



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Diseño y estandarización de un método de diagnóstico
molecular para la detección de SARS-CoV-2**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria

AUTOR

Katty Sarahí ZANABRIA PAMPAS

ASESOR

Dr. Miguel Ángel ROJAS MONTES

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

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

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

Referencia bibliográfica

Zanabria K. Diseño y estandarización de un método de diagnóstico molecular para la detección de SARS-CoV-2 [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Katty Sarahí Zanabria Pampas
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71258323
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0005-9524-1652
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Miguel Ángel Rojas Montes
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	42290575
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-5029-3874
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Fidel Francisco Suárez Aranda
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10833645
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Alberto Gustavo Manchego Sayán
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	15619652
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Juan Anderson More Bayona
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43316819

Datos de investigación	
Línea de investigación	Microbiología y Parasitología Veterinaria
Grupo de investigación	GIVIVET (Grupo de Investigación en Virología e inmunología Veterinaria)
Agencia de financiamiento	FONDECYT-CONCYTEC VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
Ubicación geográfica de la investigación	Laboratorio de Virología e Inmunología. Facultad de Medicina Veterinaria-UNMSM Latitud: 12° 08' 15'' Longitud: 76° 98' 77''
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2022-2023
URL de disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **lunes 20 de noviembre de 2023**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **0235-EPMV/FMV-2023**, integrado por los siguientes profesores:

MV. Dr. Suárez Aranda Fidel Francisco	Presidente del Jurado
MV. Dr. Rojas Montes Miguel Ángel	Asesor de la Tesis
MV. Mg. Manchego Sayán Alberto Gustavo	Miembro del Jurado
MV. PhD. More Bayona Juan Anderson	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Doña: **ZANABRIA PAMPAS KATTY SARAHÍ**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

“DISEÑO Y ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2”

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **diecisiete (17)**

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:30 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:



Firmado digitalmente por SUAREZ
ARANDA Fidel Francisco FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 11.12.2023 08:58:44 -05:00

.....
Suárez Aranda, Fidel Francisco: MV. Dr. Prof. Principal TC



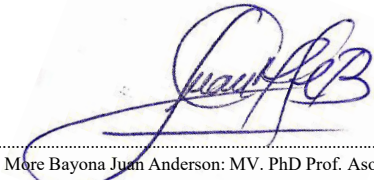
Firmado digitalmente por ROJAS
MONTES Miguel Angel FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 07.12.2023 15:13:49 -05:00

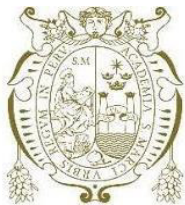
.....
Rojas Montes Miguel Ángel: MV. Dr. Prof. Asociado TC



Firmado digitalmente por
MANCHEGO SAYAN Alberto Gustavo
FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 08.12.2023 23:59:54 -05:00

.....
Manchego Sayán Alberto Gustavo: MV. Mg. Prof. Principal DE

.....

More Bayona Juan Anderson: MV. PhD Prof. Asociado DE



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
 Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

Facultad de Medicina Veterinaria
 ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 0235-EPMV/FMV-2023

PRESIDENTE:



Firmado digitalmente por SUAREZ ARANDA Fidel Francisco FAU
 20148092282 soft
 Motivo: Soy el autor del documento
 Fecha: 11.12.2023 08:59:59 -05:00

.....
SUÁREZ ARANDA FIDEL FRANCISCO

MIEMBROS :



Firmado digitalmente por ROJAS MONTES Miguel Angel FAU
 20148092282 soft
 Motivo: Soy el autor del documento
 Fecha: 07.12.2023 15:14:53 -05:00

.....
ROJAS MONTES MIGUEL ÁNGEL
ASESOR DE LA TESIS



Firmado digitalmente por MANCHEGO SAYAN Alberto Gustavo FAU
 20148092282 soft
 Motivo: Soy el autor del documento
 Fecha: 09.12.2023 00:00:47 -05:00

.....
MANCHEGO SAYÁN ALBERTO GUSTAVO

.....
MORE BAYONA JUAN ANDERSON

San Borja, 05 de diciembre del 2023

V° B°



Firmado digitalmente por SANTIANI ACOSTA Alexei Vicent FAU
 20148092282 soft
 Motivo: Soy el autor del documento
 Fecha: 11.12.2023 09:37:09 -05:00

.....
Dr. Alexei Vicent Santiani Acosta
Director EPMV
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado



CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Miguel Angel Rojas Montes en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Directoral N°0125-EPMV/FMV-2023 de la tesis informe de investigación, cuyo título es **“DISEÑO Y ESTANDARIZACIÓN DE UNA PRUEBA MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2”**, presentado por la bachiller **ZANABRIA PAMPAS, KATTY SARAHÍ** para optar el título de Médico Veterinario 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 el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 5% 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 título correspondiente.



Firmado digitalmente por ROJAS
MONTES Miguel Angel FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 27.09.2023 11:40:47 -05:00



DNI: 42290575

Dr. Miguel Angel Rojas Montes

DEDICATORIAS

Dedico esta investigación a mi familia y amigos que siempre me apoyaron y alentaron a continuar, incluso en los momentos más complicados de la carrera.

A quienes partieron, pero dejaron una gran marca en mi corazón: mis abuelitos y mis queridos perritos: Boddy y Sammy. Los extrañaré siempre.

Finalmente dedico el presente trabajo a mi pequeño Timmy, quien me acompañó desde el primer día de la carrera, fue mi compañero durante la redacción del presente trabajo y gracias a él descubrí áreas muy bonitas de clínica de animales menores.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, padres, hermanas y primas, porque desde niña confiaron en mí y en mi deseo de estudiar esta hermosa carrera.

Agradezco a la facultad de medicina veterinaria por todas las experiencias que me permitió vivir durante los seis años de carrera; así como por que, gracias a esta casa de estudios, conocí a lindas personas que se convirtieron en amigos muy cercanos, los quiero y espero que siempre nos demos un tiempo para reunirnos y seguir compartiendo bonitos momentos.

Agradezco a David, por su amor, cuidado y comprensión durante todos estos años.

Agradezco al Dr. Miguel Rojas, por su apoyo y orientación en la realización de este trabajo, así como brindarme las facilidades para trabajar en el laboratorio.

Agradezco a Noriko Oviedo por la paciencia y apoyo brindado durante el desarrollo del presente trabajo.

Agradezco al Dr. Dennis Navarro por apoyarme y enseñarme el manejo de PCR en tiempo real. Siempre siga con su carisma, nos da muchas ganas de continuar trabajando.

Agradezco al Dr. Alberto Manchego por sus consejos, orientación y amabilidad en la ejecución de esta investigación.

Agradezco a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y al FONDECYT–CONCYTEC por el financiamiento de la presente investigación mediante el PCONFIGI-e) y "Proyecto de Investigación Básica 2019-01" con número de contrato 355-2019).

INDICE DEL CONTENIDO

DEDICATORIAS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ANEXOS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Clasificación de los coronavirus	3
2.2 SARS-CoV-2	4
2.2.1 Características del SARS-CoV-2	4
2.3 Hospederos	5
2.4 Infección en animales	7
2.5 Patogenia	10
2.6 Signos clínicos	11
2.7 Diagnóstico	12
2.7.1 Métodos de detección de anticuerpos	12
2.7.2 Métodos de detección de antígenos	13
2.7.3 Métodos de detección de genes	14
2.8 Tratamiento	18
2.9 Control y Prevención	19
2.10 Limitaciones y desafíos	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Lugar y periodo de ejecución	21
3.2 Diseño de oligonucleótidos y sondas TaqMan	21
3.2.1 Distancia genética	22
3.2.2 Evaluación de oligonucleótidos	22
3.3 Controles	26

3.4 Sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del ensayo	27
3.5 Validación de protocolos de PCR y qRT-PCR	27
3.5.1 Evaluación del KIT diseñado empleando muestras biológicas de perros y gatos positivas a SARS-CoV-2 mediante RT-PCR punto final	28
3.5.2 Evaluación del KIT Ruo2019-nCoV (IDTdna) CDC mediante qRT-PCR	30
3.5.3 Evaluación del KIT diseñado mediante qRT-PCR	32
IV. RESULTADOS	34
4.1 Distancia genética	34
4.2 Evaluación de oligonucleótidos diseñados mediante RT-PCR	34
4.3 Ejecución del kit de la CDC mediante qRT-PCR	36
4.4 Evaluación de oligonucleótidos del kit diseñado mediante qRT-PCR	39
V. DISCUSIÓN	42
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
VII. LITERATURA CITADA	51
VIII. ANEXOS	61

RESUMEN

El SARS-CoV-2, agente causal de la COVID 19, al extenderse por muchos países alrededor del mundo, se convirtió en un problema de salud pública y animal. Como consecuencia, la demanda y el costo de los insumos para las pruebas diagnósticas aumentó de forma considerable, especialmente al inició de la pandemia. Países en desarrollo como Perú, tuvieron en esas circunstancias, dificultades para ampliar su capacidad de compra de pruebas moleculares. Este estudio tuvo como objetivo desarrollar y estandarizar una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) y una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real (qRT-PCR) dirigida al gen de la nucleocápside (N) del SARS-CoV-2, utilizando un control positivo sintético (200.000 copias/ μ L del gen N) y como controles negativos a coronavirus de los géneros α -CoV, β -CoV, γ -CoV y δ -CoV. Para realizar esto, primero se utilizó herramientas bioinformáticas para diseñar los oligonucleótidos y la sonda fluorescente específica (FAM), luego se evaluó los oligonucleótidos diseñados mediante PCR utilizando diferentes temperaturas con el objetivo de obtener la temperatura de alineamiento, seguidamente se estandarizó la PCR en punto final, realizando diluciones del control positivo del gen N sintético. Posteriormente, se sometió a una qRT-PCR, utilizando diluciones en serie en base 10 del control positivo por triplicado para calcular la curva estándar de la prueba. Al mismo tiempo, se ejecutó un kit comercial 2019-nCoV RUO de la CDC para comparar nuestros resultados. Finalmente, nuestra prueba fue evaluada usando muestras positivas a SARS-CoV-2 de heces de perros y gatos confirmadas por secuenciación. Los resultados de ambas pruebas diseñadas fueron satisfactorios, la RT-PCR amplificó el control positivo, muestras positivas y hubo ausencia de amplificación en los controles negativos. Por otro lado, la qRT-PCR presenta una eficiencia del 92.1%, con una detección mínima de 20 copias del gen por muestra, valores similares al kit comercial de la CDC que muestra una eficiencia del 98% y 89% para el gen N1 Y N2 respectivamente, con una detección mínima de 20 copias por muestra; de tal manera que el kit desarrollado en el presente trabajo y el kit comercial de qRT-PCR presentan resultados similares.

Palabras clave: SARS-CoV 2; Perú; RT-PCR; qRT-PCR; animales domésticos.

ABSTRACT

SARS-CoV-2, the causative agent of COVID 19, became a public and animal health issue and spread to many countries around the world. Consequently, the demand and cost of diagnostic testing supplies increased considerably at the beginning of the pandemic. Developing countries, such as Peru, found it difficult to expand their capacity to purchase molecular tests under these circumstances. This study aimed to develop and standardize a reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) targeting the SARS-CoV-2 nucleocapsid (N) gene, using a synthetic positive control (200,000 copies/ μ L of the N gene) and as negative controls to coronaviruses of the genres α -CoV, β -CoV, γ -CoV and δ -CoV. To begin with this study, bioinformatics tools were first used to design the oligonucleotides and the specific fluorescent probe (FAM), then the designed oligonucleotides were evaluated by PCR using different temperatures in order to obtain the alignment temperature, then the endpoint PCR was standardized, making dilutions of the positive control of the synthetic N gene. Subsequently, it was subjected to qRT-PCR, using serial base 10 dilutions of the positive control in triplicate to calculate the standard curve of the test. At the same time, a commercial 2019-nCoV RUO kit from CDC was run to compare our results. Finally, our test was evaluated using SARS-CoV-2 positive samples from dog and cat feces confirmed by sequencing. The results of both designed tests were satisfactory, RT-PCR amplified the positive control, the positive samples and there was absence of amplification in the negative controls. On the other hand, the qRT-PCR presented an efficiency of 92.1%, with a minimum detection of 20 copies of the gene per sample, similar values to the CDC commercial kit that showed an efficiency of 98% and 89% for the N1 and N2 gene, respectively, with a minimum detection of 20 copies per sample; thus, the kit developed in the present work and the commercial qRT-PCR kit presented similar results.

Keywords: SARS-CoV 2; Peru; RT-PCR; qRT-PCR; domestic animals.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Oligonucleótidos y sonda diseñados para la amplificación del gen N del SARS-CoV-2	25
Cuadro 2. Perfil del ciclo térmico para determinar la Tm ideal para la RT- PCR de SARS-CoV-2.	26
Cuadro 3. Perfil del ciclo térmico para la RT- PCR de SARS-CoV-2.	30
Cuadro 4. Perfil del ciclo térmico para la qRT-PCR del kit de CDC, utilizando diluciones del control positivo sintético del gen N del SARS-CoV-2 (CDC, 2020b).	31
Cuadro 5. Perfil del ciclo térmico para la qRT-PCR del kit diseñado, utilizando diluciones del control positivo sintético del gen N del SARS-CoV-2.	32
Cuadro 6. Perfil del ciclo térmico para la qRT-PCR de un paso de SARS-CoV-2.	33
Cuadro 7. Cuadro comparativo de valores de Ct entre el kit de CDC y la qRT-PCR diseñada en el presente estudio.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura. 1 Organización del genoma del SARS-CoV-2 (Rastogi <i>et al.</i> , 2020).	5
Figura 2. Procedencia de los coronavirus que afectan a los seres humanos (Rabi <i>et al.</i> , 2020)	6
Figura 3. Mecanismo de infección del SARS-CoV-2 (Lam <i>et al.</i> , 2021).	11
Figura 4. Diagnóstico de SARS-CoV-2 empleando qRT-PCR (Safiabadi <i>et al.</i> , 2021)	17
Figura 6. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen N en perros, gatos y humanos positivos a SARS-CoV-2 para identificar la unión del oligonucleótido Reverse, empleando el programa MegAlign del software DNASTAR (Lasergene, USA).	24
Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen N en perros, gatos y humanos positivos a SARS-CoV-2 para identificar la unión de la sonda, empleando el programa MegAlign del software DNASTAR (Lasergene, USA).	25
Figura 8. Distancia entre las secuencias de nucleótidos del gen N de humanos, caninos y felinos positivos a SARS-CoV-2 empleando el software MegAlign.	25
Figura 9. Resultados de la amplificación del control positivo empleando diferentes diluciones y temperaturas	35
Figura 10. Resultados de la amplificación del control positivo diluido gen N del SARS-CoV-2 por RT-PCR convencional. PM: marcador de peso molecular de 100 pb.	35
Figura 11. Resultados de la amplificación de un fragmento del gen N del SARS-Cov-2 por RT-PCR convencional.	36
Figura 12. Resultados de la amplificación utilizando diluciones del control positivo sintético del gen N del SARS-Cov-2 por RT-PCR en tiempo real empleando el kit de la CDC. Curva con el par de oligonucleótidos N1.	37
Figura 13. Resultados de la amplificación utilizando diluciones del control positivo sintético del gen N del SARS-Cov-2 por RT-PCR en tiempo real empleando el kit de la CDC. Curva con el par de oligonucleótidos N2.	38
Figura 14. Resultados de la amplificación utilizando muestras de animales positivos a SARS-Cov-2 por RT-PCR en tiempo real empleando el kit de la CDC. Curva N1	38

Figura 15. Resultados de la amplificación utilizando muestras de animales positivos a SARS-Cov-2 por RT-PCR en tiempo real empleando el kit de la CDC. Curva N2. 39

Figura 16. Resultados de la amplificación utilizando diluciones del control positivo sintético del gen N del SARS-CoV-2 por RT-PCR en tiempo real empleando el kit diseñado. 40

Figura 17. Resultados de la amplificación utilizando muestras de animales positivos a SARS-Cov-2 por RT-PCR en tiempo real empleando el kit diseñado.....41

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Alineamiento de las secuencias del gen N de animales positivos a <i>Alfacoronavirus</i> para observar la unión del oligonucleótido Forward.	61
Anexo 2. Alineamiento de las secuencias del gen N de animales positivos a <i>Alfacoronavirus</i> para observar la unión del oligonucleótido Reverse.	61
Anexo 3. Alineamiento de las secuencias del gen N de animales positivos a <i>Deltacoronavirus</i> para observar la unión del oligonucleótido Forward.	62
Anexo 4. Alineamiento de las secuencias del gen N de animales positivos a <i>Deltacoronavirus</i> para observar la unión del oligonucleótido Reverse.	62
Anexo 5. Alineamiento de las secuencias del gen N de animales positivos a <i>Gammacoronavirus</i> para observar la unión del oligonucleótido Forward.	62
Anexo 6. Alineamiento de las secuencias del gen N de animales positivos a <i>Gammacoronavirus</i> para observar la unión del oligonucleótido Reverse.	63

I. INTRODUCCIÓN

La pandemia que originó el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo-2 (SARS-CoV-2) ha demostrado que la lucha contra las enfermedades infecciosas continúa siendo un reto complicado de afrontar (Shen *et al.*, 2020).

Los coronavirus (CoV) son virus con envoltura que presentan un genoma de ARN de cadena simple lineal de sentido positivo, estos virus pertenecen al orden *Nidovirales* específicamente a la familia *Coronaviridae*. Dentro de esta familia existen cuatro géneros de coronavirus: *Alfacoronavirus* (α -CoV), *Betacoronavirus* (β -CoV), *Gammacoronavirus* (γ -CoV) y *Deltacoronavirus* (δ -CoV) (Lin *et al.*, 2020). El SARS-CoV-2 es un betacoronavirus y en lo que va del siglo es el tercer coronavirus que ha cruzado la barrera animal-humano, siendo capaz de causar infecciones respiratorias graves y en muchos casos, mortales en humanos (Okba *et al.*, 2020).

La qRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa en tiempo real) es el método diagnóstico Gold standard para detectar al SARS-CoV-2 (OMS, 2020). Sin embargo, no todos los laboratorios cuentan con los equipos necesarios para realizar esta técnica, es por ello que, alrededor del mundo una de las pruebas más empleadas es la RT-PCR convencional, adicionalmente los ensayos que identifican anticuerpos y antígenos han sido de suma importancia en el transcurso de la pandemia (Escalante *et al.*, 2021).

En lo que concierne al campo de medicina veterinaria, durante la emergencia mundial se reportaron casos de diversas especies animales positivas al virus después de mantener un contacto cercano con sus dueños o cuidadores portadores de la enfermedad, por lo que se cuestiona la capacidad futura de los animales en convertirse en hospederos

intermediarios de la infección y de esta forma continuar con la cadena de transmisión (Ekstrand *et al.*, 2021).

El objetivo del presente trabajo es diseñar y estandarizar un método de diagnóstico molecular, que sea capaz de detectar al SARS-CoV-2 utilizando oligonucleótidos y sondas capaces de amplificar una región altamente conservada del gen N; de esta forma el presente trabajo ayudaría no solo en el ámbito de salud pública, si no en el de salud animal, ya que la herramienta de diagnóstica diseñada podría utilizarse para detectar el SARS-CoV-2 en muestras de humanos y animales.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Clasificación de los coronavirus

Los coronavirus forman parte de la subfamilia *Orthocoronavirinae*, familia *Coronaviridae*, orden *Nidovirales* (ICTV, 2023). Existen cuatro géneros conocidos como *Alfacoronavirus* (α -CoV), *Betacoronavirus* (β -CoV), *Gammacoronavirus* (γ -CoV) y *Deltacoronavirus* (δ -CoV); sin embargo, solo los miembros del género α -CoV y β -CoV son capaces de afectar a los seres humanos (Chakraborty *et al.*, 2020). Hasta la fecha se han descrito siete coronavirus que infectan al ser humano, cuatro de ellos cursan con un resfriado común: HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, mientras que los otros tres son conocidos por su poder patógeno: coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-1), síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo-2 (SARS-CoV-2) responsable de la enfermedad del COVID-19 (CDC, 2021a; Paules *et al.*, 2020).

El SARS-CoV-1 fue responsable de una enfermedad respiratoria grave que se propagó a más de 26 países y que tuvo su origen en la provincia de Guangdong-China en el año 2002 (Zhao *et al.*, 2003). Posteriormente en el año 2012 se identificó a un nuevo coronavirus (MERS-CoV) en Arabia Saudita (De Groot *et al.*, 2013), el cual originó signos clínicos similares al anterior y finalmente el último coronavirus surgió a fines del año 2019 en Wuhan-China, donde se empezaron a reportar casos de neumonía de origen incierto, tiempo después se aisló y clasificó al virus recibiendo el nombre de SARS-CoV-2 ya que presentaba un 79.5% de identidad de nucleótidos con SARS-CoV-1 (Mahdy *et al.*, 2020). La Organización Mundial de la Salud preocupada por el aumento de los casos

en diversos países, así como la gravedad de casos clínicos en cierto grupo de pacientes, decide declarar a la COVID 19 como pandemia, la cual ha puesto en evidencia las carencias del sistema de salud frente a la emergencia de enfermedades infecciosas (OMS, 2020).

2.2 SARS-CoV-2

2.2.1 Características del SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 posee forma esférica, su diámetro oscila entre 60 a 140 nm y presenta espigas de 8 a 12 nm de longitud (Zheng, 2020). Su estructura se basa en una nucleocápside (genoma viral junto a la proteína de la nucleocápside (N)) y una envoltura externa la cual posee las proteínas estructurales, tales como la proteína de la espícula (S) (sigla en inglés de “spike”), proteína de membrana (M) y proteína de envoltura (E), así como proteínas accesorias (Li *et al.*, 2020).

