



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo**

**ESTABLECIMIENTO DE UNA PRUEBA DE ELISA DOBLE  
ANTÍGENO MULTIESPECIE PARA EVALUAR ANTICUERPOS  
ANTI SARS-COV-2 EN ANIMALES DE COMPAÑÍA**

---

Por:

**Maritza Alejandra Cordero Ortiz**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Maritza Alejandra Cordero Ortiz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



---

Dra. Verónica Mata Haro  
Directora de tesis



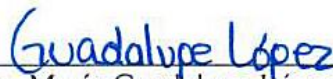
---

Dr. Jesús Hernández López  
Integrante del comité de tesis



---

M en C Mónica Reséndiz Sandoval  
Integrante del comité de tesis



---

Dra. María Guadalupe López Robles  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Establecimiento de una Prueba de ELISA Doble Antígeno Multiespecie para Evaluar Anticuerpos Anti SARS-CoV-2 en Animales de Compañía” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Maritza Alejandra Cordero Ortiz, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**  
Coordinación de Programas Académicos

  
Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo prestado durante el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.) por proveer las instalaciones, así como el apoyo y aprendizaje por parte del personal docente y administrativo.

A Freddy Dehesa y Mario Hernández del laboratorio de diagnóstico de bioseguridad nivel 3 (LBS3) de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA) del Servicio Nacional de Control de Enfermedades, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) por su apoyo en la evaluación de los sueros por microneutralización.

Al comité de tesis: a la Dra. Verónica Mata por abrirme las puertas a este equipo de trabajo, por sus aportaciones al proyecto, su seguimiento en mis avances, así como sus comentarios que me ayudaron a desarrollarme durante este camino. Al Dr. Jesús Hernández por su constante apoyo, seguimiento e interés durante el desarrollo de esta tesis, por sus enseñanzas, aportaciones, comentarios y discusiones sobre los resultados planteados aquí, que me ayudaron a crecer.

A la Maestra en Ciencias Mónica Reséndiz, por sus aportaciones en las reuniones de comité, por su apoyo en el trabajo diario del laboratorio, por responder mis dudas y aportar a mi crecimiento durante la maestría. A la Dra. María Guadalupe López, por sus aportaciones a este proyecto y su retroalimentación en las reuniones de comité que permitieron a un mejor desarrollo de mi tesis.

Al equipo de trabajo perteneciente al Laboratorio de Inmunología de la coordinación de Nutrición, así como al Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la coordinación de Ciencia de los Alimentos. Gracias por enseñarme y apoyarme, por generar un buen ambiente de aprendizaje y ayuda mutua, y por los buenos momentos compartidos. Un agradecimiento especial a las personas que se involucraron y me ayudaron en este proyecto de una u otra forma: Verónica Vázquez y Alma Vázquez, por su apoyo en el laboratorio y porque además me llevo su amistad.

A mis padres, Luis Cordero y Eduwiges Ortiz por su apoyo constante en todo momento, por estar siempre que lo necesitaba, escucharme, aconsejarme y ayudarme de todas las maneras, porque sin ustedes nada de esto sería posible. A mis hermanos, Luis Francisco, Marlen y Denisse por estar para mí cuando lo necesitara, escucharme y apoyarme constantemente, y a mis sobrinos Regina,

Emiliano y Luis, por ser una motivación. A mi novio, Carlos Gracia por escucharme constantemente, por sus palabras de aliento y por creer en mí. A mis amigas Arantxa, Melissa, Tania, Aneth y Zaira por escucharme y por los momentos de diversión que me ayudaron durante la pandemia y mi maestría.

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, porque gracias a su apoyo inicié y continué en el camino de la ciencia. Esta tesis les pertenece.*

