservoirs for diverse and abundant gamma- and deltacoronaviruses. FEMS microbiol rev 44(5):631-644 doi:10.1093/femsre/fuaa026

212. ***Wilkinson DA, Joffrin L, Lebarbenchon C, Mavingui P. 2020.*** Analysis of partial sequences of the RNA-dependent RNA polymerase gene as a tool for genus and subgenus classification of coronaviruses. J Gen Virol 101(12):1261-1269. doi: 10.1099/jgv.0.001494

213. ***Willoughby AR, Phelps KL, PREDICT Consortium, Olival KJ. 2017.*** A Comparative Analysis of Viral Richness and Viral Sharing in Cave-Roosting Bats. Diversity 9(3):35. https://doi.org/10.3390/d9030035

214. ***Wilson L, McKinlay C, Gage P, Ewart G. 2004.*** SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. Virology. 330(1):322-331. doi:10.1016/j.virol.2004.09.033

215. ***Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY. 2009.*** Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. Exp Biol Med 234(10): 1117-1127. doi: 10.3181/0903-MR-94.

216. ***Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lau CC, Tsang AK, Lau JH, Bai R, Teng JL, Tsang CC, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen KY. 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. J Virol 86(7): 3995-4008. doi: 10.1128/JVI.06540-11

217. ***Wu A, Wang Y, Zeng C, Huang X, Xu S, Su C, Wang M, Chen Y, Guo D. 2015.*** Prediction and biochemical analysis of putative cleavage sites of the 3C-like protease of

Middle East respiratory syndrome coronavirus. Virus Res 208:56-65. doi:10.1016/j.virusres.2015.05.018

218. ***Yang D, Leibowitz J. 2015.*** The structure and functions of coronavirus genomic 3′ and 5′ ends. Virus Res 206: 120–133.

219. ***Yang YL, Yu JQ, Huang YW. 2020.*** Swine enteric alphacoronavirus (swine acute diarrhea syndrome coronavirus): An update three years after its discovery. Virus Res 285:198024. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198024.

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

221. ***Yuen KY, Lau SK, Woo PC. 2012.*** Wild animal surveillance for coronavirus HKU1 and potential variants of other coronaviruses. Hong Kong Med J.18 (2):25-26.

222. ***Zamhuri SA, Soon CF, Nordin AN, Ab Rahim R, Sultana N, Khan MA, Lim GP, Tee KS. 2022.*** A review on the contamination of SARS-CoV-2 in water bodies: Transmission route, virus recovery and recent biosensor detection techniques. Sens Biosensing Res 36:100482. doi: 10.1016/j.sbsr.2022.100482.

223. ***Zhai Y, Sun F, Li X, Pang H, Xu X, Bartlam M, Rao Z. 2005***.Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7–nsp8 hexadecamer. Nat Struct Mol Biol 12(11): 980–986. doi:10.1038/nsmb999

224. ***Zhang X, Hasoksuz M, Spiro D, Halpin R, Wang S, Vlasova A, Janies D, Jones LR, Ghedin E, Saif LJ. 2007.*** Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and genetic changes after tissue culture adaptation. Virology 363(1):1-10. doi: 10.1016/j.virol.2007.03.018.

225. ***Zhang J. 2016*** Porcine deltacoronavirus: Overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution. Virus Res 226:71-84. doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.028.

226. ***Zhang L, Li L, Yan L, Ming Z, Jia Z, Lou Z, Rao Z. 2018.*** Structural and Biochemical Characterization of Endoribonuclease Nsp15 Encoded by Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. J Virol 92(22): e00893-18. doi:10.1128/JVI.00893-18.

227. ***Zhang W, Stephen P, Thériault J, Wang R, Lin S. 2020.*** Novel Coronavirus Polymerase and Nucleotidyl-Transferase Structures: Potential to Target New Outbreaks. J Phys Chem Lett 11(11):4430-4435. doi:10.1021/acs.jpclett.0c00571

228. ***Zhang T, Wu Q, Zhang Z. 2020.*** Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. Curr Biol 30(7): 1346-1351 e1342. doi: 10.1016/j.cub.2020.03.022

229. ***Zhao Y, Wang J, Kuang D, Xu J, Yang M, Ma C, Zhao S, Li J, Long H, Ding K, Gao J, Liu J, Wang H, Li H, Yang Y, Yu W, Yang J, Zheng Y, Wu D, Lu S, Liu H, Peng X. 2020***. Susceptibility of tree shrew to SARS-CoV-2 infection. Sci Rep 10(1):16007. doi: 10.1038/s41598-020-72563-w.

230. ***Zhou P, Fan H, Lan T, Yang XL, Shi WF, Zhang W, Zhu Y, Zhang YW, Xie QM, Mani S, Zheng XS, Li B, Li JM, Guo H, Pei GQ, An XP, Chen JW , Zhou L, Mai KJ, Wu ZX, Li D, Anderson DE, Zhang LB, Li SY, Mi ZQ, He TT, Cong F, Guo PJ, Huang R, Luo Y, Liu XL, Chen J, Huang Y, Sun Q, Zhang XL, Wang YY, Xing SZ, Chen YS, Sun Y, Li J, Daszak P, Wang LF, Shi ZL, Tong YG, Ma JY. 2018***. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. Nature 556 (7700): 255-258. doi: 10.1038/s41586-018-0010-9.