El genoma viral es de tipo ARN monocatenario en sentido positivo de aproximadamente 30.000 pares de bases. El material genético de este virus contiene 15 marcos abiertos de lectura (ORFs); cerca de los dos primeros tercios al extremo 5', se ubican las ORF1a y ORF1b, que codifican las poliproteínas 1a (PP1a) y 1ab (PP1ab) correspondientemente. La fragmentación de estas poliproteínas produce 16 proteínas no estructurales que son necesarias para formar el complejo viral replicasa-transcriptasa (encargadas de la replicación y transcripción sucesivamente del virus). Así mismo en el extremo 3', se ubican los genes que codifican a las proteínas espícula (S), envoltura (E), nucleocápside (N) y membrana (M), así como ORFs situados intercaladamente entre los genes estructurales, que se encargan de elaborar proteínas accesorias (Lam *et al.*, 2021; Rastogi *et al.*, 2020) (figura 1).

La proteína S permite la unión del agente viral a la membrana de la célula hospedera presenta dos subunidades funcionales (S1 y S2), la subunidad S1 posee el dominio de unión al receptor (RBD) que establecerá contacto con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) ubicado en la periferia celular del hospedero, por su parte la subunidad S2 presenta un bucle estructural que se encarga de fusionar la membrana viral y del hospedero (Walls *et al.*, 2020). La proteína E, se caracteriza por ser de pequeño tamaño, interviene en la replicación, ensamblaje y la patogénesis viral. La proteína M es la más numerosa, posee tres dominios transmembrana, se encarga de

otorgar forma a la envoltura del SARS COV 2 y organiza el ensamblaje viral. Finalmente, la proteína N se encarga de elaborar la nucleocápside helicoidal, participar en la replicación, transcripción, traducción del virus y en suprimir la producción de células del sistema inmune del huésped(Chen *et al.*, 2020).

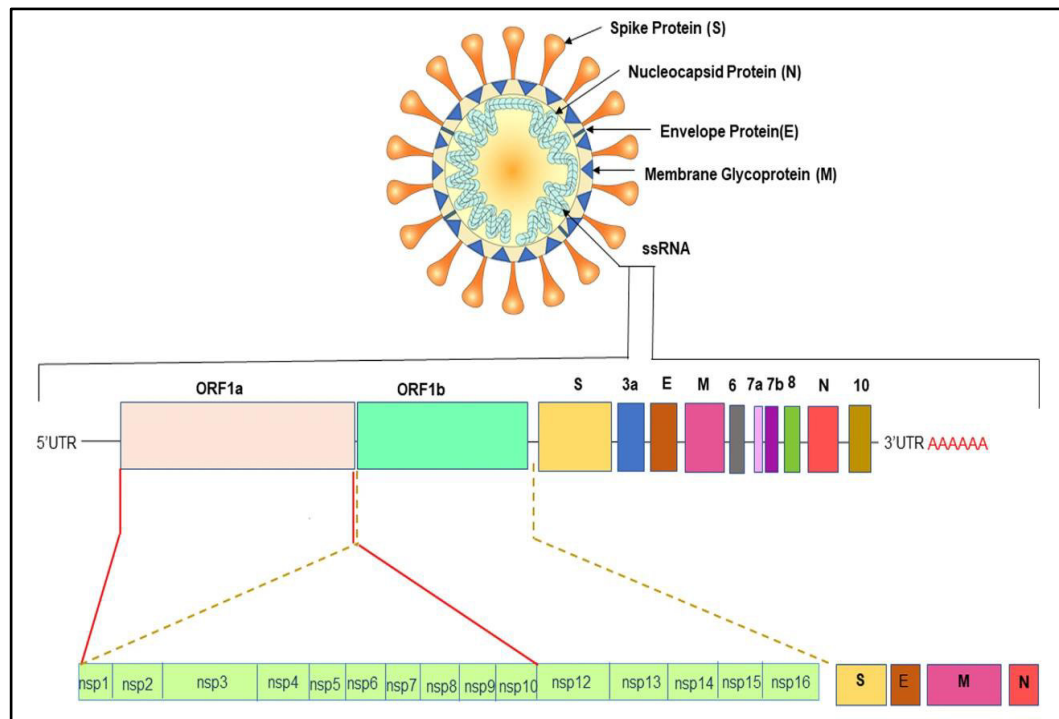


Figura. 1 Organización del genoma del SARS-CoV-2 (Rastogi *et al.*, 2020).

2.3 Hospederos

Durante muchos años los murciélagos han coexistido con diversos virus de carácter zoonótico sin manifestar signos clínicos, esto debido al sistema inmune que poseen, específicamente se ha señalado que una de las moléculas que permite este equilibrio virus-hospedero es el interferón (Subdudhi *et al.*, 2021). Existen seis géneros importantes de murciélagos: *Cynopterus*, *Rousettus*, *Nyctalus*, *Myotis*, *Miniopterus* y *Rhinolophus*. De estos, los del género *Rhinolophus* son el reservorio de los CoV semejantes al SARS; tales como el SARS-CoV-1 y MERS-CoV (Calisher *et al.*, 2006, Han *et al.*, 2015). Debido a la complejidad de transmisión directa entre los murciélagos y humanos, se señala la presencia de hospederos intermediarios, por ejemplo, el SARS-CoV-1 tuvo como

hospedero intermedio al gato civeta, mientras que el MERS-CoV al camello dromedario. En el caso del SARS-CoV-2 se ha planteado la hipótesis de que los posibles hospederos intermediarios son los pangolines ya que la semejanza entre los genomas extraídos de los CoVs de estos animales y el SARS-CoV-2 en humanos es alta (Rabi *et al.*, 2020). Sin embargo, existe otro grupo de autores quienes afirman que aún no existe suficiente evidencia científica que valide esta hipótesis.

Los pangolines son insectívoros exclusivos, su cuerpo es de pequeño tamaño y se encuentra recubierto por escamas. En los mercados asiáticos, las personas que son capaces de comprarlo en general pertenecen a la clase media a alta ya que su carne es muy solicitada y valorada por formar parte de sus costumbres culinarias, así como sus escamas, las cuales son usadas en la medicina tradicional. Si bien su venta estaba prohibida desde el año 2017 por que se encontraba en peligro extinción, ingresaban de contrabando a China por personas que lucran con los animales silvestres, para luego ser vendidos en mercados de animales vivos. (Rabi *et al.*, 2020, Ekstrand *et al.*, 2020) (figura 2).

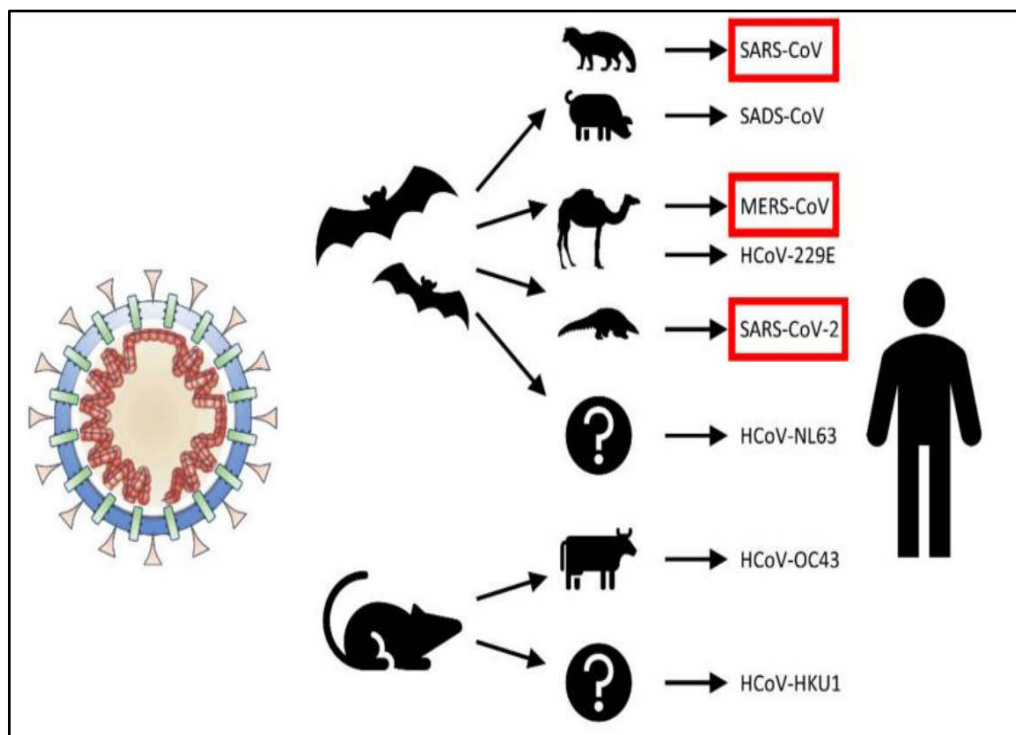


Figura 2. Procedencia de los coronavirus que afectan a los seres humanos (Rabi *et al.*, 2020).

2.4 Infección en animales

Una de las principales preocupaciones que surgió alrededor del mundo fue la participación de los animales no humanos como diseminadores de la enfermedad, ya que aparecieron reportes manifestando que los animales de compañía, de granjas y zoológicos pueden infectarse de COVID-19, presentando cuadros clínicos o subclínicos (Calvet *et al.*, 2021). La explicación de que ciertos animales se infecten se debe al polimorfismo que puede ocurrir en los genes que se encargan de codificar a los receptores en las células animales. Los dos receptores clave son la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) y la serina proteasa transmembrana 2 (TMPRSS2). Por ese motivo, hoy en día se menciona que mientras mayores son las semejanzas genéticas y moleculares de los receptores ACE2 y TMPRSS2 en una especie animal a la expresión y distribución de la misma proteína y proteasa en humanos, la probabilidad de que el animal presente signos clínicos de COVID-19 parecidos a los manifestados por humanos es mayor (Ekstrand *et al.*, 2021).

Algunos de los animales que pueden contraer el virus del SARS-CoV-2 son los hurones, gatos, perros, hámster, monos, etc. Dentro de este grupo, los gatos representan una de las mascotas más comunes en el mundo y desde el inicio de la pandemia diversos casos han sido reportados en estos animales (Dróżdż *et al.*, 2021). Hasta el 1 de mayo de 2023 el departamento de Agricultura de EE. UU ha reportado 118 casos de gatos infectados por SARS-CoV-2 (Pandit y Matthews, 2023). Se evidenció que el virus puede transmitirse entre los felinos mediante gotitas respiratorias; sin embargo, la probabilidad de transmisión a los humanos, así como entre animales es baja según el análisis genómico resultando así en un bajo impacto en la circulación del virus en la población general (Da Silva *et al.*, 2022).

Piewbang *et al.* (2022) describieron casos de gatos y perros infectados por SARS-CoV-2 en Tailandia. Se investigó la presencia de SARS-CoV-2 en 863 animales, de los cuales 639 eran gatos y 224 perros, estos pertenecían a albergues, fueron internados o atendidos en clínicas veterinarias. Los resultados demostraron que 23 muestras (19 gatos y 4 perros) fueron positivas para SARS-CoV-2; a partir de estas se estudiaron otros factores, uno de ellos fue la exposición a humanos infectados, ejemplo de estos es el caso de un gato positivo, su historial inició con su hospitalización en una clínica veterinaria por enfermedad renal crónica, la enfermera veterinaria quien era encargada tuvo fiebre y síntomas respiratorios, días después él empezó a estornudar, toser, etc. La enfermera fue

hospitalizada y otros cuidadores que no tuvieron contacto con ella, se hicieron cargo de los pacientes hospitalizados, con el pasar de los días otros dos gatos que convivieron con el primero, empezaron a manifestar signos clínicos y días después tres cuidadores también iniciaron con sintomatología similar. La investigación concluye que es posible la transmisión del SARS-CoV-2 de humanos a animales, entre animales y de animales a humanos.

En nuestro país, Schiaffino *et al.* (2021) reportaron gatos domésticos sintomáticos positivos a SARS-CoV-2 cuyos propietarios fueron diagnosticados con COVID-19 previamente. Este estudio evaluó a cinco gatos que fueron a la clínica por signos como tos, letargia, estornudos y todos compartían el antecedente de algún familiar o propietaria había sido positivo a la COVID 19 previamente. El resultado demostró que tres de estos gatos resultaron positivos a la variante Lambda del SARS-CoV-2.

Continuando con los estudios realizados en Lima-Perú, Jara *et al.* (2021) evidenciaron la presencia de anticuerpos séricos contra el dominio de unión al receptor (RBD) del SARS-CoV-2 en felinos, quienes fueron llevados por atención médica de rutina, por signos clínicos inespecíficos que no se relacionó con cuadros respiratorios y como parte del protocolo de la consulta, indagaron que sus dueños resultaron positivos a COVID 19 semanas anteriores. En total se utilizaron 41 muestras de felinos que su promedio de edad era 12 meses. Los resultados demostraron que 7 y 13 muestras fueron positivas utilizando el valor de corte del 30 % y el 20 %, respectivamente. Debido a que los felinos del estudio no presentaban signos clínicos, los autores sugieren la posibilidad de convertirse en potenciales hospederos intermediarios del virus.

Por otro lado, en los perros hasta el 1 de mayo del 2023 se han reportado 115 casos de infección por SARS-CoV-2, de igual forma que en los gatos, estos se contagiaron por el estrecho contacto con sus dueños positivos a COVID 19 (Pandit y Matthews, 2023).

Panzerá *et al.* (2023) buscaron la presencia de SARS-CoV-2 en animales domésticos mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) empleando muestras nasofaríngeas y fecales en Uruguay. Al igual que los estudios mencionados en los felinos, los dueños de los animales de este estudio también eran positivos a COVID 19. El número de muestras fue de 39, de los cuales 24 eran caninos y 15 felinos. Estas muestras provienen de hogares en los cuales al menos una persona fue positiva al agente viral. Los resultados indicaron que 1 canino y 1 felino dieron positivos a SARS-CoV-2; en ambos casos sus dueños fueron diagnosticados 5 días antes, además se decidió evaluar la

producción de anticuerpos en los animales positivos, sin embargo, solo se detectó anticuerpos producidos frente a la infección en el felino.

Liew *et al.* (2023) evaluaron a 204 animales positivos a SARS-CoV-2 en EE. UU., de estos 109 eran felinos y 95 caninos, el 94 % tuvo cercanía con una persona positiva al virus. El tiempo que permaneció la infección fue de 15 días en el caso de felinos y 12 días en los caninos. Respecto a los signos clínicos manifestados, el 48 % mostró un cuadro clínico compatible con la infección por SARS-CoV-2, mientras que el 52 % no presentó algún signo que haya llamado la atención al dueño o veterinario al momento del muestreo. La identificación del material genético y de anticuerpos se realizó tres y cinco días posteriores a la exposición al SARS-CoV-2 respectivamente. Por este motivo, los autores respaldan la idea de que estos animales se infectaron después de exponerse con sus dueños positivos a COVID-19.

Los casos de visones infectados comenzaron luego de tener contacto cercano con humanos positivos a COVID 19, el SARS-CoV-2 se diseminó prontamente a otras granjas de visones cercanos y además de ello, se reportó la posible transmisión al humano, por ese motivo fue considerado como amenaza y en diversos países como forma de prevención se optó por eliminarlos (Sparrer *et al.*, 2023).

Con relación a los animales silvestres, se han reportado casos positivos de infección; algunos de estos son en tigres de zoológicos que tuvieron cercanía con su cuidador, quien era positivo para COVID 19, de modo que probablemente la causa del contagio de estos animales fue debido a la cercanía que mantuvieron los humanos con ellos. Posteriormente, sucedieron casos similares pero esta vez con pumas y leopardos de otros zoológicos (Sharun *et al.*, 2021).

Allender *et al.* (2022) publicaron un reporte acerca de un brote de la variante delta del SARS-CoV-2 en el zoológico Brookfield-Chicago. En total, fueron 12 los animales positivos, dentro de este grupo se encontraban tigres, leopardos, leones, coatí, binturong y el gato pescador. Las muestras evaluadas fueron heces y frotis nasales a través qRT-PCR. Algunos de los signos clínicos manifestados fueron letargia, tos y diarrea, mientras que otro grupo de animales no evidenció signos clínicos. Según la cronología, las fechas sugieren la posibilidad de transmisión de humano a animal.

Guo *et al.* (2023) en su revisión sistemática de estudios publicados en países europeos, asiáticos y EE. UU., acerca de la infección por SARS-CoV-2 en caninos y felinos, determinaron que la prevalencia molecular y serológica del SARS-CoV-2 se

encontró por debajo del 5 %, mientras que en aquellos casos en los cuales los animales tuvieron contacto con sus propietarios o personas positivas para COVID 19, aumentó a más del 10 %. Esto sugiere que el contacto cercano de personas infectadas y animales sanos es un factor de riesgo.

Hasta fines del 2022, 36 países reportaron 699 brotes en 26 especies animales diferentes; tales como felinos, caninos, gorilas, venados de cola blanca, lince, etc. (Pandit y Matthews, 2023). Por consiguiente, debido al elevado número de felinos y caninos que viven con sus dueños humanos y la probabilidad de que el agente viral infecte tanto a estos como a sus propietarios, es importante monitorear la prevalencia del SARS-CoV-2 en los animales de compañía (Guo *et al.*, 2023).

2.5 Patogenia

Para que el SARS-CoV-2 pueda ingresar a la célula hospedera es necesaria su unión al receptor de la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ECA2), seguidamente el pH disminuye, se une la membrana del endosoma y la envoltura viral, para que posteriormente la nucleocápside sea liberada en el citoplasma. Las regiones ORF1a y ORF1b del ARN del virus se comportan como un ARNm traduciendo en poliproteínas PP1a y PP1ab, las cuales luego son divididas en 16 proteínas no estructurales (Nsps) (siglas en inglés de “nonstructural proteins”) (Soto, 2020). Más adelante, estas proteínas son reorganizadas en vesículas de doble membrana y forman el complejo replicasa-transcriptasa (RTC), el cual sintetiza ARN en sentido negativo a partir de la cadena positiva; adicionalmente, producen ARNm subgenómicos; los cuales se encargarán de codificar a las proteínas estructurales S, M, E, N, así como las accesorias. Las proteínas accesorias son elaboradas en el retículo endoplasmático y luego transportadas al complejo de Golgi, lugar en el cual se ensamblan con la nucleocápside y transportadas en vesículas hacia la superficie para finalmente ser liberadas por exocitosis (Tang, 2020, Lam *et al.*, 2021) (figura 3).

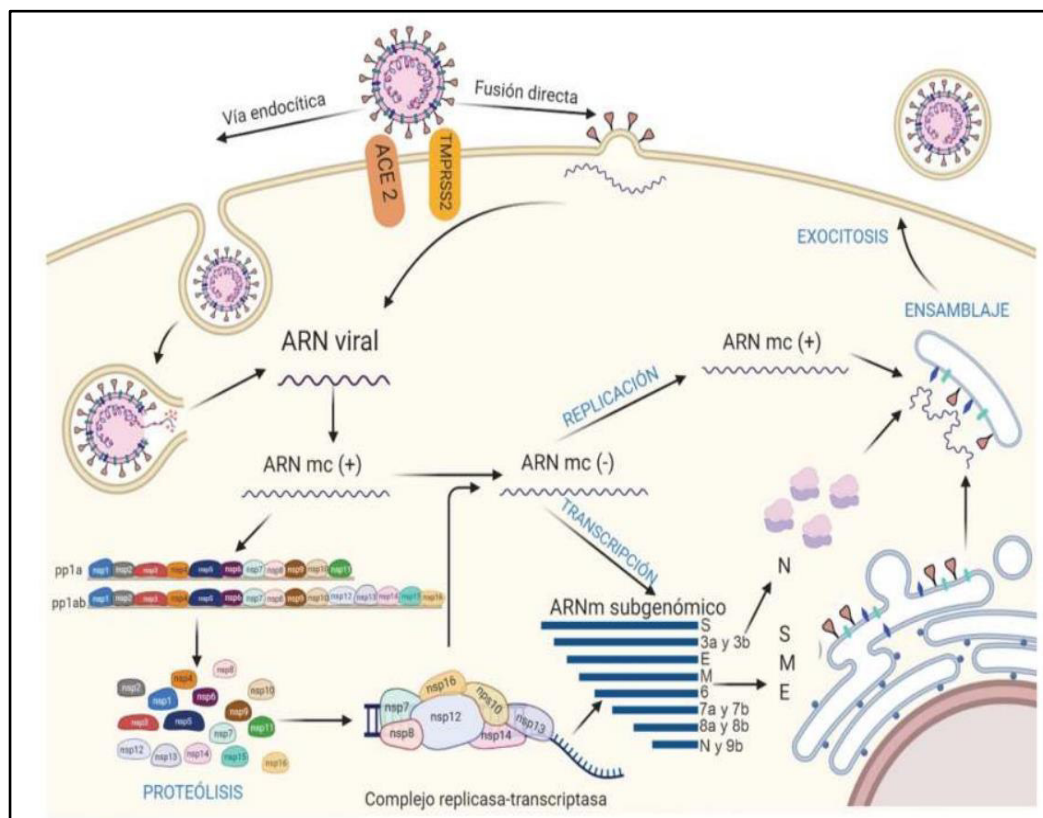


Figura 3. Mecanismo de infección del SARS-CoV-2 (Lam *et al.*, 2021).

2.6 Signos clínicos

En humanos, los síntomas característicos de la enfermedad COVID-19 incluyen fiebre, escalofríos, tos seca, cansancio y disnea. Algunas personas presentan náuseas, cefalea, dolor de garganta, dolor muscular, vómitos y diarreas. El síntoma propio que causa este agente a diferencia de los otros coronavirus patógenos es la afección intestinal. En personas inmunosuprimidas, mayores de edad o con comorbilidades se puede presentar una fuerte inflamación pulmonar seguido de una neumonía severa que desencadena una insuficiencia respiratoria y la muerte del paciente (Dhama *et al.*, 2020).