## CONTENIDO

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>APROBACIÓN.....</b>                                                       | <b>2</b>  |
| <b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....</b>                                        | <b>3</b>  |
| <b>AGRADECIMIENTOS.....</b>                                                  | <b>4</b>  |
| <b>DEDICATORIA.....</b>                                                      | <b>6</b>  |
| <b>CONTENIDO.....</b>                                                        | <b>7</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                                 | <b>9</b>  |
| <b>LISTA DE CUADROS.....</b>                                                 | <b>11</b> |
| <b>RESUMEN.....</b>                                                          | <b>12</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                         | <b>13</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>                                                  | <b>14</b> |
| <b>2. ANTECEDENTES.....</b>                                                  | <b>16</b> |
| 2.1. Enfermedad por Coronavirus del 2019.....                                | 16        |
| 2.1.1. Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad.....                        | 16        |
| 2.1.2. Tasa de Fatalidad a Nivel Mundial.....                                | 18        |
| 2.1.3. Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2.....             | 19        |
| 2.1.3.1. Género de los <i>Betacoronavirus</i> .....                          | 19        |
| 2.1.3.2. Receptor viral y mecanismos involucrados en la entrada celular..... | 21        |
| 2.2. Transmisión de los <i>Betacoronavirus</i> Mediante Animales.....        | 23        |
| 2.2.1. Transmisión Zoonótica de los Virus SARS-CoV y MERS-CoV.....           | 23        |
| 2.2.2. Cruce de la Barrera entre Especies por SARS-CoV-2.....                | 24        |
| 2.3. SARS-CoV-2 en Animales de Compañía.....                                 | 27        |
| 2.3.1. Papel de los Animales de Compañía en la Transmisión Viral.....        | 27        |
| 2.3.2. Identificación y Casos Reportados en Gatos y Perros.....              | 29        |
| 2.4. Técnicas para Detección de SARS-CoV-2 en Animales de Compañía.....      | 36        |
| 2.4.1. Métodos Moleculares.....                                              | 36        |
| 2.4.2. Métodos Serológicos.....                                              | 37        |
| 2.4.2.1. Respuesta inmune humoral contra SARS-CoV-2.....                     | 37        |
| 2.4.2.2. Pruebas serológicas para la detección de anticuerpos.....           | 38        |
| <b>3. HIPÓTESIS.....</b>                                                     | <b>44</b> |
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>                                                     | <b>45</b> |
| 4.1. Objetivo General.....                                                   | 45        |
| 4.2. Objetivos Específicos.....                                              | 45        |
| <b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                          | <b>46</b> |
| 5.1. Muestras serológicas: Obtención y Almacenamiento.....                   | 46        |
| 5.2. Detección de Anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en Perros y Gatos.....         | 47        |

## CONTENIDO (continuación)

|                                                                                                |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2.1. Detección de Anticuerpos IgG de Perros contra la Proteína N, S1 y RBD Recombinante..... | 47         |
| 5.2.1.1. ELISA indirecta.....                                                                  | 47         |
| 5.2.1.2. ELISA doble antígeno.....                                                             | 50         |
| 5.2.2. Detección de Anticuerpos Neutralizantes de Perros y Gatos contra SARS-CoV-2.....        | 50         |
| 5.2.2.1. Prueba de neutralización simulada.....                                                | 50         |
| 5.2.2.2. Prueba de microneutralización.....                                                    | 51         |
| 5.3. Análisis Estadístico.....                                                                 | 52         |
| <b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>                                                          | <b>54</b>  |
| 6.1. ELISA Indirecta.....                                                                      | 54         |
| 6.2. ELISA Doble Antígeno.....                                                                 | 69         |
| 6.3. Prueba de Neutralización Simulada.....                                                    | 84         |
| 6.4. Comparación entre Pruebas y Valores de Frecuencia.....                                    | 86         |
| <b>7. CONCLUSIONES.....</b>                                                                    | <b>100</b> |
| <b>8. RECOMENDACIONES.....</b>                                                                 | <b>101</b> |
| <b>9. REFERENCIAS.....</b>                                                                     | <b>102</b> |