231. ***Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, Poon, Xie ZH, Chan KH, Li PH, Tan SY, Chang Q, Xie JP, Liu XQ, Xu J, Li DX, Yuen KY, Peiris, Guan Y. 2003*** Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. Lancet 362(9393):1353-8. doi: 10.1016/s0140-6736(03)14630-2.

232. ***Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W, China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. 2020.*** A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med 382(8):727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.

233. ***Zhu Q, Su M, Li Z, Wang X, Qi S, Zhao F, Li L, Guo D, Feng L, Li B, Sun D. 2022.*** Epidemiological survey and genetic diversity of bovine coronavirus in Northeast China. Virus Res 308:198632. doi: 10.1016/j.virusres.2021.198632.

234. ***Zou Y, Cao X, Yang B, Deng L, Xu Y, Dong S, Li W, Wu C, Cao G. 2022.*** In Silico Infection Analysis (iSFA) Identified Coronavirus Infection and Potential Transmission Risk in Mammals. Front Mol Biosci 9:831876. doi: 10.3389/fmolb.2022.831876. PMID: 35211513; PMCID: PMC8861533.

IX. ANEXOS

ANEXO 1

Resolucion de autorización IFS-2021-005 del proyecto por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR)

PERÚ | Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego

SERFOR

Firmado digitalmente por CALDERON VALENZUELA Ana Luisa FAU 20562836927 soft
Cargo: Director General
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 08.02.2021 19:19:18 -05:00

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

Magdalena Del Mar, 08 de Febrero del 2021

CARTA N° D000135-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS

Señor
LUIS ANTONIO GOMEZ PUERTA
Investigador
Urb. Mateo Pumacahua, Jr. Mariano Melgar comité 32, lote 8
lgomezp@unmsm.edu.pe
Santiago de Surco.-

Asunto : Remito Resolución de Dirección General e Informe Técnico

Referencia : Solicitud S/N (05/08/2020)

Es grato dirigirme a usted, con relación al documento de la referencia, mediante el cual solicitó la autorización para realizar una investigación científica en fauna silvestre, como parte del proyecto titulado: "Vigilancia epidemiológica del SARS-CoV-2 en mamíferos silvestres incautados por el Servicio Nacional de Flora y Fauna de Perú"; investigación a ser efectuada fuera de Áreas Naturales Protegidas, en los departamentos de Lima, Lambayeque, Loreto y Ucayali, por el periodo de veinticuatro (24) meses.

Al respecto y de acuerdo a lo solicitado, remito para su conocimiento y fines, el Informe Técnico N° D000139-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPFS y la Resolución de Dirección General N° D000061-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS (08/02/2021), mediante la cual se resuelve otorgar a su favor la autorización con fines de investigación científica de fauna silvestre fuera de Áreas Naturales Protegidas, para la realización de la investigación científica titulada: "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", correspondiéndole el Código de Autorización N° **AUT-IFS-2021-005,** en virtud de las consideraciones expuestas en la presente Resolución de Dirección General.

Sin otro particular, expreso mis cordiales saludos.

Atentamente,

Documento firmado digitalmente

Ana Luisa Calderón Valenzuela
Directora General
Dirección General de Gestión Sostenible del
Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre
Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre - SERFOR

ANEXO 2

Carta de Aprobacion del Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA)

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

Presidente del Comité de Etica y de Bienestar Animal

ANEXO 3

Protocolo para la toma de muestras biológicas

La toma de muestra biológica se realizó en base a los criterios de inclusión y exclusión del estudio. Para hacer la toma de muestra de animales vivos, los animales fueron anestesiados utilizando una dosis de ketamina a 10mg/kg de peso vivo, vía intramuscular.

Para cada especie animal, se colectó muestras de mucosa mediante un hisopado orofaríngeo y muestras de heces mediante un hisopado rectal u cloacal. Para ambos muestreos se utilizó un hisopo estéril, los cuales posterior al muestreo fueron almacenados en medio de transporte universal (UTM-RT ™) a -20°C hasta su procesamiento (extracción de material genético).

Se utilizó el medio de transporte universal (UTM-RT ™) porque fue recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la toma de muestra en pacientes sospechosos a COVID-19 (OMS, 2020).

Procedimiento

1. Previo al muestreo el animal tiene que ser anestesiado o eutansiado según sea el caso y decisión del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre de Peru.
2. Se utilizo un hisopo esteril para cada sitio anatómico de muestreo (orofaríngeo o rectal/cloacal)
3. El operario abre la boca o pico del animal y con la otra mano mete el hiospo hasta la zona orofaringea. Inmediatamente el hisopo es metido en frascos con medio de transporte universal (UTM-RT ™).
4. Para el recto y cloaca, se puede usar pinzas para ayudar abrir la zona y lograr meter el hisopo esteril. Inmediatamente el hisopo es metido en frascos con medio de transporte universal (UTM-RT ™).
5. Posterior a esto los tubos son rotulados con los datos del animal.
6. Los tubos UTM conteniendo los hiposos seran colcoados en congelación a -20ºC. Luego, dentro de las 24 horas, los tubos seran remitidos en hielo seco al Laboratorio de Epidemiologia y Economia Veterinari de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para ser almacenados a -80ºC hasta su procesamiento.