Por otro lado; en los animales se ha investigado que los signos clínicos se pueden manifestar desde una ausencia de estos hasta afecciones respiratorias y gastrointestinales en su mayoría leves y durante un corto periodo de tiempo. La mayor parte de los afectados presenta estornudos, tos, diarrea, secreción nasal e inflamación de los ganglios regionales; respecto a sus valores sanguíneos evaluados en laboratorio, no presentan anomalías significativamente asociadas (Calvet *et al.*, 2021).

2.7 Diagnóstico

El diagnóstico se convirtió en una herramienta fundamental durante la pandemia a causa de la COVID-19; ha permitido conocer el número de casos de personas afectadas, para luego tomar las medidas sanitarias correspondientes con el objetivo de evitar su propagación (Yuce *et al.*, 2021).

Si bien al inicio de la pandemia existió confusión y desconfianza por parte de la población acerca de estas pruebas, a medida que transcurría el tiempo esta situación fue mejorando. Hoy en día, después de casi tres años de la pandemia COVID 19, nos damos cuenta de que la identificación de personas potencialmente infectadas es fundamental para prevenir nuevas olas pandémicas. Es por ello que se ha venido trabajando en conjunto con muchos científicos y laboratorios para ir desarrollando pruebas más específicas, sensibles y fáciles de replicar (PetruzzIELLO *et al.*, 2023). En general, el presente trabajo las clasifica principalmente en tres secciones: métodos de detección de anticuerpos, antígenos y las pruebas que buscan detectar genes.

2.7.1 Métodos de detección de anticuerpos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son proteínas elaboradas por el sistema inmune en respuesta a un antígeno. Se han descrito cinco tipos: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. De este grupo, la primera que se produce en un proceso infeccioso es la IgM, mientras que la IgG es la que se encuentra con mayor frecuencia y abundancia en el suero. Algunas de las pruebas que detectan anticuerpos son los ensayos de flujo lateral y los ensayos de tipo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Yuce *et al.*, 2021).

Los ensayos serológicos son una herramienta eficaz que otorga una serie de ventajas, nos ayuda a comprender la respuesta de anticuerpos desencadenada por la infección natural y las vacunas, permite monitorizar los programas de inmunización, investiga la eficacia de las vacunas y la respuesta inmune que estas desencadenan, adicionalmente aporta datos importantes en la vigilancia epidemiológica así como en la comprensión de la cinética de anticuerpos contra COVID-19 (Dos Santos *et al.*, 2021). Por otro lado, en lo que respecta a las desventajas se ha reportado falsos positivos por la reactividad cruzada que ha presentado con el SARS-CoV y falsos negativos debido a que el tiempo en el cual el sistema inmune monta una respuesta frente al SARS-CoV-2 es aproximadamente entre una a dos semanas, por lo que los ensayos serológicos presentan

una utilidad limitada para el diagnóstico del SARS-CoV-2 en las primeras fases de la enfermedad (Sun *et al.*, 2020).

2.7.1.1 Ensayos de flujo lateral (LFA)

Los ensayos de flujo lateral (LFA) se componen de dispositivos que contienen una tira de membrana, la cual posee como mínimo una línea de control y otra de prueba, dependiendo de la prueba se puede observar hasta tres rayas, la cual indica la búsqueda de ambas inmunoglobulinas (IgG e IgM). Inmediatamente luego de colocar la muestra, se moviliza por acción capilar con el objetivo de que los anticuerpos marcados se unan a los anticuerpos de la muestra. Los resultados se interpretan de la siguiente manera: la prueba es positiva si ambas líneas se expresan en la membrana, es negativa si en caso de buscar una clase de anticuerpo o más solo se marca la línea de control y finalmente es positiva para ambas Ig si las tres franjas son coloreadas (Yuce *et al.*, 2021).

2.7.1.2 Ensayos de tipo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

ELISA emplea el concepto de unión antígeno-anticuerpo-sustrato para la detección de IgA, IgM y/o IgG específicas contra proteínas virales consideradas de elevada inmunogenicidad como la proteína S y/o N del virus (Oishee *et al.*, 2021). El procedimiento para realizar la prueba consiste en los siguientes pasos: primero se coloca el antígeno viral en las superficies de los pocillos de prueba, seguidamente se incorpora la muestra del paciente (en caso existan anticuerpos; se unirán al antígeno) y se continúa con el lavado que tiene como objetivo eliminar todo el sustrato no unido. Posteriormente, se añaden anticuerpos antihumanos secundarios marcados y se vuelve a lavar. La prueba se confirmará mediante un cambio de color leído por espectrofotómetro, el cual también indica en que concentración se encuentra el anticuerpo (Lin *et al.*, 2020).

2.7.2 Métodos de detección de antígenos

Estos métodos buscan identificar proteínas del SARS-CoV-2, de preferencia a las proteínas S y N. Dentro de esta sección se pueden encontrar los ensayos

inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunoensayos de quimioluminiscencia (CLIA) y los ensayos de flujo lateral (LFA) (Safiabadi *et al.*, 2021).

Chaimayo *et al.* (2020) en su estudio realizado en Tailandia realizaron la comparación de una prueba rápida de detección de antígeno, (kit Standard™ Q COVID-19 Ag) con la prueba de RT-PCR en tiempo real (Allplex™ 2019-nCoV Assay) para la identificación de SARS-CoV-2 en muestras respiratorias. Los resultados de la prueba rápida de detección del antígeno del SARS-CoV-2 demostraron que sensibilidad fue 98,33 % y la especificidad 98,73 %. Debido a que estos resultados son favorables, el autor menciona que es confiable usar esta prueba como ensayo de detección.

Así también, Petruzzello *et al.* (2023) evaluaron el rendimiento de un ensayo de antígeno (Lumipulse® SARS-CoV -2) como método diagnóstico en una población numerosa y sin riesgo, comparándolo con la prueba RT-PCR en tiempo real; el ensayo evaluado utiliza como diana a la proteína de la nucleocápside (N) del SARS-CoV-2 por considerarlo de alta inmunogenicidad y abundante expresión durante las primeras fases de la infección. Los resultados de esta investigación revelaron una sensibilidad del 96% y especificidad del 98% así como ser de fácil empleo, tener menor tiempo de ejecución y ser económica. A pesar de poseer diversas ventajas y de ser considerada una prueba óptima, la RT-PCR en tiempo real sigue siendo obligatoria.

2.7.3 Métodos de detección de genes

Para la detección de SARS-CoV-2 existen diversos métodos que son capaces de detectar regiones específicas de genes virales mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos como la reacción de transcripción reversa en cadena de la polimerasa (RT-PCR), reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa en tiempo real (qRT-PCR), amplificación isotérmica, etc.

Las muestras que se usan comúnmente para la identificación de la infección son del tracto respiratorio: hisopados nasofaríngeo, orofaríngeo, esputo, lavado broncoalveolar, aspirado endotraqueal, etc. (Jaquenod *et al.*, 2020).

2.7.3.1 Reacción de transcripción reversa en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

A causa de las diversas aplicaciones, así como elevada sensibilidad y especificidad la RT-PCR se ha posicionado como una técnica rutinaria y veraz para detectar coronavirus (Balboni *et al.*, 2012). Produce muchas copias de un gen objetivo, cumpliendo el siguiente proceso: ruptura de las cadenas de ADN que comprende el segmento del gen, ubicación de oligonucleótidos específicos y finalmente utilizando una polimerasa de ADN comienza la amplificación. Para la identificar al SARS-CoV-2, se transcribe el material genético de ARN a ADNc mediante transcripción reversa, para luego continuar con la PCR y la posterior lectura de resultados mediante electroforesis en gel de agarosa (Shen *et al.*, 2020).

Sin embargo, como todo método diagnóstico, presenta desventajas y una de estas es que la probabilidad de contaminación es alta debido a las técnicas del operario, manipulación de muestras, pipeteo y por otro lado se encuentra el tiempo de ejecución de la prueba, que resulta ser de varias horas (Shen *et al.*, 2020).

2.7.3.2 Reacción de transcripción reversa en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)

La qRT-PCR es el método diagnóstico Gold Standard declarado por la Organización Mundial de la Salud para detectar al SARS-CoV-2; hasta el momento existen diversos kits de esta prueba molecular, estos se diferencian según los genes diana a los cuales buscan amplificar, así como el empleo de diferentes secuencias de oligonucleótidos y sondas. Este método diagnóstico es altamente confiable, rápido de realizar y tiene la capacidad de amplificar uno o más genes diana tales como la ARN polimerasa dependiente del ARN (RdRp), secciones específicas del ORF1ab, gen de la envoltura (E), nucleocápside (N) y de la espícula (S) (Cancino *et al.*, 2020). De estos; los cuatro primeros son genes altamente conservados entre los Sarbecovirus, por esta razón se acostumbra a escogerlos como genes diana en el diseño de oligonucleótidos y sondas para el diagnóstico molecular, pero en recientes publicaciones la RdRp ha sido asociada con numerosas tasas de mutación (Li *et al.*, 2020), mientras que el gen N ha sido reconocido por elevar la sensibilidad de la prueba al momento de identificar a SARS-CoV-2, además de tener la capacidad de poder detectar la presencia del virus en un tiempo más prolongado desde la aparición de los primeros síntomas (Ong *et al.*, 2020).

Dentro de las ventajas que ofrece la qRT-PCR se encuentran la posibilidad de monitorear la amplificación del material genético en tiempo real es decir en cada ciclo de la reacción, mediante el empleo de sondas que pueden ser específicas como por ejemplo TaqMan que tiene un fluoróforo y un extintor o no específicas como SYBR Green (Oishee *et al.*, 2021). Además, esta técnica permite cuantificar la cantidad de material genético y los resultados se obtienen más rápido debido a que no es necesario correr un gel de agarosa para verificar los resultados como si se realiza en la PCR convencional (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

El procedimiento de la prueba inicia con la recolección de muestras, transporte al laboratorio para luego generar lisis de estas mediante métodos físicos, químicos o enzimáticos, posteriormente se procede con extracción del ARN con el objetivo de eliminar residuos celulares que puedan inhibir la RT-PCR (Safiabadi *et al.*, 2021). Con esto ya se puede iniciar la fase de amplificación, al igual que la PCR se debe trabajar con ADN o ADN complementario (ADNc), por lo que en el caso de virus ARN como es el SARS-CoV-2 esta prueba iniciaría con la conversión de ARN en ADNc mediante la enzima transcriptasa reversa, luego ocurre la amplificación de la muestra de ADNc por reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos de genes y sondas que emiten una señal fluorescente que es capturada por un termociclador en tiempo real. Cuando esta fluorescencia supera un umbral determinado, el ciclo en el que sucedió recibe el nombre de ciclo umbral (Safiabadi *et al.*, 2021) (figura 4).

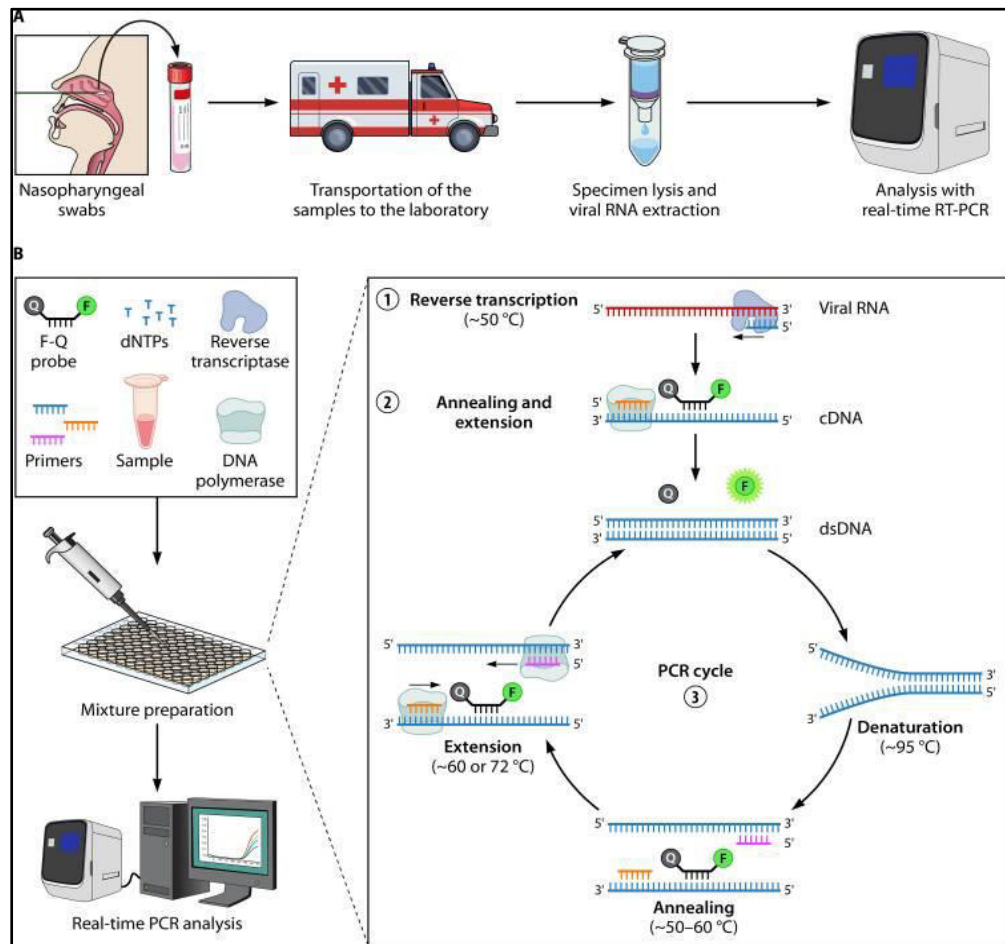


Figura 4. Diagnóstico de SARS-CoV-2 empleando qRT-PCR (Safiabadi *et al.*, 2021).

2.7.3.3 Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos

Las pruebas que involucran la amplificación isotérmica buscan una detección rápida, sencilla y rentable; no es necesario el uso de equipos cíclicos térmicos sofisticados, debido a que las reacciones se llevan a cabo bajo una temperatura constante. Estas metodologías tienen como base la desnaturalización térmica o enzimática del material genético para luego seguir con las reacciones de amplificación. Algunas de las pruebas que se encuentran en esta categoría son las siguientes: amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación de polimerasa de recombinasa (RPA), sistemas que emplean repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR) (James y Alawneh, 2020, Safiabadi *et al.*, 2021).

Las mutaciones que ocurren en el genoma del SARS-CoV-2 así como en otros virus ARN pueden afectar el rendimiento de los métodos diagnósticos que se han desarrollado para su detección (Hassan *et al.*, 2021, LeBlanc *et al.*, 2020). Estos cambios pueden suceder a partir de mutaciones puntuales, inserciones, eliminaciones o recombinación. Las variantes más relevantes son Alpha, Beta, Gamma, Delta y Ómicron (Wegrzynska *et al.*, 2022), estas se diferencian por el tiempo, lugar en el cual aparecieron y sitios donde ocurre la mutación. Si bien se encuentran circulando varias, la mayoría no es de significancia frente al SARS-CoV-2. Las mutaciones que ocurren en la proteína S son las que han angustiando en mayor medida a los investigadores ya que los epítomos de la glicoproteína S son objetivos importantes para las vacunas actuales (Kramer *et al.*, 2020). Algunas consecuencias de estas mutaciones son las siguientes: modificación de la unión a los receptores de la célula hospedera, incremento en la tasa de infectividad, mayores complicaciones durante la hospitalización, errores en el diagnóstico, etc. (Wegrzynska *et al.*, 2022).

El estudiar continuamente las secuencias del SARS-CoV-2 permite garantizar la detección específica del virus, además nos brinda información acerca de la influencia de estos cambios en la diseminación o severidad de la enfermedad, eficacia de vacunas y de tratamientos instaurados (Safiabadi *et al.*, 2021).

2.8 Tratamiento

Pese a que se han investigado muchos tratamientos desde que la pandemia comenzó, una cantidad limitada de medicamentos se ha aprobado para el tratamiento de COVID-19. Algunas de las recomendaciones basadas en evidencia para la terapéutica de la COVID-19 son el uso de fármacos inmunomoduladores, con el propósito de combatir los efectos asociados con el síndrome de tormenta de citoquinas, corticosteroides sistémicos, drogas como remdesivir, anticuerpos monoclonales la proteína S del SARS-CoV-2, etc. (Da Silva *et al.*, 2022).

2.9 Control y Prevención

Al inicio de la pandemia, los países de diversas regiones ejecutaron rigurosas medidas de mitigación, como parte de estas se incluía la declaración de estados de emergencia, instaurar cuarentenas nacionales, evitar la aglomeración en espacios públicos, detección temprana mediante monitoreo, aislamiento preventivo en caso sea sospechoso, mejora de las instalaciones médicas, así como portar equipo de bioseguridad adecuado (Dhama *et al.*, 2020).

Así como en otras enfermedades, la vacunación es el eje principal en lo que respecta a la prevención, por ello desde que la OMS declaró pandemia a la COVID 19, laboratorios e investigadores se pusieron a trabajar en el desarrollo de estas. Las vacunas actualmente aprobadas se basan en subunidades de proteínas, virus inactivados, vectores virales no replicados, ARN, ADN o partículas similares a virus (Da Silva *et al.*, 2022). La mayoría de las vacunas presentan una efectividad mayor al 70% frente a la enfermedad cumpliendo el cronograma de vacunación completa hasta seis meses después de la inmunización (Da Silva *et al.*, 2022).

Con relación a las infecciones de animales domésticos, ya que hasta el momento solo se ha reportado la transmisión humano-animal, se recomienda mantener cuidados de higiene, distanciamiento con otras personas y animales para evitar la propagación del virus (Yuce *et al.*, 2021).

Lamentablemente, a pesar de lo anterior mencionado, es posible que, en un futuro cercano, aparezcan nuevos coronavirus debido a su extensa distribución, diversidad genética, recombinación frecuente de sus genomas, y las actividades de interconexión humano-animal (Zhu *et al.*, 2020).

2.10 Limitaciones y desafíos

La COVID-19 generó vacíos de información en muchos aspectos, uno de ellos es en la comprensión del papel de los vertebrados en la transmisión de la enfermedad.

El SARS-CoV-2 tuvo su origen en animales salvajes y se transmitió a los humanos debido a que existen ciertas condiciones que otorgan la capacidad a los agentes patógenos de cruzar la barrera animal-humano; por ejemplo, la invasión de actividades humanas a las áreas silvestres que conlleva a desórdenes ecológicos o el tráfico ilegal de animales, esto se debe principalmente a la demanda por parte de las personas ya sea para consumo,

uso medicinal, artesanal, etc. Lo mencionado nos pone frente al desafío de hacer concientizar a las personas sobre esta problemática (Volpato *et al.*, 2020).

Otro desafío que se ha presentado en muchos países son las diferentes oleadas de COVID-19, originada en la mayoría de casos por nuevos coronavirus, lo que repercute en la continuidad de la enfermedad, tasas de morbilidad, mortalidad (Wegrzynska *et al.*, 2022); así como en la eficacia de las vacunas, debido a que la mayoría de estas vacunas se han fabricado sobre la base de la cepa Wuhan-Hu-1, y su efectividad es menor frente a los coronavirus emergentes. Esto sugiere la reevaluación de las vacunas con el objetivo de otorgar una protección óptima (Da Silva *et al.*, 2022).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar y periodo de ejecución

El estudio se realizó desde el mes de abril del 2022 hasta mayo del 2023, para lo cual se usó softwares de bioinformática para el diseño *in silico* de oligonucleótidos y sondas. El procesamiento y análisis de las pruebas RT-PCR y qRT-PCR se desarrolló en el Laboratorio Microbiología y Parasitología, sección Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en la región de Lima - Perú.

3.2 Diseño de oligonucleótidos y sondas TaqMan

Para realizar este trabajo, el diseño de los oligonucleótidos y sondas de hidrólisis TaqMan son fundamentales, por lo que se creó un archivo FASTA con 40 secuencias de nucleótidos del gen N de los diferentes géneros y especies de CoVs que infectan humanos y animales, tomando énfasis en las especies SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 para su posterior análisis. Si bien el SARS-CoV-1 es un virus distinto al SARS-CoV-2, se decidió considerarlo en el alineamiento debido a que presenta una similitud de aproximadamente 79.5% al compararlo con el SARS-CoV-2 y porque al inició de la pandemia hubo dificultad para poder diferenciarlos en pacientes con signos clínicos en Asia. De esta manera, al alinear esta secuencia junto a las otras, demostramos que la región escogida para el diseño de oligonucleótidos y sondas no se encuentra dentro de esta identidad, por ende, es capaz de predecir la diferenciación de ambos virus.

Las secuencias se alinearon para determinar las regiones conservadas y variables del gen de la nucleocápside (N). Para el diseño correspondiente de nuestros oligonucleótidos utilizamos el programa PrimerSelect del paquete bioinformático DNASTAR (Lasergene, EE. UU., versión 7) (Figuras 5, 6 y 7) (Anexos 1 al 6). Una vez diseñados fueron sometidos a un alineamiento múltiple contra el banco de secuencias del GenBank utilizando el programa BLAST [www.ncbi.nlm.gov/BLAST], y se seleccionaron los oligonucleótidos que solo se unen al segmento del gen N y que amplifican un producto no mayor a 200 pb para que pueda ser sensible en una PCR de punto final y también pueda ser utilizada en una PCR de tiempo real.

Algunos de los criterios que se cumplieron para el diseño de oligonucleótidos en PCR en tiempo real son los siguientes (Gunson *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2020):

- Los oligonucleótidos tuvieron entre 18 a 30 bases, mantuvieron su temperatura de fusión en el rango de 58°C a 60°C, con una diferencia < 2°C entre los oligonucleótidos. En el terminal 3', los cinco últimos nucleótidos no presentan más de dos guaninas (G) o citosinas (C) y evitan terminar con timina (T). Se tuvo 30-80% GC (ideal 40-60%).
- La sonda contó con 18 a 30 bases, mantuvo una temperatura de fusión entre 7°C a 10°C sobre la T_m de los oligonucleótidos (65°C a 70°C). El contenido de G+C se mantuvo entre 30–80% (ideal 40-60%), evitando una G en el extremo 5'.
- El amplicón estuvo constituido entre 50 a 150 pb (hasta 300 pb). El porcentaje de GC se debe encontrar entre 30– 80% GC (ideal 40-60%).