## LISTA DE FIGURAS

| Figura                                                                                                                                                                                                                                      | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 Cadena de transmisión del virus SARS-CoV-2 en diversas especies y su relación con el humano.....                                                                                                                                          | 29     |
| 2 Estandarización del uso de anticuerpos secundarios en las pruebas de ELISA indirecta en perros y gatos.....                                                                                                                               | 55     |
| 3 Optimización de diluyentes para la estandarización de la prueba de ELISA Indirecta para disminuir las uniones inespecíficas.....                                                                                                          | 57     |
| 4 Sueros de gatos evaluados mediante ELISA Indirecta contra los antígenos S1, N o RBD de SARS-CoV-2 (n=31).....                                                                                                                             | 60     |
| 5 Sueros de perros evaluados mediante ELISA Indirecta contra los antígenos S1, N o RBD de SARS-CoV-2 (n=453).....                                                                                                                           | 61     |
| 6 Curvas ROC de las pruebas de ELISA indirecta para distintos antígenos con base a la prueba de microneutralización en muestras serológicas de gatos.....                                                                                   | 64     |
| 7 Curvas ROC de las pruebas de ELISA indirecta para distintos antígenos con base a la prueba de microneutralización en muestras serológicas de perros.....                                                                                  | 65     |
| 8 Correlación entre la prueba de ELISA indirecta para distintos antígenos y la prueba de microneutralización en muestras serológicas de gatos.....                                                                                          | 67     |
| 9 Correlación entre la prueba de ELISA indirecta para distintos antígenos y la prueba de microneutralización en muestras serológicas de perros.....                                                                                         | 68     |
| 10 Estandarización de concentraciones de proteína para el antígeno N soluble de reconocimiento y el antígeno N fijado de captura en la prueba de ELISA doble antígeno.....                                                                  | 71     |
| 11 Optimización de concentraciones probadas para el antígeno N soluble de reconocimiento y el antígeno N fijado de captura en la prueba de ELISA doble antígeno.....                                                                        | 72     |
| 12 Variación en las concentraciones del antígeno N de reconocimiento con concentraciones de 3 µg/mL y 5 µg/mL del antígeno N de captura en la prueba de ELISA doble antígeno con muestras serológicas de humanos positivas y negativas..... | 72     |
| 13 Estandarización de ELISA doble antígeno con la proteína RBD de captura y RBD de reconocimiento a una concentración de 2 µg/mL cada una, utilizando muestras serológicas de humanos positivas y negativas.....                            | 73     |
| 14 Comparación de pruebas de ELISA de antígeno simple (N o RBD) y doble antígeno (N + RBD) en sueros de humano.....                                                                                                                         | 75     |
| 15 Detección de anticuerpos contra el antígeno N de SARS-CoV-2 con una prueba ELISA doble antígeno en sueros de humanos.....                                                                                                                | 76     |

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

| Figura                                                                                                                                                                                                              | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 16 Correlación entre la prueba de ELISA doble antígeno para antígenos de SARS-CoV-2 y la prueba de microneutralización en muestras serológicas de gatos.....                                                        | 78     |
| 17 Correlación entre la prueba de ELISA doble antígeno para antígenos de SARS-CoV-2 y la prueba de microneutralización en muestras serológicas de perros.....                                                       | 79     |
| 18 Curvas ROC de las pruebas de ELISA doble antígeno para distintas proteínas con base a la prueba de microneutralización en muestras serológicas de gatos.....                                                     | 81     |
| 19 Curvas ROC de las pruebas de ELISA doble antígeno para distintas proteínas con base a la prueba de microneutralización en muestras serológicas de perros.....                                                    | 82     |
| 20 Correlación entre la prueba de ELISA doble antígeno para antígenos de SARS-CoV-2 y la prueba de microneutralización en muestras serológicas de humanos.....                                                      | 83     |
| 21 Correlación entre la prueba de neutralización simulada para SARS-CoV-2 y la prueba de microneutralización en muestras serológicas de gatos y perros.....                                                         | 85     |
| 22 Curvas ROC de las pruebas de neutralización simulada con base a la prueba de microneutralización en muestras serológicas de perros y gatos.....                                                                  | 86     |
| 23 Alineamiento múltiple de la proteína N de SARS-CoV-2 con las proteínas N de coronavirus caninos (coronavirus canino y coronavirus respiratorio canino) y de coronavirus felinos (coronavirus felino y FIPV)..... | 93     |

## LISTA DE CUADROS

| Cuadro                                                                                                                                                                                                        | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 Tasa de fatalidad de casos a nivel mundial, para México y los países con mayor cantidad de casos reportados hasta septiembre de 2022.....                                                                   | 18     |
| 2 Evaluación de la infección por SARS-CoV-2 en animales de compañía.....                                                                                                                                      | 30     |
| 3 Casos reportados de COVID-19 en perros de México por la OIE, para marzo 2022.                                                                                                                               | 35     |
| 4 Estandarización de anticuerpo secundario y solución de bloqueo para ELISA indirecta contra antígeno N.....                                                                                                  | 55     |
| 5 Valores de corte y fórmulas para las pruebas de ELISA Indirecta en perros y gatos...                                                                                                                        | 59     |
| 6 Valores de corte y fórmulas para las pruebas de ELISA Doble Antígeno en perros, gatos y humanos.....                                                                                                        | 74     |
| 7 Sensibilidad, especificidad y área bajo la curva (AUC) de seis pruebas de ELISA y neutralización simulada en muestras de gatos para dos puntos de corte distintos en la prueba de microneutralización.....  | 87     |
| 8 Sensibilidad, especificidad y área bajo la curva (AUC) de seis pruebas de ELISA y neutralización simulada en muestras de perros para dos puntos de corte distintos en la prueba de microneutralización..... | 88     |
| 9 Coeficientes de correlación entre las diversas pruebas desarrolladas para detectar anticuerpos contra SARS-CoV-2 en perros y gatos con la prueba de microneutralización.....                                | 95     |
| 10 Frecuencias por prueba para detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2 en muestras de gatos del estado de Sonora.....                                                                                      | 97     |
| 11 Frecuencias por prueba para detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2 en muestras de perros del estado de Sonora.....                                                                                     | 98     |