3.2.1 Distancia genética

La distancia genética entre las secuencias de nucleótidos del gen N de humanos, perros y gatos positivos a SARS-CoV-2 así como humanos positivos a SARS-CoV-1, se analizó empleando el software MegAlign del paquete bioinformático Lasergene DNASTAR (figura 8).

3.2.2 Evaluación de oligonucleótidos

Para realizar la estandarización de los oligonucleótidos seleccionados, primero se calculó la media de las temperaturas de fusión del oligonucleótido Forward ($T_m=57.7^\circ\text{C}$) y Reverse ($T_m=59.1^\circ\text{C}$), resultando 58.4°C (Cuadro 2). Esto se realizó con el objetivo de seleccionar la temperatura de alineamiento (alignment), evaluando cinco temperaturas en total, dos temperaturas menores y dos mayores a la media respectivamente: 53°C , 55°C , 58°C , 60°C y 63°C .

La primera evaluación se realizó mediante RT-PCR convencional, para ello se empleó el kit a GoTaq® Green Máster Mix (Promega). Primero, se tomó 1 μL del control positivo (200,000 copias/ μL), y adicionó 24 μL del siguiente mix: 10.5 μL de agua libre de nucleasas, 12.5 μL de Máster Mix Green 2X, 0.5 μL del oligonucleótido Forward N (10 μM) y 0.5 μL del oligonucleótido Reverso N (10 μM). Las amplificaciones se realizaron en el termociclador modelo T100™ (BIO-RAD). El ciclo de la PCR está descrito en el cuadro 2.

Todas las temperaturas evaluadas mostraron una banda fluorescente, se escogió la temperatura de 58°C , debido a que cuando se probaron temperaturas mayores, la intensidad de las bandas disminuyó y cuando se sometió a evaluación las temperaturas inferiores, se observó presencia de productos inespecíficas en la corrida mediante gel de electroforesis (Figura 9). Por ende, señalamos que no se debe escoger la temperatura promedio como única alternativa para definirla como temperatura de alineamiento, si no que deben ser evaluadas cada una para poder definir con cual de ellas se obtienen los mejores resultados.

Para determinar el número de copias que se pueden detectar con el método diagnóstico, se realizaron diluciones del control positivo que contiene 200,000 copias/ μL , obteniéndose las siguientes diluciones: 100,000; 50,000; 25,000; 12,500; 5,000; 2000; 200, 20 y 2 copias/ μL . Los productos de PCR se corrieron mediante electroforesis en gel agarosa al 1.5 %. Se observaron los resultados en el gel mediante el transiluminador con luz ultravioleta (Figura 10). Se confirmó que 58°C es la mejor T_m para este set de oligonucleótidos.

Sequence Name	< Pos = 1	< Pos = 109
<input checked="" type="checkbox"/> Consensus 18 Sequences	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG 10 20 30 40 50 60	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC 110 120 130
MN908947.3-SARS-CoV-2-HUMANO-CHINA	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MT270814.1-SARS-CoV-2-PERRO-HONG K	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MT747438.1-SARS-CoV-2-GATO-BELGICA	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MW064263.1-SARS-CoV-2-GATO-CHILE.s	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MW263336.1-SARS-CoV-2-PERRO-EEUU.s	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MW856303.1-SARS-CoV-2-GATO-EEUU.se	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ317675.1-SARS-CoV-2-GATO-ALEMANI	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ396818.2-SARS-CoV-2-PERRO-TAILAN	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ401455.1-SARS-CoV-2-GATO-TAILAND	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ902033.1-SARS-CoV-2-GATO ESPA-A.	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ902042.1-SARS-CoV-2-PERRO-ESPA-A	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ914594.1-SARS-CoV-2-PERRO-ESPA-A	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
NC_045512.2-SARS-CoV-2-HUMANO-CHIN	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
OK555092.4-SARS-CoV-2-BETACoV-GATO	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
OM966899.1-SARS-CoV-2-PERRO-URUGUA	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
OM966900.1-SARS-CoV-2-GATO-URUGUAY	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
ON248600.1-SARS-CoV-2-PERRO-INDIA.	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC AAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAAACGAACTTCTCCTG	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
qPCR.1F (561-585).seq	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC	

Figura 5. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen N en perros, gatos y humanos positivos a SARS-CoV-2 para identificar la unión del oligonucleótido Forward, empleando el programa MegAlign del software DNASTAR (Lasergene, USA).

Sequence Name	< Pos = 75	< Pos = 109
<input checked="" type="checkbox"/> Consensus 18 Sequences	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC 80 90 100 110 120 130	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC 110 120 130
MN908947.3-SARS-CoV-2-HUMANO-CHINA	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MT270814.1-SARS-CoV-2-PERRO-HONG K	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MT747438.1-SARS-CoV-2-GATO-BELGICA	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MW064263.1-SARS-CoV-2-GATO-CHILE.s	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MW263336.1-SARS-CoV-2-PERRO-EEUU.s	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MW856303.1-SARS-CoV-2-GATO-EEUU.se	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ317675.1-SARS-CoV-2-GATO-ALEMANI	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ396818.2-SARS-CoV-2-PERRO-TAILAN	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ401455.1-SARS-CoV-2-GATO-TAILAND	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ902033.1-SARS-CoV-2-GATO ESPA-A.	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ902042.1-SARS-CoV-2-PERRO-ESPA-A	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ914594.1-SARS-CoV-2-PERRO-ESPA-A	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
NC_045512.2-SARS-CoV-2-HUMANO-CHIN	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
OK555092.4-SARS-CoV-2-BETACoV-GATO	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
OM966899.1-SARS-CoV-2-PERRO-URUGUA	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
OM966900.1-SARS-CoV-2-GATO-URUGUAY	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
ON248600.1-SARS-CoV-2-PERRO-INDIA.	CTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
qPCR.1R.RC (672-696).seq	-----TGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC	-----TGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC

Figura 6. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen N en perros, gatos y humanos positivos a SARS-CoV-2 para identificar la unión del oligonucleótido Reverse, empleando el programa MegAlign del software DNASTAR (Lasergene, USA).

Sequence Name	Pos = 66	Pos = 110
<input checked="" type="checkbox"/> Consensus	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
18 Sequences	60 70 80 90 100 110 120	10 120 130
MN908947.3-SARS-CoV-2-HUMANO-CHINA.	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MT270814.1-SARS-CoV-2-PERRO-HONG KO	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MT747438.1-SARS-CoV-2-GATO-BELGICA.	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MW064263.1-SARS-CoV-2-GATO-CHILE.se	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MW263336.1-SARS-CoV-2-PERRO-EEUU.se	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MW856303.1-SARS-CoV-2-GATO-EEUU.seq	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ317675.1-SARS-CoV-2-GATO-ALEMANIA	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ396818.2-SARS-CoV-2-PERRO-TAILAND	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ401455.1-SARS-CoV-2-GATO-TAILANDI	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ902033.1-SARS-CoV-2-GATO ESPA-A.s	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ902042.1-SARS-CoV-2-PERRO-ESPA-A.	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
MZ914594.1-SARS-CoV-2-PERRO-ESPA-A.	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
NC_045512.2-SARS-CoV-2-HUMANO-CHINA	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
OK555092.4-SARS-CoV-2-BETACoV-GATO-	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
OM966899.1-SARS-CoV-2-PERRO-URUGUAY	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
OM966900.1-SARS-CoV-2-GATO-URUGUAY.	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
ON248600.1-SARS-CoV-2-PERRO-INDIA.s	TCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	CTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
PROBE (637-665).seq	-----AATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT	

Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen N en perros, gatos y humanos positivos a SARS-CoV-2 para identificar la unión de la sonda, empleando el programa MegAlign del software DNASTAR (Lasergene, USA).

Pair Distances of Untitled ClustalW (Slow/Accurate, IUB)																											
Percent Identity																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		
Divergence	1	96.3	88.8	88.6	88.8	88.6	88.7	88.7	88.2	88.2	88.2	88.2	88.8	88.8	88.2	100.0	88.8	88.5	88.4	88.6	88.6	88.5	88.5	88.4	88.4	1	AY304488 - SARS-CoV-1-CIVETA-CHINA.seq
	2	3.8	88.3	88.1	88.3	88.1	88.2	88.2	87.7	87.8	88.3	88.3	87.8	96.3	88.3	88.0	87.9	88.1	88.1	88.0	88.0	88.0	87.9	88.0	87.9	2	DQ022305 - SARS-CoV-1-MURCIELAGO.seq
	3	12.2	12.8	99.8	100.0	99.8	99.9	99.8	99.4	99.4	99.4	100.0	100.0	99.4	88.8	100.0	99.7	99.6	99.8	99.8	99.8	99.7	99.7	99.4	99.4	3	MN908947.3 - SARS-CoV-2-HUMANO-CHINA.se
	4	12.5	13.1	0.2	99.8	100.0	100.0	99.7	99.6	99.6	99.7	99.7	99.8	99.7	88.6	99.8	99.5	99.4	100.0	100.0	99.6	99.5	99.5	99.7	99.4	4	MT270814.1-SARS-CoV-2-PERRO-HONG KONG.s
	5	12.2	12.8	0.0	0.2	99.8	99.8	99.9	99.8	99.4	99.4	99.4	100.0	100.0	99.4	88.8	100.0	99.7	99.6	99.8	99.8	99.8	99.7	99.7	99.4	5	MT747438.1-SARS-CoV-2-GATO-BELGICA.seq
	6	12.5	13.1	0.2	0.0	0.2	100.0	99.7	99.6	99.6	99.7	99.7	99.8	99.7	88.6	99.8	99.5	99.4	100.0	100.0	99.6	99.5	99.5	99.7	99.6	6	MW064263.1-SARS-CoV-2-GATO-CHILE.seq
	7	12.5	13.1	0.2	0.0	0.2	0.0	99.7	99.6	99.6	99.7	99.7	99.8	99.7	88.6	99.8	99.5	99.4	100.0	100.0	99.6	99.5	99.5	99.7	99.7	7	MW263336.1-SARS-CoV-2-PERRO-EEUU.seq
	8	12.3	12.9	0.1	0.3	0.1	0.3	0.3	99.8	99.3	99.4	99.4	99.9	99.9	99.4	88.7	99.9	99.6	99.5	99.7	99.7	99.7	99.6	99.6	99.4	8	MW397523.1-SARS-CoV-2-PERRO-ITALIA.seq
	9	12.3	12.9	0.2	0.4	0.2	0.4	0.4	0.2	99.2	99.3	99.3	99.8	99.8	88.7	99.8	99.5	99.4	99.6	99.6	99.6	99.5	99.5	99.3	99.3	9	MW856303.1-SARS-CoV-2-GATO-EEUU.seq
	10	13.0	13.5	0.6	0.4	0.6	0.4	0.4	0.7	0.8	99.9	99.9	99.4	99.4	99.9	88.2	99.4	99.1	99.0	99.6	99.6	99.2	99.1	99.1	99.3	10	MZ317675.1-SARS-CoV-2-GATO-ALEMANIA.seq
	11	12.9	13.4	0.6	0.3	0.6	0.3	0.3	0.6	0.7	0.1	100.0	99.4	99.4	100.0	88.2	99.4	99.2	99.1	99.7	99.7	99.3	99.2	99.2	99.4	11	MZ396818.2-SARS-CoV-2-PERRO-TAILANDIA.s
	12	12.9	13.4	0.6	0.3	0.6	0.3	0.3	0.6	0.7	0.1	0.0	99.4	99.4	100.0	88.2	99.4	99.2	99.1	99.7	99.7	99.3	99.2	99.2	99.4	12	MZ401455.1-SARS-CoV-2-GATO-TAILANDIA.se
	13	12.2	12.8	0.0	0.2	0.0	0.2	0.1	0.2	0.6	0.6	0.6	100.0	99.4	88.8	100.0	99.7	99.6	99.8	99.8	99.8	99.7	99.7	99.4	99.4	13	MZ902033.1-SARS-CoV-2-GATO-ESPA-A.seq
	14	12.2	12.8	0.0	0.2	0.0	0.2	0.1	0.2	0.6	0.6	0.6	0.0	99.4	88.8	100.0	99.7	99.6	99.8	99.8	99.8	99.7	99.7	99.4	99.4	14	MZ902042.1-SARS-CoV-2-V-PERRO-ESPA-A.se
	15	12.9	13.4	0.6	0.3	0.6	0.3	0.3	0.6	0.7	0.1	0.0	0.6	0.6	88.2	99.4	99.2	99.1	99.7	99.7	99.3	99.2	99.2	99.4	99.4	15	MZ914594.1-SARS-CoV-2-PERRO-ESPA-A.seq
	16	0.0	3.8	12.2	12.5	12.2	12.5	12.3	12.3	13.0	12.9	12.9	12.2	12.2	12.9	88.8	88.5	88.4	88.6	88.6	88.6	88.5	88.5	88.4	88.4	16	NC_004718.3 - SARS-CoV-1-HUMANO-TORONTO
	17	12.2	12.8	0.0	0.2	0.0	0.2	0.1	0.2	0.6	0.6	0.6	0.0	0.6	12.2	99.7	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	99.7	99.4	99.4	17	NC_045512.2 - SARS-CoV-2 -HUMANO-CHINA
	18	12.6	13.2	0.3	0.5	0.3	0.5	0.4	0.5	0.9	0.8	0.8	0.3	0.3	0.8	12.6	0.3	99.8	99.5	99.5	99.9	100.0	100.0	99.2	99.2	18	OK174326.1-SARS-CoV-2-PERRO-EEUU.seq
	19	12.7	13.3	0.4	0.6	0.4	0.6	0.5	0.6	1.0	0.9	0.9	0.4	0.4	0.9	12.7	0.4	0.2	99.4	99.4	99.8	99.8	99.8	99.1	99.1	19	OK555092.4-SARS-CoV-2-GATO-TAILANDIA.se
	20	12.5	13.1	0.2	0.0	0.2	0.0	0.3	0.4	0.4	0.3	0.2	0.2	0.3	12.5	0.2	0.5	0.6	100.0	99.6	99.5	99.5	99.7	99.7	99.7	20	OM966899.1-SARS-CoV-2-PERRO-URUGUAY.seq
	21	12.5	13.1	0.2	0.0	0.2	0.0	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	0.3	12.5	0.2	0.5	0.6	0.0	99.6	99.5	99.5	99.7	99.7	21	OM966900.1-SARS-CoV-2-GATO-URUGUAY.seq
	22	12.5	13.1	0.2	0.4	0.2	0.4	0.3	0.4	0.8	0.7	0.7	0.2	0.2	0.7	12.5	0.2	0.1	0.2	0.4	0.4	99.9	99.9	99.3	99.3	22	ON248600.1-SARS-CoV-2-PERRO-INDIA.seq
	23	12.6	13.2	0.3	0.5	0.3	0.5	0.4	0.5	0.9	0.8	0.8	0.3	0.3	0.8	12.6	0.3	0.0	0.2	0.5	0.5	0.1	100.0	99.2	99.2	23	ON982612.1-SARS-CoV-2-PERRO-SUIZA.seq
	24	12.6	13.2	0.3	0.5	0.3	0.5	0.4	0.5	0.9	0.8	0.8	0.3	0.3	0.8	12.6	0.3	0.0	0.2	0.5	0.5	0.1	0.0	99.2	99.2	24	ON982614.1-SARS-CoV-2-GATO-SUIZA.seq
	25	12.7	13.3	0.6	0.3	0.6	0.3	0.6	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	12.7	0.6	0.8	0.9	0.3	0.3	0.7	0.8	0.8	99.2	99.2	25	MZ496616.1-SARS-CoV-2-GATO-PERU.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		

Figura 8. Distancia entre las secuencias de nucleótidos del gen N de humanos, caninos y felinos positivos a SARS-CoV-2 empleando el software MegAlign.

Cuadro 1. Oligonucleótidos y sonda diseñados para amplificar un segmento del gen N del SARS-CoV-2 en este estudio. La posición de los oligonucleótidos y sonda fue determinado basado en la cepa de referencia SARS-CoV-2 / Wuhan-Hu-1 (número de acceso NC_045512.2).

Gen	Ensayo	oligonucleótidos	Secuencia de los oligonucleótidos (5' – 3')	Posición	Tamaño del producto (pb)
N	RT-PCR	Forward N Reverse N.	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC GCTCTCAAGCTGGTTCAATCTGTCA	(561-585) (672-696)	138
	qRT-PCR	Forward N Reverse N. Sonda	CTCATCACGTAGTCGCAACAGTTC GCTCTCAAGCTGGTTCAATCTGTCA FAMAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT-BHQ	(561-585) (672-696) (637-665)	138

Cuadro 2. Perfil del ciclo térmico para determinar la Temperatura de alineamiento ideal para la RT- PCR de SARS-CoV-2.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos
Desnaturalización	45 ciclos X	94°C 40 segundos
Hibridación		72°C 40 segundos
Elongación		72°C 40 segundos
Extensión final	72°C	5 minutos

X = temperaturas utilizadas 53°C, 55°C, 58°C, 60°C y 63°C.

3.3 Controles

Control positivo

Como control positivo se usó ADN sintético que contiene el gen N completo de la cepa SARS-CoV-2 / Wuhan-Hu-1 (Catalogo: 10006625_2019-nCoV N Positive Control) que es usado como control positivo en los diversos kits comerciales para detección de SARS-CoV-2. Este control es distribuido por la empresa IDTdna (EE. UU.) y los suministran a una concentración de 200.000 copias/ μ L.

Control negativo

Como controles negativos se utilizaron diversas especies de coronavirus pertenecientes a los géneros α -CoV, β -CoV, γ -CoV y δ -CoV aislados de porcinos (PEDV, DeltaCoV porcino), camélidos (AlpCoV) y aves (IBV) pertenecientes al Laboratorio de Inmunología y Virología Veterinaria de la FMV-UNMSM. Además, se empleó agua libre de nucleasas como control sin templado.

3.4 Sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del ensayo

La sensibilidad fue evaluada utilizando diluciones seriadas en base 10 del control positivo sintético (200,000 copias/ μ L del gen N) para determinar el mínimo y máximo de copias por muestra que puede detectar los protocolos de PCR y qPCR obtenidos por triplicado, utilizando los protocolos descritos en los ítems 3.5.1.3 y 3.5.3.1. Se realizaron seis diluciones del control positivo sintético del gen N conteniendo: 2, 20, 200, 2000, 20000 y 200000 copias por reacción.

La especificidad de los oligonucleótidos se determinó mediante RT-PCR y qRT-PCR, la no amplificación y fluorescencia de los controles negativos confirmara la especificidad de nuestros oligonucleótidos y sonda.

En lo que respecta a la reproducibilidad del ensayo, fue evaluado utilizando diversos masters mix comerciales de PCR y qPCR, así como usando de las diferentes marcas y modelos de termocicladores (T100 y CFX96 real time system de BIO-RAD y qTower 2.2 de Analytikjena) que tienen los Laboratorios de Microbiología y Parasitología, sección Inmunología de la FMV. Los protocolos utilizados se describen a continuación en los ítems 3.5.1.3 y 3.5.3.1.

3.5 Validación de protocolos de PCR y qRT-PCR

Se comparó los diferentes resultados de diagnóstico de PCR y qRT-PCR del estudio con el resultado de un kit comercial de qRT-PCR (219-nCoV RUO Kit, catalogo N° 10006713; IDTdna) recomendado por la CDC que usa el mismo control positivo sintético que nuestro estudio. De esta manera evaluamos si nuestra prueba consigue igualar la eficiencia del kit comercial o si es inferior a este, así como si nuestra metodología agiliza el proceso de trabajo del laboratorio. Al obtener todos los protocolos estandarizados probamos los distintos masters mix comerciales y enzimas de transcripción reversa para obtener los mismos resultados.

3.5.1 Evaluación del KIT diseñado empleando muestras biológicas de perros y gatos positivas a SARS-CoV-2 mediante RT-PCR punto final

3.5.1.1 Extracción de ARN viral

Para la extracción del material genético de las heces, se siguió el protocolo KIT SV Total RNA Isolation System (Promega) según las instrucciones del fabricante.

Primero se colocó 150 µL del sobrenadante de la muestra clarificada en un tubo eppendorf de 1.5ml, se adicionó 175 µL de la solución de RNA lysis buffer preparada e invertimos de 3-4 veces, luego se añadió 350 µL de RNA Dilution buffer y se invierte, esto se llevó al bloque térmico a 70°C por 3 minutos y se centrifugó a 14000 xg por 10 minutos a 20-25°C.

A continuación se retiró la parte clarificada y se llevó a un nuevo tubo de microcentrífuga (aproximadamente 500 µL), se añadió 200 µL de etanol al 95% al lisado clarificado y se mezcló pipeteando 3-4 veces, seguidamente se transfiere esta mezcla a la columna de spin y es centrifugada a 14000 g por 60 segundos, luego se tomó la canasta de spin de vuelta y se desechó el líquido en el tubo de colección, se volvió a introducir la canasta en el tubo, se añadió 600 µL de solución de lavado de ARN a la columna de spin y es centrifugada a 14000 g por 60 segundos

Seguidamente se vació el tubo colector y posicionó en un rack, luego se aplicó 50ul de la mezcla de incubación dentro de la cesta de centrifugación, asegurándonos que tengan contacto, posteriormente se incubó durante 15 minutos a 20-25°C, se añadió 200

μL de solución de parada de DNasa a la cesta de centrifugación y se centrifugó a 14000 durante 1 minuto.

Luego, se añadió 600 μL de solución de lavado y centrifugamos a 14000 g por 1 minuto, vaciamos el tubo y volvimos a añadir 250 μL de solución de lavado, para centrifugar por 2 minutos.

Después de esto, retiramos la tapa mediante un movimiento de torsión y para cada muestra usamos un tubo de elución de 1.5ml, transferimos el tubo de colección al tubo de elución y añadimos 100 μL de agua libre de nucleasas a la membrana, colocamos los conjuntos de canastas en la centrifugadora durante 1 minuto.

Finalmente, retiramos la cesta de centrifugado, lo desechamos y taponamos el tubo de elución que contiene el ARN purificado y almacenamos a -70°C .

3.5.1.2 Transcripción reversa (RT)

Se realizó este proceso para obtener ADN complementario (cDNA) a partir de ARN, para esto se empleó el kit GoScript™ Reverse Transcription System, cumpliendo lo establecido por el fabricante.

Primero se tomó 5 μL de RNA y se continuó con la denaturación a 95°C durante 5 minutos en el termociclador, apenas terminó dejamos enfriar la muestra a 4°C por lo menos 5 minutos, paralelamente se fue preparando el máster mix de transcripción reversa (RT).

El máster mix tuvo 0.4 μL de agua libre de nucleasas, 2 μL de la enzima concentrada 5X, 1.2 μL de cloruro de magnesio a 25 mM, 0.6 μL de dNTP a 10 mM, 0.4 μL del oligonucleótido gen N-Reverso (10 μL) y 0.4 μL de la enzima reversa por muestra.

Posteriormente, se añadió 5 μL del master mix a cada tubo con el ARN desnaturado, para luego homogenizar y colocar en el termociclador (modelo T100™ BIO-RAD) programando las siguientes temperaturas: hibridación a 25°C por 5 minutos, transcripción reversa a 42°C por 60 minutos y estocado a 4°C .

3.5.1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Con el ADNc se ejecutó la PCR para amplificar un fragmento conservado del gen N. Se emplearon los oligonucleótidos descritos en el cuadro 1. Para esta reacción de PCR se

utilizó el kit a GoTaq® Green Máster Mix (Promega). Primero se tomó 5 µL del ADNc obtenido y se añadió 20µL del siguiente mix: 6.5 µL de agua libre de nucleasas, 12.5 µL de Máster mix Green 2X, 0.5 µL del oligonucleótidos Forward N (10 µM) y 0.5 µL del oligonucleótido Reverso N (10 µM). Las amplificaciones se realizaron en el termociclador modelo T100™ (BIO-RAD). A continuación, en el cuadro se describe el ciclo de la PCR.

Cuadro 3. Perfil del ciclo térmico para la RT- PCR de SARS-CoV-2.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos
Desnaturalización	45 ciclos	94°C
Hibridación		58°C
Elongación		72°C
Extensión final	72°C	5 minutos

3.5.1.4 Electroforesis en gel de agarosa

El análisis de los productos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Para preparar el gel, se empleó 2 gramos de agarosa y 100 ml de tampón TBE; después de mezclarlos se llevó al horno microondas para su calentamiento, se retiró y mientras se dejaba enfriar se añadió 5 µL de bromuro de etidio. Luego se colocó en la bandeja hasta que tomó la consistencia de gel; una vez obtenido este, se añadió 5 µL de cada muestra y se sometió a electroforesis a 90 V por 3 horas. Cuando terminó, se utilizó el transiluminador con luz ultravioleta para observar el gel y se tomaron fotografías para guardar las evidencias. El tamaño del fragmento esperado (138 pb) se estimó por comparación con un patrón de tamaño molecular de 50 pares de bases (pb).

3.5.2 Evaluación del KIT Ruo2019-nCoV (IDTdna) CDC mediante qRT-PCR

El kit diagnóstico de qRT-PCR de la CDC 2019-nCoV detecta y diagnóstica al SARS-CoV-2. El producto contiene sus oligonucleótidos seleccionados, sondas de hidrólisis TaqMan y material de control.

Después de extraer el ARN, pasa por el proceso de retrotranscripción y, seguidamente, se amplifica en el termociclador Bio-Rad CFX96. Durante esta fase; la sonda se une a un fragmento diana ubicada entre los oligonucleótidos forward y reverse, en el transcurso de la fase de extensión, la Taq polimerasa degrada la sonda, generando la separación entre el colorante informador y extintor, desencadenando así la señal fluorescente. Debido a que este proceso se va repitiendo en cada ciclo, se incrementa la intensidad de fluorescencia, la cual es capturada por la PCR en tiempo real (CDC, 2020b).

3.5.2.1 Evaluación del KIT CDC empleando diluciones del control positivo plasmídico mediante qRT-PCR

Para la ejecución de la prueba se utilizaron las diluciones del control positivo sintético del gen N: 2, 20, 200, 2000, 20000 y 200000 copias.

Se empleó el máster mix de Promega GoTaq® Probe One-Step qRT-PCR System (Promega, 2023) para esto se inició separando 5µL de ARN negativo a SARS-CoV-2 así como de las diluciones mencionadas y luego se añadió 15 µL del siguiente mix: 3.1 µL de agua libre de nucleasas, 1.5µL de mezcla combinada de cebador/sonda, 10 µL Master Mix, 0.4 µL de la enzima RT. Cuando se trabaja con los controles positivos diluidos tomamos 1µL de la dilución agregando 19 µL de master mix, siendo el agua libre de nucleasas el único componente que cambia el volumen a 7.1 µL. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. El tiempo de ejecución de la prueba en el termociclador fue de 1 hora con 18 minutos. A continuación, en el cuadro se describe el ciclo de la PCR.

Cuadro 4. Perfil del ciclo térmico para la qRT-PCR del kit de CDC, utilizando diluciones del control positivo sintético del gen N del SARS-CoV-2 (CDC, 2020b).

Fase	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	45°C	15 minutos
Inactivación de la transcriptasa reversa y activación de GoTaq® DNA polimerasa	95°C	2 minutos
Desnaturalización	44 ciclos } 95°C 55°C	3 segundos
Alineamiento y extensión		30 segundos

3.5.2.2. Evaluación del KIT CDC mediante qRT-PCR empleando muestras positivas a SARS-CoV-2

Para la ejecución de la prueba se utilizaron muestras de animales positivos a SARS-CoV-2, controles negativos y el gen N sintético (2000 copias) como control positivo.

Se empleó el máster mix de Promega GoTaq® Probe One-Step qRT-PCR System, para esto se inició separando 5µL de RNA y luego se añadió 15 µL del siguiente mix: 3.1µL de agua libre de nucleasas, 1.5µL de mezcla combinada de cebador/sonda, 10 µl Master Mix, 0.4 µL de la enzima RT. El tiempo de ejecución de la prueba en el termociclador fue de 1 hora con 18 minutos. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. El ciclo de la PCR es el mismo descrito en el cuadro 4.

3.5.3 Evaluación del KIT diseñado mediante qRT-PCR

3.5.3.1 Evaluación del KIT diseñado empleando diluciones del control positivo mediante qRT-PCR

Se empleó el máster mix de GoTaq® Probe One-Step qRT-PCR System, para esto se inició separando 5µL de RNA y luego se añadió 15 µL del siguiente mix: 3.9 uL de agua libre de nucleasas, 10 µL de Máster mix, 0.4 µL de la enzima RT, 0.25 µL del oligonucleótido Forward (10 µM), 0.25 µL del oligonucleótido Reverso (10 µM) y 0.2 µL de la sonda. El tiempo de ejecución de la prueba en el termociclador fue de 1 hora con

24 minutos. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. A continuación, en el cuadro se describe el ciclo de la PCR.

Cuadro 5. Perfil del ciclo térmico para la qRT-PCR del kit diseñado, utilizando diluciones del control positivo sintético del gen N del SARS-CoV-2.

Fase	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	45°C	15 minutos
Inactivación de la transcriptasa reversa y activación de GoTaq® DNA polimerasa	95°C	2 minutos
Desnaturalización	44 ciclos 95°C 60°C	15 segundos
Alineamiento y extensión		30 segundos

3.5.3.2 Evaluación del KIT diseñado empleando muestras positivas mediante qRT-PCR de un paso

Se empleó el máster mix de GoTaq® Probe One-Step qRT-PCR System, para esto se inició separando 5µL de RNA y luego se añadió 15 µL de la siguiente mistura: 3.9 uL de agua libre de nucleasas, 10 µL de Máster mix, 0.4 µL de la enzima RT, 0.25 µL del oligonucleótido Forward (10 µM), 0.25 µL del oligonucleótido Reverso (10 µM) y 0.2 µL de la sonda. El tiempo de ejecución de la prueba en el termociclador fue de 1 hora con 24 minutos. Las amplificaciones se realizaron en el termociclador Bio-Rad CFX96. A continuación, en el cuadro se describe el ciclo de la PCR.

Cuadro 6. Perfil del ciclo térmico para la qRT-PCR de un paso de SARS-CoV-2.

Fase	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	45°C	15 minutos
Inactivación de la transcriptasa reversa y activación de GoTaq® DNA polimerasa	95°C	2 minutos
Desnaturalización	44 ciclos 95°C 60°C	15 segundos
Alineamiento y extensión		30 segundos

IV. RESULTADOS

4.1 Distancia genética

Los resultados obtenidos demostraron gran similitud entre las secuencias nucleotídicas del gen N de animales y humanos positivos a SARS-CoV-2, con algunos cambios de pares de bases entre especies (figura 8).

4.2 Evaluación de oligonucleótidos diseñados mediante RT-PCR

Con los oligonucleótidos ya diseñados, se realizó diluciones del control positivo con el objetivo de hallar el límite de detección (LOD) de la RT-PCR. Esto fue determinado mediante la detección de bandas de 138 pb en gel de agarosa en una corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5%. Se obtuvo como resultados que el LOD de nuestro ensayo PCR convencional fue de 200 copias/ μ L (figura 10).

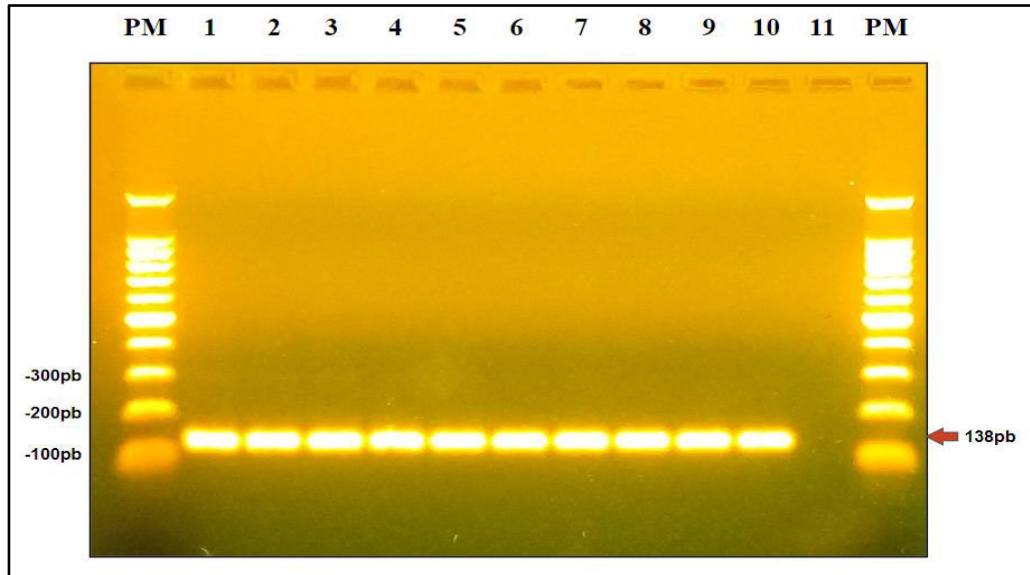


Figura 9. Resultados de la amplificación del control positivo empleando diferentes diluciones y temperaturas. Las muestras positivas tienen un peso molecular de 138 pb. PM: marcador de peso molecular. Línea 1 (C+ 200, 000 COPIAS 53°C), 2 (C+ 100, 000 COPIAS 53°C), 3 (C+ 200, 000 COPIAS 55°C), 4 (C+ 100, 000 COPIAS 55°C), 5 (C+ 200, 000 COPIAS 58°C), 6 (C+ 100, 000 COPIAS 58°C), 7 (C+ 200, 000 COPIAS 60°C), 8 (C+ 100, 000 COPIAS 60°C), 9 (C+ 200, 000 COPIAS 63°C), 10 (C+ 100, 000 COPIAS 63°C), 11 (blanco).

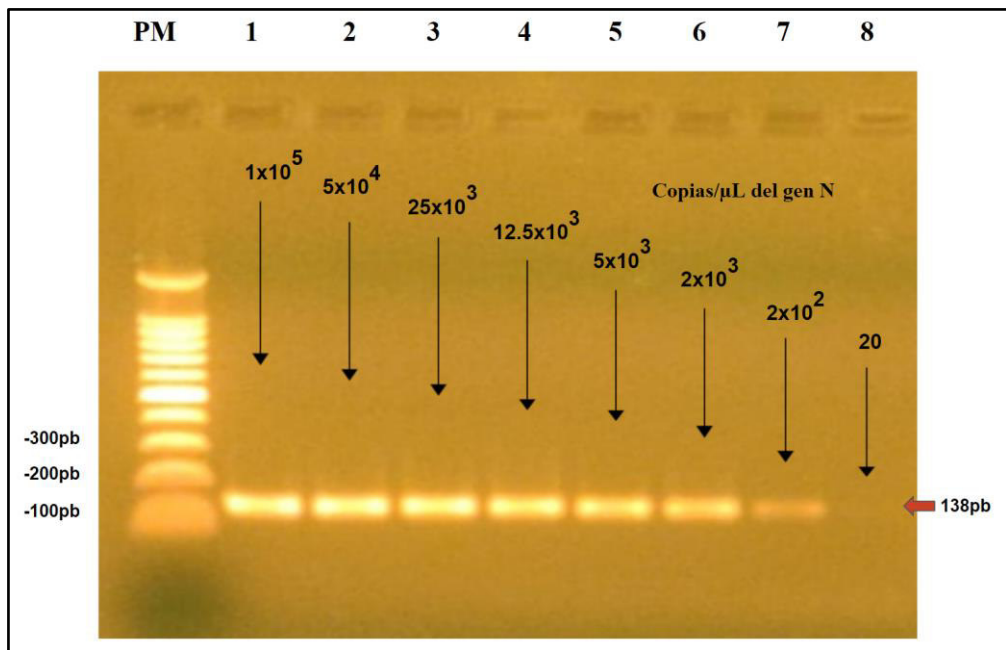


Figura 10. Resultados de la amplificación del control positivo diluido gen N del SARS-Cov-2 por RT-PCR convencional. PM: marcador de peso molecular de 100 pb.

A continuación, se decidió evaluar la prueba empleando muestras de heces previamente positivas a SARS-CoV-2 por secuenciación, pertenecientes al laboratorio donde se realizó la presente investigación, proveniente de cinco felinos y cuatro caninos. Los resultados demostraron que la prueba diseñada amplificó el control positivo, así como todos los animales evaluados, además no hubo amplificación de los controles negativos provenientes de diferentes especies de CoV de los géneros α - CoV (PEDV), β - CoV (Alpaca coronavirus), δ - CoV (deltacoronavirus porcino) e γ - CoV (IBV), logrando satisfactoriamente amplificar material genético de origen humano y animal (Figura 11).

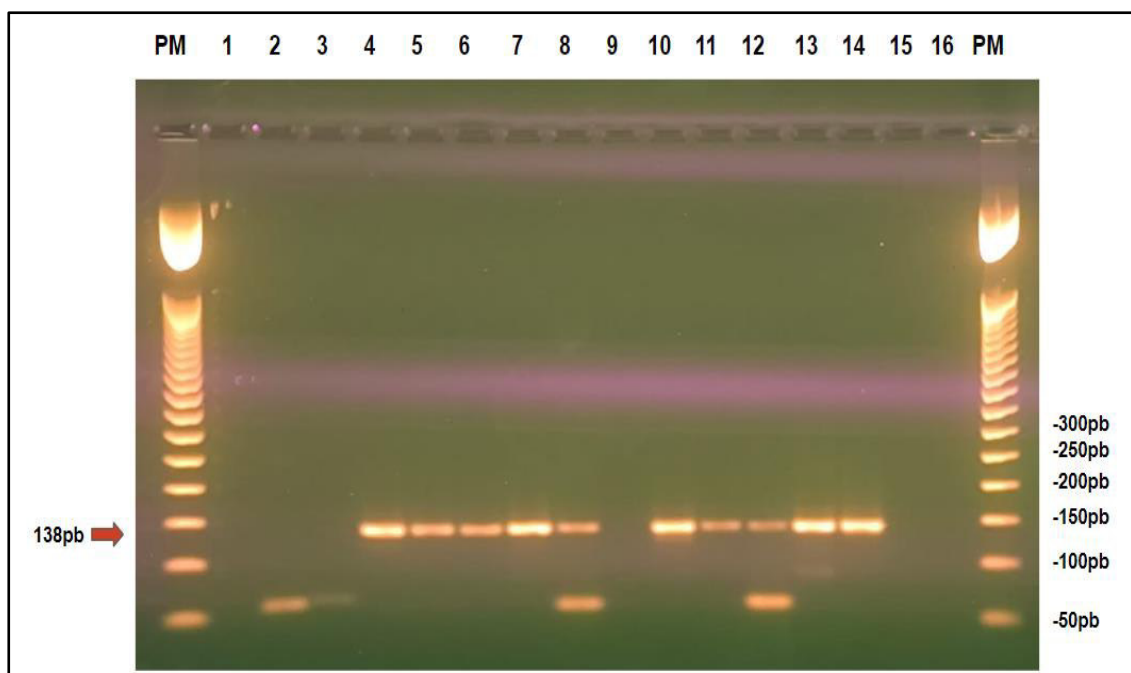


Figura 11. Resultados de la amplificación de un fragmento del gen N del SARS-Cov-2 por RT-PCR convencional. Las muestras positivas tienen un peso molecular de 138 pb. PM: marcador de peso molecular. Líneas 1 a 3, observamos los controles negativos α - CoV, β - CoV y δ - CoV respectivamente; las líneas 4 a 8 son muestras de gatos positivos para SARS-CoV-2; la línea 9 tiene el control negativo de γ - CoV; las líneas 10 a 13 son muestras de perros SARS-CoV-2 positivos, la línea 14 control positivo sintético diluido, la línea 15 es blanco y la línea 16 solo tiene la mezcla sin cDNA.

4.3 Ejecución del kit de la CDC mediante qRT-PCR

Una vez obtenidos los resultados mediante la RT-PCR convencional, se decidió ejecutar el kit de la CDC que emplea una metodología de qRT-PCR en tiempo real al igual que el ensayo que hemos diseñado, esto lo realizamos con el objetivo de comparar los resultados obtenidos de este kit con el nuestro. Para ello, el LOD se estableció de la misma forma como anteriormente se describió para la PCR convencional, es decir realizando diluciones del control positivo sintético del gen N, resultando que el ensayo de la CDC alcanzó a detectar hasta 20 copias/ μL , con una eficiencia de 99.1% a 89.4% y un valor de R^2 que varía entre 0.98 a 0.99 (figura 12 y 13).

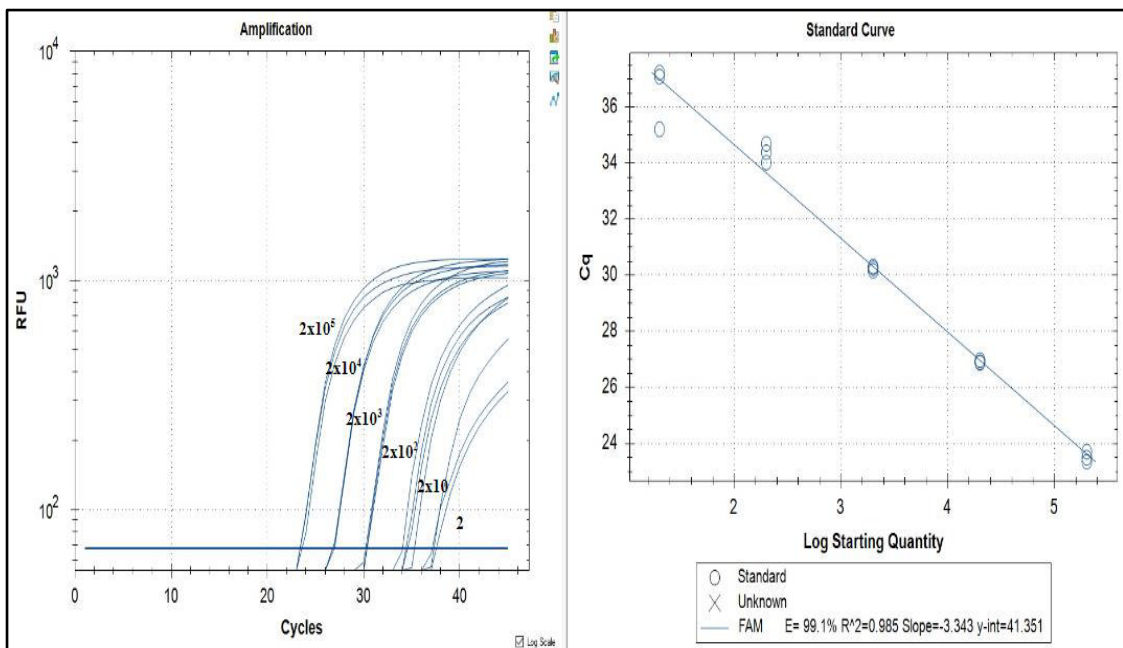


Figura 12. Resultados de la amplificación utilizando diluciones del control positivo sintético del gen N del SARS-Cov-2 por RT-PCR en tiempo real empleando el kit de la CDC. Curva con el par de oligonucleótidos N1.

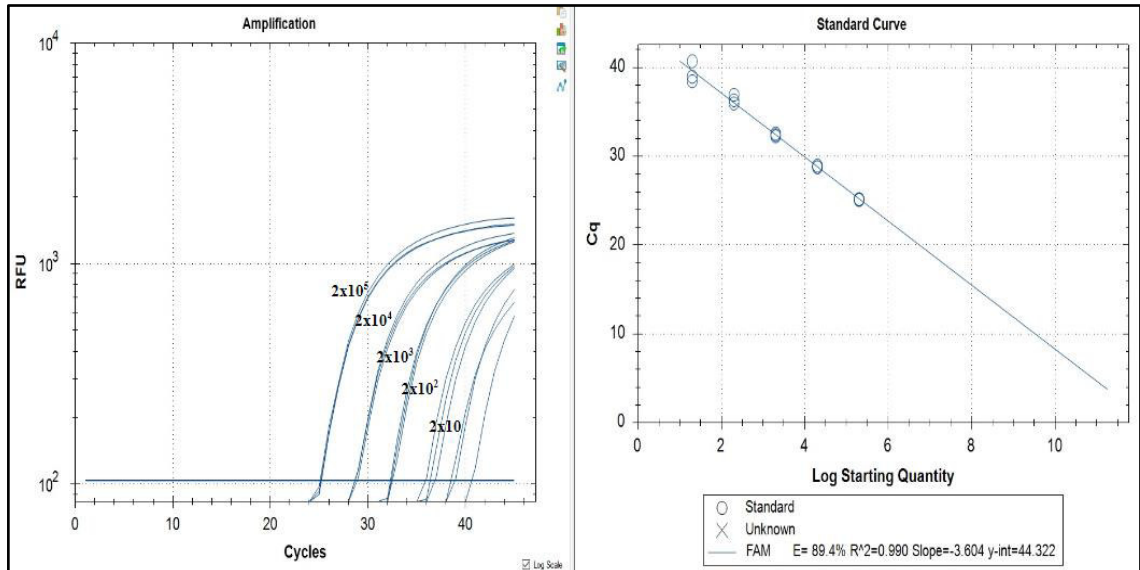


Figura 13. Resultados de la amplificación utilizando diluciones del control positivo sintético del gen N del SARS-Cov-2 por RT-PCR en tiempo real empleando el kit de la CDC. Curva con el par de oligonucleótidos N2.

Seguidamente, se decidió emplear las mismas muestras de heces de animales positivas y negativos descritos en la figura 11, recalcando que no se realizó corridas por triplicado de cada muestra de campo, pero si en el caso de las diluciones con el objetivo de obtener la curva estándar. Se obtuvo como resultado que el kit de la CDC detecta favorablemente las muestras de gatos y perros con SARS-CoV-2, tal como se puede observar en las figuras 14 y 15.

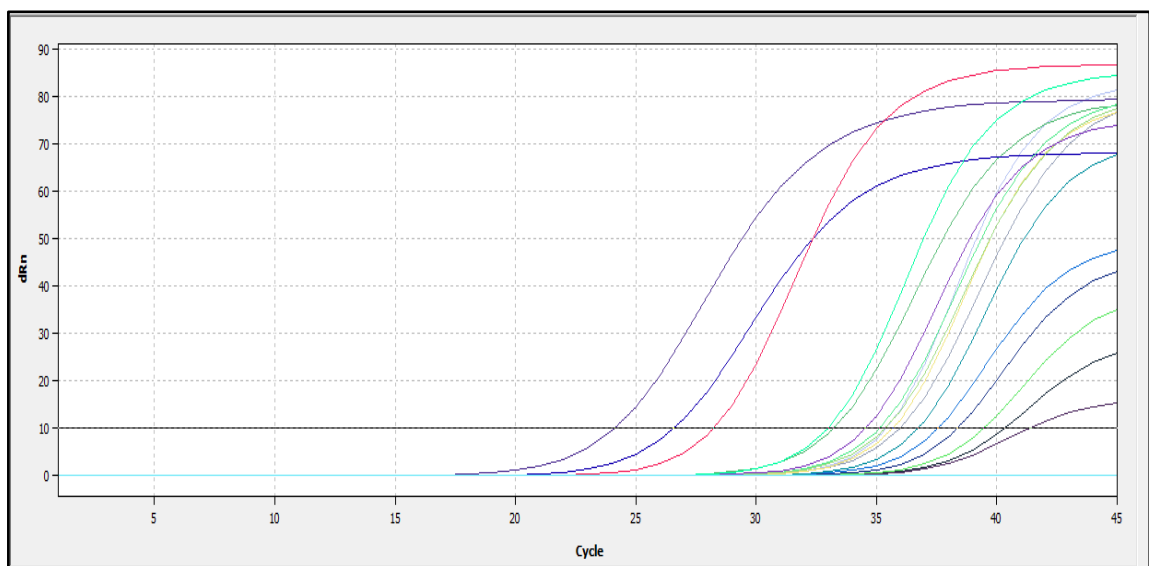


Figura 14. Resultados de la amplificación utilizando muestras de animales positivos a SARS-Cov-2 por RT-PCR en tiempo real empleando el kit de la CDC. Curva N1.

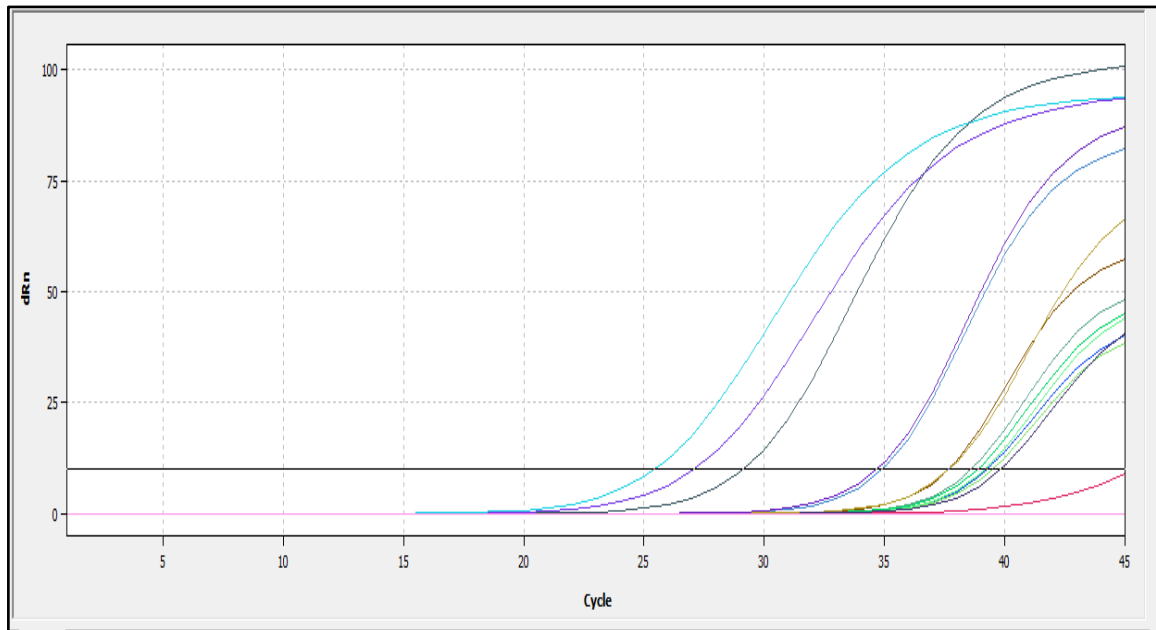


Figura 15. Resultados de la amplificación utilizando muestras de animales positivos a SARS-Cov-2 por RT-PCR en tiempo real empleando el kit de la CDC. Curva N2.

4.4 Evaluación de oligonucleótidos del kit diseñado mediante qRT-PCR

Después de evaluar y obtener los resultados del kit de la CDC, se inició con la estandarización del ensayo diseñado mediante qRT-PCR. Como anteriormente se ha mencionado, se comenzó calculando el límite de detección (LOD), el cual se estableció realizando diluciones del control positivo, resultando que nuestro ensayo diseñado también alcanzó a detectar hasta 20 copias/ μ L, con una eficiencia de 92.1% y un valor de R^2 de 0.99 (figura 16).

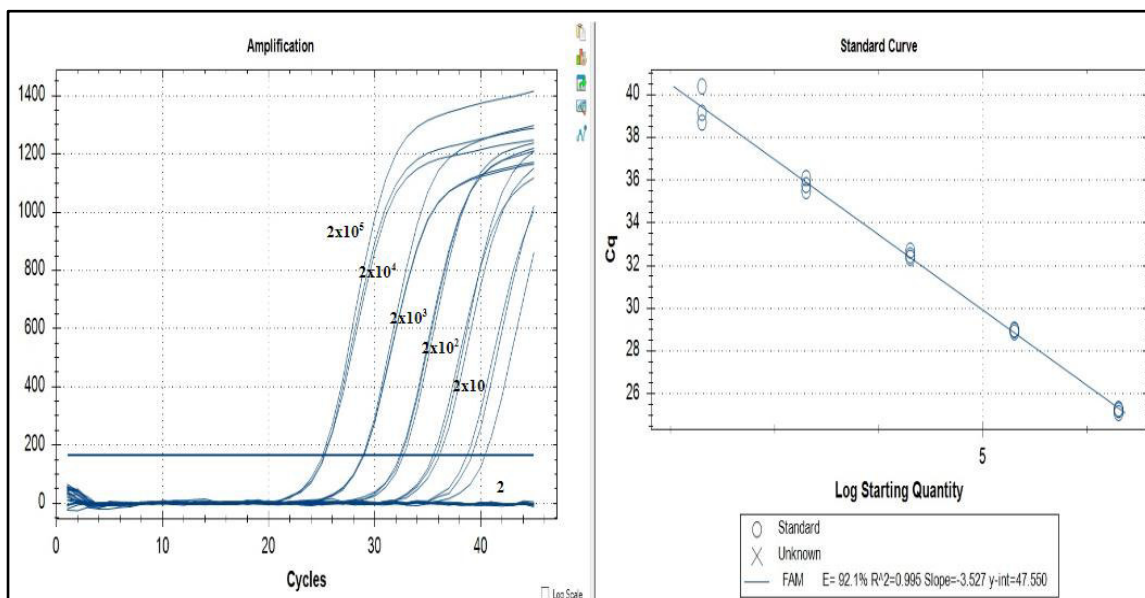


Figura 16. Resultados de la amplificación utilizando diluciones del control positivo sintético del gen N del SARS-CoV-2 por RT-PCR en tiempo real empleando el kit diseñado.

Finalmente, se procedió a evaluar el kit diseñado con las mismas muestras de animales positivos empleadas en el método convencional. Los resultados, demostraron que el ensayo diseñado es capaz de amplificar el control positivo sintético proveniente de la cepa Wuhan que infecta al humano, así como todas las muestras de caninos y felinos previamente positivos al virus por secuenciamiento; además se evidencia que la prueba no presenta reacción cruzada con otros coronavirus como lo son los controles negativos, lo cual demuestra que los oligonucleótidos y sonda diseñados son específicos para el SARS-CoV-2 (figura 17). Para considerar positivo a un animal se ha considerado el mismo criterio que emplea la CDC, el cual manifiesta que una muestra evaluada es positiva siempre y cuando su Ct < 40.

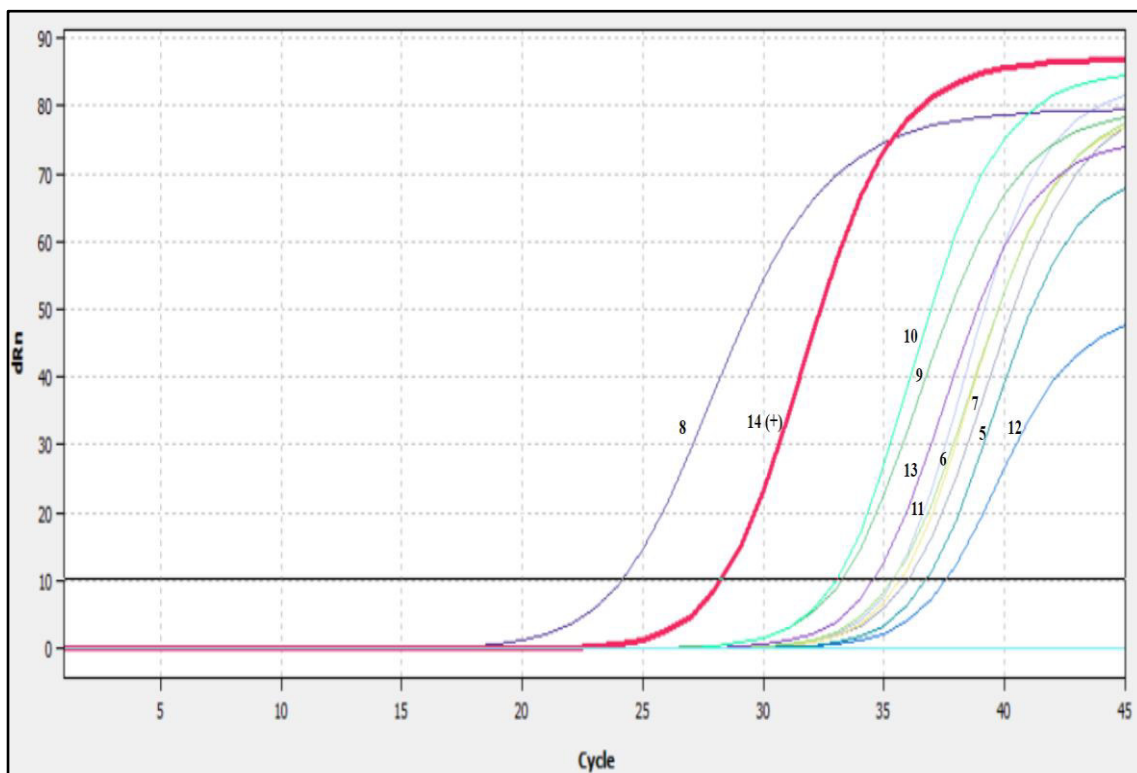


Figura 17. Resultados de la amplificación utilizando muestras de animales positivos a SARS-Cov-2 por RT-PCR en tiempo real empleando el kit diseñado. (+): control positivo. Las curvas 5, 6, 7, 8 y 9 son muestras de felinos positivos para SARS-CoV-2. Las curvas 10, 11, 12 y 13 son muestras de perros SARS-CoV-2 positivos.

Cuadro 7. Cuadro comparativo de valores de Ct entre el kit de CDC y la qRT-PCR diseñada en el presente estudio.

	Muestra	CDC N1	CDC N2	qRT-PCR diseñada BIORAD	qRT-PCR diseñada qTower 2.2 de Analytikjena
1	α - CoV (PEDV)	N/A	N/A	N/A	N/A
2	β - CoV (Alpaca coronavirus)	N/A	N/A	N/A	N/A
3	γ - CoV (IBV)	N/A	N/A	N/A	N/A

4	<i>δ – CoV (deltacoronavirus porcino)</i>	N/A	N/A	N/A	N/A
5	felino (SH30)	36.72	39.27	36.75	36.74
6	felino (SH31)	36.36	37.71	35.38	35.39
7	felino (SH37)	35.64	39.85	35.66	35.67
8	felino (SH38)	24.1	27.45	24.13	24.12
9	felino (SH39)	33.18	34.17	33.21	33.2
10	canino (C17)	32.97	34.94	33	32.98
11	canino (C50)	35.34	39.48	35.37	35.34
12	canino (C51)	37.51	38.91	37.54	37.52
13	canino (C55)	34.51	37.66	34.53	34.54
14	(+)	28.22	29.15	28.24	28.23
15	Blanco	N/A	N/A	N/A	N/A
16	mezcla sin cDNA	N/A	N/A	N/A	N/A

*N/A: No amplificación

V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian que el diseño y estandarización de una RT-PCR y una qRT-PCR, es capaz de detectar el SARS-CoV-2, utilizando oligonucleótidos y sondas específicas, que amplifican una región altamente conservada del gen N. En primera instancia se decidió diseñar la qRT-PCR debido a que es considerado el método diagnóstico Gold Standard para detectar al SARS-CoV-2; sin embargo, no todos los laboratorios o centros de diagnóstico en nuestro país cuentan con los equipos necesarios y personal calificado para la ejecución de esta prueba, es por ello que se optó también por el diseño de la RT-PCR (Escalante *et al.*, 2021). Si bien la RT-PCR es menos sensible que la técnica Gold estándar declarada por la OMS, creemos que en países como el nuestro, con carencias en lo referente al sistema de salud y diagnóstico, también puede ser usada para evaluar muestras de origen humano y animal.

A pesar de que los casos diagnosticados de COVID-19 han disminuido considerablemente, resulta de suma importancia contar con métodos diagnósticos que posean buen rendimiento y sean aplicables a nuestra realidad, con el objetivo de mejorar la vigilancia e iniciar estudios donde se evalúen otras especies y la relación de estas en la infección con los seres humanos.

Si bien existen diversos kits de estas pruebas moleculares, se diferencian según los genes diana a los cuales buscan amplificar, secuencias de oligonucleótidos, sondas, etc. Al inicio de la pandemia, el uso de dos o tres genes diana para la detección de SARS-CoV-2 se dio en algunos países por la dificultad de diferenciar SARS-CoV-1 de SARS-CoV-2 (Cancino *et al.*, 2020). Actualmente esto ya no es un problema, debido a que con

el paso del tiempo y el secuenciamiento completo del genoma se pudo diferenciar las dos especies de coronavirus. Lo que si se tiene claro, es que ambas especies son nocivas para la salud humana, tienen un comportamiento epidemiológico diferente y es fundamental tener métodos diagnósticos que puedan distinguirlos, sobre todo en los países donde circulan ambas especies de coronavirus (Li y Ren 2020). Una excepción podría ser los países localizados en continentes donde no hay reportes de SARS-CoV-1, ni otros coronavirus genéticamente relacionados (Wang *et al.*, 2005) en estos países el usar kits que detecten más de dos genes blancos no añadiría beneficio alguno, pero sí generaría un mayor costo económico de los kits y mayor dificultad de realizarlos. En países como el nuestro, donde solo hay reportes de SARS-CoV-2 se puede trabajar con un gen para la detección de este virus, obviamente dicho gen debe contar con regiones (segmentos) altamente conservados para esta especie de CoV, esto ayudaría a que los kits utilizados en Sudamérica puedan ser de fácil acceso y uso en los laboratorios peruanos, así como ser más económicos en comparación con los otros kits comerciales. Adicionalmente, se citan estudios más adelante que señalan la evaluación de varios kits comerciales y que concluyen que el uso de dos o tres genes diana no es indispensable para otorgar un resultado confiable.

El presente estudio se decidió emplear el gen N debido a que presenta segmentos altamente conservados entre el subgénero *Sarbecovirus* (Chu *et al.*, 2020). Además, según la CDC, la identificación del agente viral debe ejecutarse basándose en los genes dianas de la nucleocápside (N1 y N2); sin embargo, por su parte la OMS sugiere emplear el gen de la envoltura (E), acompañado de una confirmación del gen RdRp (Tang *et al.*, 2020).

Chu *et al.* (2020) poco tiempo después de la declaración de pandemia a causa del SARS-CoV-2, publicaron un estudio que tuvo como objetivo diseñar dos ensayos de qRT-PCR de un paso que buscaban identificar los genes ORF1b y N; sus resultados demostraron que el gen N era aproximadamente 10 veces más sensible que el ensayo del gen ORF-1b, debido a que, en dos de las diluciones realizadas en los dos pacientes del estudio, se obtuvo que mientras el ensayo que detectaba el gen ORF-1b no tuvo ninguna amplificación, el que buscaba amplificar un segmento del gen N sí tuvo un Ct<40. Así mismo, Nalla *et al.* (2020), después de comparar siete conjuntos de cebador-sonda que identifican SARS-CoV-2 mediante qRT-PCR, concluyen que todos fueron altamente específicos y no evidenciaron falsos positivos. En lo que respecta a su sensibilidad los conjuntos que se basaban en el gen E y N2 identificaron el SARS-CoV-2 en todas las

muestras clínicas positivas conocidas, inclusive detectaron el virus en una muestra que poseía solo seis copias de ARN.

Del mismo modo, Altamimi *et al.* (2021) realizaron una evaluación de doce kits de diagnóstico de qRT-PCR en 94 muestras clínicas con el objetivo de determinar sus rendimientos. Se siguieron las instrucciones de uso, así como recomendaciones de cada kit y se los categorizaron según los genes que buscaron detectar. Los kits fueron los siguientes: Tib molbiol (genes E y RdRp), Altona (genes E y S), Thermo Fisher (genes N, Orflab y S), Solgente (genes N y Ofr1a), Quidel (gen Orflab), BGI (gen Orflab), Optolane (genes E y RdRp), Kogene (genes E y RdRp), Sansure Biotech (genes N y Ofr1a), Diseño Novacyt (gen RdRp), Biotecnología GeneReach (gen Orflab) y finalmente el kit KH Medical (genes S y RdRp). El estudio demostró que cuatro kits (BGI, IQ Real, Sansure y RAD) alcanzaron una sensibilidad del 100%, dos de ellos identificaron un gen objetivo y los otros dos ensayos más de una diana. Los autores señalan que el tener más de un gen no garantiza que la prueba diagnóstica sea más específica, sino por el contrario basta con solo apuntar a un gen, pero altamente conversado. El estudio no identificó el LOD de las pruebas; sin embargo, si evaluaron los Ct, los cuales dieron como resultado que los kits que tuvieron los valores de umbral cíclico más bajo fueron los dirigidos al gen N, mientras que los más altos al gen RdRp.

Valadan *et al.* (2022) estudiaron las expresiones de los genes RdRp, N y E en 100 muestras positivas a SARS-CoV-2 en Irán. El estudio indica que el gen N es una diana significativa para la identificación del SARS-CoV-2, esto debido a que tuvo una elevada expresión en las muestras de los pacientes en estudio. Se ha demostrado que esta proteína se produce en grandes cantidades en células infectadas, lo cual tiene relación con los procesos de replicación, traducción y transcripción (Astuti e Ysrafil, 2020). Así también Abbasi *et al.* (2022) en su investigación de 114 muestras determinaron que el valor del Ct para el gen N fue más específico en el diagnóstico de SARS-CoV-2.

Después de realizar el cálculo de la distancia genética de las secuencias del gen N del SARS-CoV-2 aisladas en humanos y animales (figura 8), se evidenció que existe una relación genética muy alta (valores alrededor del 99% al 100% de identidad de nucleotideos). Estos resultados *in silico* predicen que el ensayo diseñado es capaz de poder identificar el virus causante de la COVID-19 en humanos y animales. A pesar de ello, es

necesario evaluar un mayor número de muestras de campo, así como de ser posible verificar en campo que nuestro ensayo es capaz de poder diferenciar al SARS-CoV-1.

En lo que refiere a la RT-PCR de punto final, el límite de detección (LOD) demostró que el ensayo diseñado alcanzó a detectar hasta 200 copias/ μL . Estos valores son mayores a los obtenidos cuando se evaluó en tiempo real (20 copias/ μL); sin embargo, son similares a los resultados obtenidos por Carvalho *et al.* (2021), quienes reportaron en su ensayo de RT-PCR de punto final un LOD de 100 copias/ μL .

Así mismo, cuando se empleó el ensayo diseñado junto con todas las muestras positivas previamente por secuenciamiento, resultaron positivas también para nuestro ensayo en el método convencional; adicionalmente, se evidenció que no tuvo reacción cruzada con los controles negativos o blancos. La presente técnica comparte características similares a la desarrollada por Carvalho *et al.* (2021), quienes realizaron su estudio en Brasil, donde el acceso a kits representó durante la pandemia un costo significativo, sumado a que la demanda cada vez iba en aumento por el incremento significativo de casos reportados. Su objetivo fue validar una RT-PCR en comparación con una qRT-PCR para la identificación de SARS-CoV-2, su ensayo al igual que el nuestro estuvo dirigido al gen N y utilizó el mismo control positivo sintético comercial. Para su estudio, Carvalho *et al.* (2021) utilizaron muestras humanas de hisopados naso y orofaríngeos; sin embargo, es posible obtener muestras de secreciones oculares, saliva, sangre y heces (Dutta *et al.*, 2022) como lo aplicado en la presente investigación, ya que usamos muestras de heces previamente positivas por secuenciamiento pertenecientes al laboratorio de estudio, por consiguiente podemos mencionar que nuestros resultados se pueden extrapolar para el uso en este tipo de muestras. Los resultados de Carvalho *et al.* (2021) evidenciaron que son suficientes para detectar el SARS-CoV-2, así mismo concluyen que es posible usarla como alternativa para estudios epidemiológicos.

Si bien nuestro ensayo diseñado en punto final tiene buenos resultados y puede ser usado en laboratorios o centros que no cuenten con equipos donde se realicen técnicas de diagnóstico molecular basada en tiempo real, es importante recalcar que la sensibilidad frente a una qRT-PCR es menor; sin embargo, acorde a nuestra realidad y de varios países en Latinoamérica, consideramos que será de utilidad para futuros estudios.

En lo que refiere a la evaluación del ensayo mediante la qRT-PCR en tiempo real, como ya se mencionó, se inició evaluando el kit de la CDC para luego compararlo al nuestro. Al evaluar el LOD del kit de la CDC, se encontró que es capaz de detectar hasta 20 copias/ μL , al igual que nuestro ensayo. Cheng *et al.* (2023) en su estudio, adjuntaron una comparativa entre los métodos de detección molecular, reportando que en promedio el LOD era de 10–500 copias/reacción en estos ensayos, por lo que podemos mencionar que nuestro valor obtenido se encuentra de este parámetro. Así mismo, Tombuloglu *et al.* (2021) al evaluar el LOD en su ensayo RT-PCR multiplex, determinaron que para el gen RdRp fue de 10 copias/ μL y para el gen E obtuvo como LOD el valor de 1000 copias/ μL . Sin embargo, en otro estudio desarrollado por Jeon *et al.* (2023) en la República de Corea, los LOD del ensayo alcanzaron un valor menor a 10 copias por reacción para los genes RdRp y N del SARS-CoV-2. Además, también hace referencia que los LOD de los ensayos publicados por la OMS, basados en qRT-PCR varían entre 100 y 2,7 copias/reacción. Por consiguiente, si comparamos nuestros resultados con todos los anteriormente mencionados, podemos señalar que se encuentran en los rangos dictados por la OMS y autores señalados.

En ambos ensayos, tanto el de la CDC como el nuestro, se empleó la metodología qRT-PCR “de un paso”, la cual ofrece ventajas frente a la de dos pasos, ya que reduce el tiempo de ejecución de la prueba y además limita el manejo de muestras, así como los errores experimentales que esto conlleva (Dutta *et al.*, 2022). Así mismo, en la qRT-PCR, es posible vigilar la amplificación empleando sondas, en la presente investigación, se utilizó la sonda Taqman, que tiene en el extremo 5' un señalizador fluorescente y en el extremo 3' un extintor. La señal fluorescente es detectada cuando estas se separan, debido a la reacción enzimática en la cual la sonda es insertada al producto de la PCR (Oishee *et al.*, 2021). El fluoróforo utilizado fue FAM para todos los ensayos corridos en la metodología PCR en tiempo real y no se consideró emplear otros en la misma reacción.

Después de la evaluación de ambos ensayos, junto a las muestras de campo (heces de caninos y felinos pertenecientes al laboratorio del estudio); se obtuvo que tanto en el caso del kit de la CDC como el de la presente investigación, amplificaron las muestras, obteniendo así resultados idénticos, logrando satisfactoriamente amplificar material genético humano y animal.

En lo que respecta a los valores del ciclo umbral (Ct), como ya se mencionó es el ciclo en el cual la señal de fluorescencia cruza el umbral de positividad y estos valores tienen una relación inversamente proporcional a la cantidad del material genético presente en la mezcla de reacción. Es decir que mientras menor sea el valor de Ct, mayor será la cantidad de material genético del virus en la muestra. En nuestro ensayo los Ct obtenidos fueron de dos termocicladores: BIO-RAD y qTower 2.2 de Analytikjena. El control positivo en el termociclador BIO-RAD presentó un Ct de 28.24, mientras que en el otro termociclador qTower se obtuvo un Ct de 28.23. Las muestras proveniente de heces de animales previamente positivas en el termociclador BIORAD tuvieron valores de 36.75, 35.38, 35.66, 24.13, 33.21, 33, 35.37, 37.54, 34.53 y 28.24; mientras que en el termociclador qTower 2.2 de Analytikjena se obtuvo valores de 36.74, 35.39, 35.67, 24.12, 33.2, 32.98, 35.34, 37.52, 34.54 y 28.23. En ambos termocicladores, los valores de Ct son muy parecidos. Es necesario acotar que no se empleó controles internos en la corrida de los ensayos, lo cual repercute en los resultados, debido a que estos buscan garantizar la calidad de los resultado obtenidos en las corridas de PCR en tiempo real, por lo que a futuro debemos buscar incluirlos y de esta manera monitorear la presencia de resultados falsos negativos y detectar los resultados verdaderos negativos en muestras de campo con un mayor número de muestras.

Para optimizar una cuantificación mediante qRT-PCR se debe considerar los valores de eficiencia, los cuales se obtienen de una curva estándar, la cual se desarrolla automáticamente en el sistema a partir de diluciones seriadas del control positivo. Esta curva representa los Ct obtenidos en relación con las diluciones, de esta forma se obtiene una pendiente (tal como se observan las figuras 11, 12 y 15), la que nos brinda finalmente el valor de la eficiencia de la reacción de amplificación (Jaquenod *et al.*, 2020). El valor de eficiencia se acepta como correcto cuando se encuentran en el rango de 90-110% (OPS, 2021), cuando los valores son menores a 90% indican que falta optimizar la reacción de PCR y puede deberse a un mal diseño de oligonucleótidos, las concentraciones de los componentes de PCR no son las óptimas y se puede estar produciendo dímeros de oligonucleótidos y horquillas.

La eficiencia del ensayo diseñado qRT-PCR fue de 92.1%, mientras que al evaluar la eficiencia del ensayo de la CDC para N1 fue de 99.1% y para N2 89.4%, por lo que podemos mencionar que el valor obtenido se encuentra dentro de los rangos permitidos

(OPS, 2021). Otro de los parámetros que se debe evaluar es el coeficiente de determinación (R^2), el cual también se obtiene a partir de la curva estándar empleando el software de detección. En nuestro ensayo, se obtuvo el valor de 0.99, mientras que en el kit de la CDC para N1 fue de 0.98 y N2 0.99.

Si comparamos con otros estudios, Jeon *et al.* (2023) obtuvieron como eficiencia 96,3% para el gen N y 100.7% para el gen RdRp en su ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real para detectar el SARS-CoV-2 en perros y gatos. En lo que respecta al coeficiente de determinación (R^2), para el gen N y RdRp obtuvo el valor de 0.99. Tombuloglu *et al.* (2021), también desarrollaron un ensayo de RT-PCR multiplex, obtuvieron una eficiencia de 99.9% para ambos genes (RdRp y E) y un coeficiente de determinación (R^2) de 0.97 para el gen RdRp y 0.99 para el gen E. Estos resultados son favorables para nuestro estudio, debido a que son similares y cumplen con lo mencionado para ser considerado satisfactorio.

Liew *et al.* (2023) resaltaron la importancia de notificar los casos de animales positivos a instituciones nacionales, debido a que es probable que se haya obviado casos positivos que no fueron reportados durante en el periodo del estudio. Esta situación es la misma en nuestro país, en el cual existen carencias en el sistema de salud humano y animal. Existe poca evidencia científica que se encargue del estudio, notificación, caracterización clínica y epidemiológica de casos de animales sospechosos a SARS-CoV-2 que tuvieron contacto cercano con sus dueños positivos a COVID 19. Considerando los resultados obtenidos en la presente investigación, creemos que se pueden emplear los métodos diagnósticos diseñados para realizar estudios similares al descrito y desarrollar así publicaciones mediante datos de vigilancia a nivel nacional, todo ello con el objetivo de salvaguardar la salud humana y animal y sobre todo saber cómo actuar frente a las enfermedades zoonóticas emergentes que sucedan en el futuro.

En nuestro país Schiaffino *et al.* (2021), informaron por primera vez la presencia de SARS-CoV-2 variante Lambda en 3 felinos domésticos que presentaron signos clínicos y además compartían el antecedente de tener dueños positivos a COVID 19. Para el diagnóstico se empleó un kit de qRT-PCR, que al igual que el diseñado en nuestro estudio, estuvo dirigido al gen N. De igual forma, se resalta la importancia de seguir investigando con estudios más grandes que aclaren el rol de los animales domésticos en la transmisión

del virus así como su papel frente a las nuevas variantes del SARS-CoV-2, qué puede significar una amenaza para la salud pública (Jeon *et al.*, 2023).

Por otro lado, nuestra investigación también presenta limitaciones, una de ellas es que al ser el SARS-CoV-2, un virus que presenta una gran diversidad genética y de variantes reportadas durante el transcurso de la pandemia, existe la probabilidad de que ocurran mutaciones en los lugares de unión de oligonucleótidos o sonda de los genes diana, lo que repercute negativamente en el diagnóstico, debido a que disminuye la sensibilidad y genera resultados falsos negativos (Jeon *et al.*, 2023), por tal motivo cada cierto tiempo se debe analizar *in silico* nuestros oligonucleótidos y sondas con las nuevas secuencias del N que presentan las diferentes variantes caracterizadas de SARS-CoV-2 en humanos y animales.

VI. CONCLUSIONES

1. Los ensayos diseñados y estandarizados para la identificación de SARS-CoV-2 por medio de RT-PCR y qRT-PCR empleando el gen N, son capaces de detectar el virus en muestras de heces de origen animal y amplificar el control sintético de origen humano; por lo que, puede aplicarse como métodos de prueba alternativo para estudios epidemiológicos en diferentes especies animales.
2. Debido a las mutaciones que se han ido reportando en el SARS-CoV-2, se debe considerar evaluar los ensayos que son usados para diagnóstico en nuestro país, con el objetivo de verificar que el método diagnóstico siga detectando al virus de manera eficiente.

VII. RECOMENDACIÓN

Debido a que la pandemia causada por el SARS-CoV-2 ha demostrado las carencias que existe en nuestro sistema de salud humano y animal, se sugiere realizar investigaciones con mayor énfasis en notificación de casos clínicos, caracterización clínica y epidemiológica de casos de animales sospechosos a SARS-CoV-2 en nuestro país, de esta forma contribuiremos a la vigilancia y prevención de enfermedades así como conocer cómo afrontar futuras pandemias.

VII. LITERATURA CITADA

1. **Abbasi H, Tabaraei A, Hosseini SM, Khosravi A, Razavi Nikoo H. 2022.** Real-time PCR Ct value in SARS-CoV-2 detection: RdRp or N gene? *Infection* 50(2):537–540. doi.org/10.1007/s15010-021-01674-x.
2. **Allender M, Adkesson M, Langan J, Delk K, Meehan T, Aitken-Palmer C, McEntire M, Killian M, Torchetti M, Morales S, Austin C, Fredrickson R, Olmstead C, Ke R, Smith R, Hostnik E, Terio K, Wang L. 2022.** Multi-species outbreak of SARS-CoV-2 Delta variant in a zoological institution, with the detection in two new families of carnivores. *Transboundary and emerging diseases* 69(5): e3060–e3075. doi.org/10.1111/tbed.14662.
3. **Altamimi A, Obeid D, Alaifan T, Taha M, Alhothali M, Alzahrani F, Albarrag A. 2021.** Evaluation of 12 commercial qualitative RT-PCR kits for the detection of SARS-CoV-2. *Journal of Medical Virology* 93 (5): 3219–3226. doi.org/10.1002/jmv.26900.
4. **Astuti I, Ysrafil Y. 2020.** Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr* 14(4):407–412. doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.020
5. **Balboni A, Gallina L, Palladini A, Prospero S, Battilani M. 2012.** A real-time PCR assay for bat SARS-like coronavirus detection and its application to Italian

- greater horseshoe bat faecal sample surveys. *ScientificWorldJournal* 989514. doi: 10.1100/2012/989514.
6. **Calisher C, Childs J, Field H, Holmes K, Schountz T. 2006.** Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev* 19(3):531-45. doi: 10.1128/CMR.00017-06.
 7. **Calvet G, Pereira S, Ogrzewalska M, Pauvolid-Corrêa A, Resende P, Tassinari W, Costa A, Keidel L, Da Rocha A, Da Silva M, Dos Santos S, Lima A, De Moraes I, Méndez A, Souza T, Martins E, Ornellas R, Corrêa M, Antonio I, Guaraldo L, Menezes R. 2021.** Investigation of SARS-CoV-2 infection in human dogs and cats diagnosed with COVID-19 in Rio de Janeiro, Brazil. *Plos One* 16 (4): e0250853 doi.org/10.1371/journal.pone.0250853.
 8. **Cancino J, Vitón A, Casí J. 2020.** Empleo de la reacción en cadena de la polimerasa en la detección del SARS CoV-2. *Univ. Med Pinareña* 17(1): e574.
 9. **Carvalho R, Oliveira M, Ribeiro J, Dos Santos I, Almeida K, Conti A, Alexandrino B, Campos F, Soares C, Ribeiro J. 2021.** Validation of a conventional PCR-like alternative to the detection of SARS-CoV-2 with the target nucleocapsid protein gene in naso-oropharyngeal samples. *PloS One* 16 (9): e0257350. doi.org / 10.1371 / journal. pone.0257350.
 10. **[CDC] Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. 2020a.** Virus Disease Control Institute. [Internet], [30 mayo 2022]. Disponible en: http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html.
 11. **[CDC] Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. 2020b.** CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use Catalog #2019-nCoV-EUA-01. [Internet], [5 junio 2023]. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/134922/download>.
 12. **Chaimayo C, Kaewnaphan B, Tanlieng N, Athipanyasilp N, Sirijatuphat R, Chayakulkeeree M, Angkasekwinai N, Sutthent R, Puangpunngam N, Tharmviboonsri T, Pongraweewa O, Chuthapisith S, Sirivatanauksorn Y, Kantakamalakul W, Horthongkham N. 2020.** Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand. *Virol J* 17(1):177. doi: 10.1186/s12985-020-01452-5.

13. **Chakraborty C, Sharma A, Bhattacharya M, Sharma G, Lee S. 2020.** The 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) pandemic: A zoonotic prospective. *Asian Pac J Trop Med* 13(6):242. doi:10.4103/1995-7645.281613.
14. **Cheng L, Lan L, Ramalingam M, He J, Yang Y, Gao M, Shi Z. 2023.** A review of current effective COVID-19 testing methods and quality control. *Archives of microbiology* 205(6): 239. doi.org/10.1007/s00203-023-03579-9
15. **Chen Y, Liu Q, Guo D. 2020.** Emerging coronaviruses: structure, replication and pathogenesis of the genome. *J. Med. Virol* 92: 418-423. doi: 10.1002 / jmv.25681.
16. **Chu D, Pan Y, Cheng S, Hui K, Krishnan P, Liu Y, Ng D, Wan C, Yang P, Wang Q, Peiris M, Poon L. 2020.** Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin Chem* 66(4):549-555. doi: 10.1093/clinchem/hvaa029.
17. **Da Silva S, Do Nascimento J, Germano R, Guarines K, Targino C, Da Silva P, De Magalhães J, Vigar J, Silva-Júnior A, Kohl A, Pardee K, Pena L. 2022.** Two Years into the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned. *ACS Infect Dis* 8(9):1758-1814. doi: 10.1021/acsinfecdis.2c00204.
18. **De Groot R, Baker S, Baric R, Brown C, Drosten C, Enjuanes L, Fouchier R, Galiano M, Gorbalenya A, Memish Z, Perlman S, Poon L, Snijder E, Stephens G, Woo P, Zaki A, Zambon M, Ziebuhr J. 2013.** Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J Virol* 87(14):7790-2. doi: 10.1128/JVI.01244-13.
19. **Dhama K, Patel S, Pathak M, Yattoo M, Tiwari R, Mali Y, Singh R, Sah R, Rabaan A, Bonilla-Aldana D, Rodríguez- Morales A. 2020.** An update on SARS-CoV-2/COVID-19 with reference to its clinical pathology, pathogenesis, immunopathology, and mitigation strategies. *Travel medicine and infectious disease* (37): 101755. doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101755.
20. **Dos Santos C, Gómez H, Junqueira N, López E, Nogales K, O'Ryan M, Villegas J. 2021.** The Role of Serology Testing in the Context of Immunization Policies for COVID-19 in Latin American Countries. *Viruses* 13(12):2391. doi: 10.3390/v13122391.
21. **Drózdź M, Krzyżek P, Dudek B, Makuch S, Janczura A, Paluch E. 2021.** Current State of Knowledge about Role of Pets in Zoonotic Transmission of SARS-CoV-2. *Virus* 13 (6): 1149. doi.org/10.3390/v13061149.

22. **Dutta D, Naiyer S, Mansuri S, Soni N, Singh V, Bhat K, Singh N, Arora G, Mansuri M. 2022.** COVID-19 Diagnosis: A Comprehensive Review of the RT-qPCR Method for Detection of SARS-CoV-2. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*: 12(6): 1503. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061503>.
23. **Ekstrand K, Flanagan A, Lin I, Vejseli B, Cole A, Lally A, Morris R, Morgan K. 2021.** Animal Transmission of SARS-CoV-2 and the Welfare of Animals during the COVID-19 Pandemic. *Animals* 1: 2044. doi.org/10.3390/ani11072044.
24. **Escalante O, Anzardo M, Donaires F, Solis G, Gallesi I, Pampa L, Huaranga M, Rojas N, García C, Angles E, Gavilán R, Durães R, Mendez J, Cabezas C, Marques P. 2021.** Estandarización y validación de una prueba molecular RT-LAMP in house para el diagnóstico de SARS-CoV-2. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 38(1): 7-16 <https://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2021.381.7154>
25. **Guo R, Wolff C, Prada J, Mughini-Gras L. 2023.** When COVID-19 sits on people's laps: A systematic review of SARS-CoV-2 infection prevalence in household dogs and cats. *One Health (Amsterdam, Netherland)*: 16: 100497. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100497>.
26. **Gunson R, Collins T, Carman W. 2006.** Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 35(4): 355–367. doi.org/10.1016/j.jcv.2005.12.006.
27. **Han H, Wen H, Zhou C, Chen F, Luo L, Liu J, Yu X. 2015.** Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res* 2; 205:1-6. [doi: 10.1016/j.virusres.2015.05.006](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.05.006).
28. **Hassan M, Sundararaju S, Manickam C, Mirza F, Al-Hail H, Lorenz S, Tang P. 2021.** Una nueva mutación puntual en el gen N del SARS-CoV-2 puede afectar la detección del virus al revés PCR transcripcional-cuantitativa. *J Clin Microbiol* 59: e03278-20. [10.1128/JCM.03278-20](https://doi.org/10.1128/JCM.03278-20).
29. **ICTV. 2023.** Coronaviridae. Género: *Betacoronavirus*. [Internet], [19 mayo 2023]. Disponible en: <https://ictv.global/report/chapter/coronaviridae/coronaviridae/betacoronavirus>.

30. **James A, Alawneh J. 2020.** COVID-19 infection diagnosis: potential impact of isothermal amplification technology to reduce community transmission of SARS-CoV-2. *Diagnostics* 10:399. [10.3390/diagnostics10060399](https://doi.org/10.3390/diagnostics10060399).
31. **Jaquenod C, Montanaro M, Victoria M, Canzoneri R; Orłowski A, Santana M, Pereyra E, Kraemer M, Lavarías S, Moscoso V, Costantini N, Francini F, Garda H, Pedrini N, Baro M, Vila M, Aiello A, Martín C. 2020.** Metodologías para la detección de SARS-CoV-2 y análisis de carga viral mediante RT-PCR cuantitativa. *Innovación y Desarrollo Tecnológico y Social* 2 (2): 1-14.
32. **Jara L, Ferradas C, Schiaffino F, Sánchez C, Martínez A, Ulloa A, Isasi G, Montalván A, Sarmiento L, Fernández M, Zimic M. 2021.** Evidence of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 in domestic cats living with owners with a history of COVID-19 in Lima - Peru. *One Health (Amsterdam, Netherlands)*, 13: 100318. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100318>.
33. **Jeon G, Kim H, Kim J, Baek J, Shin Y, Kwon O, Kang H, Cho H, Cheon D, Park C. 2023.** Tailored Multiplex Real-Time RT-PCR with Species-Specific Internal Positive Controls for Detecting SARS-CoV-2 in Canine and Feline Clinical Samples. *Animals* 13(4):602. doi.org/10.3390/ani13040602.
34. **Joffrin L, Cooreman T, Verheyen E, Vercammen F, Marien J, Leirs H, Gryseels S, 2023.** SARS-CoV-2 Surveillance between 2020 and 2021 of all mammalian species in two Flemish zoos (Antwerp Zoo and Planckendael Zoo). *Vet Science* 10: 382. <https://doi.org/10.3390/vetsci10060382>
35. **Krammer F. 2020.** SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* 586:516–527. [10.1038/s41586-020-2798-3](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3).
36. **Lam E, León A, León K, Llamó G, López R, Luzuriaga E, Mendoza A, Huaman J. 2021.** Bases moleculares de la patogénesis de Covid-19 y estudios in silico de posibles tratamientos farmacológicos. *Revista la Facultad Medicina Humana* 21(2): 417-432. [doi:10.25176/RFMH.V21I1.3327](https://doi.org/10.25176/RFMH.V21I1.3327).
37. **LeBlanc J, Gubbay J, Li Y, Needle R, Arneson S, Marcino D, Charest H, Desnoyers G, Dust K, Fattouh R, Garceau R, German G, Hachette T, Kozak R, Krajden M, Kuschak T, Lang A, Levett P, Mazzulli T, McDonald R, Mubareka S, Prystajeky N, Rutherford C, Smieja M, Yu Y, Zahariadis G, Zelyas N, Bastien N. 2020.** Detección de SARS-CoV-2 basada en PCR en tiempo real en laboratorios canadienses. *J Clin Virol* 128:104433. [10.1016/j.jcv.2020.104433](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104433).

38. **Li C, Ren L. 2020.** Recent progress on the diagnosis of 2019 Novel Coronavirus. *Transboundary and Emerging Diseases* 67(4): 1485-1491. doi.org/10.1111/tbed.13620.
39. **Li D, Zhang J, Li J. 2020.** Primer design for quantitative real-time PCR for the emerging Coronavirus SARS-CoV-2. *Theragnostic* 1;10(16):7150-7162. doi: 10.7150/thno.47649.
40. **Liew A, Carpenter A, Moore A, Wallace R, Hamer S, Hamer G, Fischer R, Zecca I, Davila E, Auckland L, Rooney J, Killian M, Tell R, Rekant S, Burrell S, Ghai R, Behravesh B, Companion Animals Working Group. 2023.** Clinical and epidemiologic features of SARS-CoV-2 in dogs and cats compiled through national surveillance in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*: 261(4): 480–489. doi.org/10.2460/javma.22.08.0375.
41. **Lin D, Liu L, Zhang M, Hu Y, Yang Q, Guo J, Dai Y, Xu Y, Cai Y, Chen X, Huang K, Zhang Z. 2020.** Evaluations of the serological test in the diagnosis of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) infections during the COVID-19 outbreak. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 39(12):2271-2277. doi: 10.1007/s10096-020-03978-6.
42. **Mahdy M, Younis W, Ewaida Z. 2020.** An overview of SARS-CoV-2 and Animal Infection. *Front Vet Sci* 7:596391.
43. **Nalla A, Casto A, Huang M, Perchetti G, Sampoleo R, Shrestha L, Wei Y, Zhu H, Jerónimo K, Greninger A. 2020.** Comparative Performance of SARS-CoV-2 Detection Assays Using Seven Different Primer-Probe Sets and One Assay Kit. *Journal of clinical microbiology* 58(6): e00557-20. doi.org/10.1128/JCM.00557-20.
44. **Oishee M, Ali T, Jahan N, Khandker S, Haq A, Khondoker M, Sil B, Lugova H, Krishnapillai A, Abubakar A, Kumar S, Haque M, Jamiruddin M, Adnan N. 2021.** COVID-19 Pandemic: COVID-19 Pandemic: Review of Contemporary and Forthcoming Detection Tools. *Infect Drug Resist* 14: 1049-1082. https://doi.org/10.2147/IDR.S289629.
45. **Okba N, Müller M, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel C, Corman V, Lamers M, Sikkema R, de Bruin E, Chandler F, Yazdanpanah Y, Le Hingrat Q, Descamps D, Houhou-Fidouh N, Reusken C, Bosch B, Drosten C, Koopmans M, Haagmans B. 2020.** Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis*. 26(7):1478-1488. doi: 10.3201/eid2607.200841.

46. **Ong D, Claas E, Breijer S, Vaessen N. 2020.** Comparison of the GeneFinder™ COVID-19 Plus RealAmp Kit on the sample-to-result Platform ELITE InGenius to the national reference method: An added value of N gene target detection? *Journal of clinical virology* 132: 104632. doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104632.
47. **Organización Mundial de la Salud. 2020.** Diagnóstico. [Internet], [4 mayo 2023]. Disponible en: <https://extranet.who.int/pqweb/vitro-diagnostics/coronavirus-disease-covid-19-pandemic-%E2%80%94-emergency-use-listing-procedure-eul-open>.
48. **Organización Panamericana de la Salud. 2021.** Guía para el análisis y la cuantificación del SARS-CoV-2 en aguas residuales. Washington, D.C. Informe técnico. 63p
49. **Pandit R, Matthews Q. 2023.** A SARS-CoV-2: Companion Animal Transmission and Variants Classification. *Pathogens: 12(6):775.* <https://doi.org/10.3390/pathogens12060775>.
50. **Paules C, Marston H, Fauci A. 2020.** Coronavirus Infections-More Than Just the Common Cold. *JAMA* 323(8):707-708. doi: 10.1001/jama.2020.0757.
51. **Panzerá Y, Mirazo S, Baz M, Techera C, Grecco S, Cancela F, Fuques E, Condon E, Calleros L, Camilo N, Fregossi A, Vaz I, Pessina P, Deshpande N, Pérez R, Benech A. 2023.** Detection and genome characterisation of SARS-CoV-2 P.6 lineage in dogs and cats living with Uruguayan COVID-19 patients. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 117: e220177. doi.org/10.1590/0074-02760220177.
52. **PetruzzIELLO A, Sabatino R, Catapane L, De Falco C, Petti A, Tripaldelli E, Loquercio G, Anecchiarico A, Salzillo A, Caradonna E, Maggi P. 2023.** Analytical performance evaluation of Lumipulse® SARS-CoV-2 antigen assay in 392 asymptomatic patients. *J Clin Lab Anal* 37(6): e24867. doi: 10.1002/jcla.24867.
53. **Piewbang C, Poonsin P, Lohavicharn P, Wardhani S, Dankaona W, Puenpa J, Poovorawan Y, Techangamsuwan S. 2022.** SARS-CoV-2 Transmission from Human to Pet and Suspected Transmission from Pet to Human Thailand. *Journal of clinical microbiology* 60(11): e0105822. doi.org/10.1128/jcm.01058-22
54. **Promega. 2023.** GoTaq® Probe One-Step RT-qPCR System Instructions for Use of Products A6120 and A6121.USA. Technical manual. 11p.

55. **Rabi F, Al Zoubi M, Kasasbeh G, Salameh D, Al-Nasser A. 2020.** SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. *Pathogens* 9(3): 231. doi.org/10.3390/pathogens9030231.
56. **Rastogi M, Pandey N, Shukla A, Singh S. 2020.** SARS coronavirus 2: from genome to infectome. *Respiratory Research* 21(1):1-15. doi:10.1186/S12931-020-01581-Z.
57. **Safiabadi S, LeBlanc J, Sadiq Z, Oyewunmio D, Camargo C, Nikpour B, Armanfard N, Sagan S, Jahanshahi S. 2021.** Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clinical microbiology reviews* 34(3): e00228-20. doi.org/10.1128/CMR.00228-20.
58. **Schiaffino F, Ferradas C, Jara L, Salvatierra G, Dávila A, Sanchez C, Ulloa A, Mascaro L, Pajuelo, M, Guevara L, Fernandez M, Zimic M. 2021.** First Detection and Genome Sequencing of SARS-CoV-2 Lambda (C.37) Variant in Symptomatic Domestic Cats in Lima, Peru. *Frontiers in veterinary science* (8): 737350. doi.org/10.3389/fvets.2021.737350.
59. **Sharun K, Dhama K, Pawde A, Gortázar C, Tiwari R, Bonilla D, Rodriguez A, De la Fuente J, Michalak I, Attia Y. 2021.** SARS-CoV-2 in animals: potential for unknown reservoir hosts and public health implications. *Vet Q* 41(1):181-201. doi: 10.1080/01652176.2021.1921311.
60. **Shen M, Zhou Y, Ye J, Ahmed A, AL-maskri A, Kang Y, Zeng S, Cai S. 2020.** Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J Pharm Anal* 10(2):97. doi: 10.1016/J.JPHA.2020.02.010.
61. **Sparrer M, Hodges N, Sherman T, VandeWoude S, Bosco-Lauth A, Mayo C. 2023.** Role of Spillover and Spillback in SARS-CoV-2. *Transmission and the Importance of One Health in Understanding the Dynamics of the COVID-19 Pandemic.* *J Clin Microbiol.* doi: 10.1128/jcm.01610-22. Epub ahead of print.
62. **Subdudhi S, Voutouri C, Hardin C, Nikmaneshi M, Patel A, Verma A, Khandekar M, Dutta S, Stylianopoulos T, Jain M. 2021.** Strategies to minimize heterogeneity and optimize clinical trials in Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): Insights from mathematical modelling. *EBioMedicine*, 75:103809. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103809.
63. **Sun B, Feng Y, Mo X, Zheng P, Wang Q, Li P, Peng P, Liu X, Chen Z, Huang H, Zhang F, Luo W, Niu X, Hu P, Wang L, Peng H, Huang Z, Feng L, Li F, Zhang**

- F, Li F, Zhong N, Chen L. 2020.** Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* 9:940–948. 10.1080/22221751.2020.1762515.
64. **Soto G. 2020.** Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta. *Inmune International journal of odontostomatology* 14(3):331-337.
65. **Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. 2013.** Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad* 2(2): 70-78. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invisdis/ir-2013/ir132d.pdf>.
66. **Tang T, Bidon M, Jaimes J, Whittaker G, Daniel S. 2020.** Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Res* 178:104792. doi: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2020.104792.
67. **Tombuloglu H, Sabit H, Al-Suhaimi E, Jindan R, Alkharsah K. 2021.** Development of multiplex real-time RT-PCR assay for the detection of SARS-CoV-2. *Plos One* 16(4). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.025094.
68. **Valadan R, Golchin S, Alizadeh-Navaei R. 2022.** Differential gene expression analysis of common target genes for the detection of SARS-CoV-2 using real time-PCR. *AMB Expr* 12:112. doi.org/10.1186/s13568-022-01454-2.
69. **Volpato G, Fontefrancesco M, Gruppuso P, Zocchi D, Andrea Pieroni. 2020.** Baby pangolins on my plate: possible lessons to learn from the COVID-19 pandemic. *J Ethnobiology Ethnomedicine* 16(1) 19doi.org/10.1186/s13002-020-00366-4.
70. **Walls A, Park Y, Tortorici M, Wall A, McGuire A, Velesler D. 2020.** Estructura, función y antigenicidad de la glicoproteína espiga del SARS-CoV-2. *Celda* 181 :281-292. 10.1016/j.cell.2020.02.058.
71. **Wegrzynska K, Komiazek M, Walory J, Kozinska A, Wasko I, Baraniak A. 2022.** Differentiation of SARS-CoV-2 Variants Using RT-qPCRs by Targeting Recurrent Mutation Sites: A Diagnostic Laboratory Experience from Multi-Center Regional Study, August. *Int J Mol Sci* 23(16):9416. doi: 10.3390/ijms23169416.
72. **Yuce M, Filiztekin E, Özkaya K. 2021.** COVID-19 diagnosis. A review of current methods. *Biosens Bioelectron* 172:112752.
73. **Zhao Z, Zhang F, Xu M, Huang K, Zhong W, Cai W, Yin Z, Huang S, Deng Z, Wei M, Xiong J, Hawkey P. 2003.** Description and clinical treatment of an early

outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. *J Med Microbiol* 8:715-720. doi: 10.1099/jmm.0.05320-0.

74. **Zheng J. 2020.** SARS-CoV-2: an Emerging Coronavirus that Causes a Global Threat. *International journal of biological sciences* 16(10): 1678–1685. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45053>.

75. **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. 2020.** China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382(8):727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.

VIII. ANEXOS

Sequence Name	< Pos = 564
<input checked="" type="checkbox"/> Consensus	-AC-GAC-AGCAA-G-TCACA-TT-TAGATCTAGTGCTCGCAGTGATTCATACCTA-AGTAACAAGTCCCAAGGATGCCAACAGATTCGTT--TGGAATA-
8 Sequences	570 580 590 600 610 620 630 640 650 660
AY567487-HCoV-NL63-HUMANO.seq	-----CTCATCTCGTGCTAGCAGTCTTCAACTC--GTAACAACCTCAGGACTCTTCTCGTAGCACTT---CAAGACA
AY994055-FIPV-FELINO.seq	TACTGACAAACAAGGTCACG-TTCTAAACCTAGAGAAGTAGTGATTCCTAAACCTAGGGACACAACACCTAAGAAATGCCAACAAACACACC--TGGAAGA-
DQ811787-PRCV-PORCINO.seq	AACCCCTCCAGCAAGGTTCAAATTTGGAACTTATGTCCG-AGAGACTTTGTGCCAAAGGAATAGGTAATAGGGA--CCAACAGATTGGTTATTGGAATAG
DQ811789.2-TGEV-PORCINO.seq	AACCCCTCCAACAAGGTTCAAATTTGGAACTTATGTCCG-AGAGACTTTGTGCCAAAGGAATAGGTAACAGGGA--TCAACAGATTGGTTATTGGAATAG
EU420139-Bat-CoV HKU8-MURCIEL	-----CTAACTCAGCAGTCAGAGCAGTGGTG--GCAGCAAGTCTCGTCTAACTCTCAAAGCAGGG--ATAAT--
KF530123-FeCoV-GATO.seq	TACTGACAAGCAAAGGTCACG-TTCAAATCTGGAGAAGTAGTGATTCCTAAATCTAGAGATACAACACCTAAATAAATGCCAATAAACACACC--TGGAAGA-
NC_003436-PEDV-PORCINO.seq	GCAGGAGTCGTGGCAATGGCAACATAGGTCATAGATCTCCAAGTAACAACAGAGGCA--ATAACCAAGTCCCGTGGTAATTCACAGAATCGTG---GAAATAA
qPCR.1F (561-585).seq	-----CTCATCAGTAGTCGCAACAGTTC

Anexo 1. Alineamiento de las secuencias del gen N de animales positivos a *Alfacoronavirus* para observar la unión del oligonucleótido Forward.

Sequence Name	< Pos = 746
Consensus	-TGATGCTGTTGCCAAATTTAAGBCTGA-TTAGATGGTACCCTCT-GGATAGCXXAXXXXGXTXXCATXAXXXXXXXXXXXCTTKGGXAGTXXXXXXXX
8 Sequences	750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
AY567487-HCoV-NL63-HUMANO.seq	-TAAGCCTCTTCTCAACCCAGGCTGA--TAAGCCTTCCAGTTGAAGAAA
AY994055-FIPV-FELINO.seq	-TGATCTCGTTGCCAATGGTAACBCTG--CCAAATGCTACCCTC--AGATAGCTCAATGTGTT-CCATCAGTGTCTAGCATAATCTTTGGCAGTCAATGGTC
DQ811787-PRCV-PORCINO.seq	CTCATGCAGATGCCAAATTTAAAACAAATTAGATGGAGTTGTCT-GGGTTGCCAAGGATGGTGCATGAACAAACCACTACTCTT-GGTAGTCGTGGTGC
DQ811789.2-TGEV-PORCINO.seq	CTCATGCAGATGCCAAATTTAAAACATAAATTAGAAGGAGTTGTCT-GGGTTGCCAAGGATGGTGCATGAACAAACCAACACGCTT-GGTAGT
EU420139-Bat-CoV HKU8-MURCIEL	
KF530123-FeCoV-GATO.seq	-TGATCTCGTTGCCAATGGTAACBCTG--CCAAATGCTACCCTC--AGATAGCTCAATGCGTT-CCATCAGTGTCTAGCAGTCTTCCGGTAGTCAATGGTC
NC_003436-PEDV-PORCINO.seq	TCAAGGATGCACTTAATCTTTGGATTGGAGAAAATCTGACAGGCATAAGCAACAGCAGAAGCCTAAGCAGGAAAAGCTGACACACAGCGGCCAAAATA
qPCR.1R.RC (672-696).seq	-----TGA--CAGATTGAACCAGCT-TGAGAGC

Anexo 2. Alineamiento de las secuencias del gen N de animales positivos a *Alfacoronavirus* para observar la unión del oligonucleótido Reverse.

Sequence Name	< Pos = 1	< Pos = 548
Consensus	TGCCAAACGCAACCCCAACAMTCTTAAACATCAGCTGCTACCTCTCCGATT	AAACCAACTAAGGACAAGAAGCCTGACAAACAAGACCAGTCTGCTAAA
3 Sequences	10 20 30 40 50	550 560 570 580 590
JQ065042.2-CoV HKU15-44-PORCINO	TGCCAAACGCAACCCCAACAMTCTTAAACATCAGCTGCTACCTCTCCGATT	AAACCAACTAAGGACAAGAAGCCTGACAAACAAGACCAGTCTGCTAAA
KJ620016-PORCINE M16148-PORCINO	TGCCAAACGCAACCCCAACAMTCTTAAACATCAGCTGCTACCTCTCCGATT	AAACCAACTAAGGACAAGAAGCCTGACAAACAAGACCAGTCTGCTAAA
qPCR.1F (561-585).seq	CTCATCAGTGTAGTGCACACAGTTC	

Anexo 3. Alineamiento de las secuencias del gen N de animales positivos a *Deltacoronavirus* para observar la unión del oligonucleótido Forward.

Sequence Name	< Pos = 545
Consensus	ACCAAACCAACTAAGGACAAGAAGCCTGACAAACAAGACCAGTCTGCTAAA
3 Sequences	550 560 570 580 590
JQ065042.2-CoV HKU15-44-PORCINO	ACCAAACCAACTAAGGACAAGAAGCCTGACAAACAAGACCAGTCTGCTAAA
KJ620016-PORCINE M16148-PORCINO	ACCAAACCAACTAAGGACAAGAAGCCTGACAAACAAGACCAGTCTGCTAAA
qPCR.1R.RC (672-696).seq	-----TGACAGATTGAACCAGCTTGAAGAGC

Anexo 4. Alineamiento de las secuencias del gen N de animales positivos a *Deltacoronavirus* para observar la unión del oligonucleótido Reverse.

Sequence Name	< Pos = 351		< Pos = 1096
Consensus	AAGGAGAXGGAGCGAAG	CCAGTCAGTTGTCTGAAGCAGGTTCCGKXGATGTGAATAAATTTCCA	GGTTTTCTCGACGATGGAAGTGGTGATCTTGAXTG
3 Sequences	0 360	370 380 390 400 410	1100 1110 1120 1130
KF793826-DOLPHIN CoV-GAMMACoV.	AAGGAGAAGGAGCGAAG	CCAGTCAGTTGTCTGAAGCAGGTTCCGCGATGTGAATAAATTTCCA	GGTTTTCTCGACGATGGAAGTGGTGATCTTGAAATG
NC_010646-WHALE CoV-GAMMACoV.s	AAGGAGATGGAGCGAAG	CCAGTCAGTTGTCTGAAGCAGGTTCCGTGATGTGAATAAATTTCCA	GGTTTTCTCGACGATGGAAGTGGTGATCTTGAGTG
qPCR.1F (561-585).seq	-----	CTCATCAGTAGTCGCAACAGTTC	

Anexo 5. Alineamiento de las secuencias del gen N de animales positivos a Gammacoronavirus para observar la unión del oligonucleótido Forward.

Sequence Name	< Pos = 973		< Pos = 1109
Consensus	CCACTACATTC	TGGAGTCCAGAAGAACTCAAGAGCGGTCAAAGTCGAGAGATCGTACTGAT	ATGGAAGTGGTGATCTTGAXTGGTCTGAAGCXTAX
3 Sequences	980	990 1000 1010 1020 1030 1	1110 1120 1130 1140
KF793826-DOLPHIN CoV-GAMMACoV.	CCACTACATTC	TGGAGTCCAGAAGAACTCAAGAGCGGTCAAAGTCGAGAGATCGTACTGAT	ATGGAAGTGGTGATCTTGAAATGGTCTGAAGCXTA
NC_010646-WHALE CoV-GAMMACoV.s	CCACTACATTC	TGGAGTCCAGAAGAACTCAAGAGCGGTCAAAGTCGAGAGATCGTACTGAT	ATGGAAGTGGTGATCTTGAGTGGTCTGAAGCATAA
qPCR.1R.RC (672-696).seq	-----	TGACAGATTGAACAGCTTGAGAGC	

Anexo 6. Alineamiento de las secuencias del gen N de animales positivos a Gammacoronavirus para observar la unión del oligonucleótido Reverse.