## RESUMEN

El coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2) ha causado más de 6 millones de muertes en humanos a nivel mundial. La infección por este patógeno también se ha reportado en perros y gatos, principalmente en países desarrollados. Hasta el momento, los reportes indican que la transmisión es principalmente de humanos a mascotas, es decir, de tipo antropozoonótica. En México, aún no existen estudios que determinen la presencia de anticuerpos específicos en mascotas para evaluar este problema, ni pruebas de ELISA desarrolladas con este fin. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una prueba de ELISA doble antígeno multiespecie para determinar la presencia de anticuerpos contra SARS-CoV-2 en perros y gatos. Con este fin, se obtuvieron muestras serológicas de perros y gatos de clínicas veterinarias en la ciudad de Hermosillo, Sonora. Para la determinación de anticuerpos, se desarrollaron pruebas de ELISA de tipo indirecto, dirigidas contra diferentes antígenos de SARS-CoV-2: la proteína de la espiga (S1), la proteína de la nucleocápside (N) y la proteína del dominio de unión al receptor (RBD). Además, se desarrollaron pruebas de ELISA de doble antígeno contra la proteína N, la proteína RBD y una prueba contra ambas proteínas. Se definieron puntos de corte utilizando la media aritmética de los datos más la desviación estándar y los resultados se expresaron en unidades arbitrarias. Además, se utilizó una prueba de microneutralización como referencia para obtener la sensibilidad, especificidad, curvas ROC, el valor del AUC y para correlacionar los resultados de las pruebas de ELISA. Para los gatos, la prueba con mejor sensibilidad (80%), especificidad (100%) y AUC (88%) fue ELISA de doble antígeno con ambas proteínas, mientras que para los perros fue la prueba de neutralización simulada con la sensibilidad (65%), especificidad (87.36%) y AUC (89.1%) más elevados. Sin embargo, la prueba de ELISA doble antígeno con ambos antígenos tuvo una buena sensibilidad y especificidad al evaluar muestras con títulos de microneutralización sobre 1:20. Además, las muestras de humanos infectados y/o vacunados se pudieron detectar mediante esta prueba. En conclusión, se logró desarrollar una prueba de ELISA doble antígeno de tercera generación contra dos antígenos de SARS-CoV-2, la proteína N y el RBD. Aunado a esto, la frecuencia de anticuerpos en gatos fue significativamente mayor que en perros, lo que coincide con diversos estudios en otros países.

**Palabras clave:** ELISA, SARS-CoV-2, perros, gatos.

## ABSTRACT

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has caused more than 6 million human deaths globally. Infection by this pathogen has been reported in dogs and cats, mainly in developed countries. So far, reports indicate that the infection is transmitted principally from humans to pets, that is anthroponotic transmission. In Mexico, there are still no studies that determine the presence of specific antibodies in pets to evaluate this problem, nor ELISA tests developed for this purpose. Therefore, the objective of this work was to develop a multispecies double antigen ELISA test to determine the presence of antibodies against SARS-CoV-2 in dogs and cats. For this purpose, serological samples were obtained from dogs and cats from veterinary clinics in Hermosillo, Sonora. For the determination of antibodies, indirect ELISA tests were developed, directed against different SARS-CoV-2 antigens: the S1 spike protein, the nucleocapsid protein (N) and the receptor binding domain (RBD) protein. In addition, double antigen ELISA tests using the N protein or the RBD protein, or both proteins were developed. Cut-off points were defined using the arithmetic mean of the data plus the standard deviation, and the results were expressed as arbitrary units. In addition, a microneutralization test was used as a reference to obtain the sensitivity, specificity, ROC curves, the AUC value and to correlate the results of the ELISA tests. For cats, the test with the best sensitivity (80%), specificity (100%), and AUC (88%) was the double antigen ELISA with both proteins, and for dogs it was the surrogate neutralization test with the highest sensitivity (65%), specificity (87.36%) and AUC (89.1%). However, the double antigen ELISA using both antigens had good sensitivity and specificity when evaluating samples with microneutralization titers above 1:20. In addition, samples from infected and/or vaccinated humans could be detected by this test. In conclusion, it was possible to develop a third-generation double antigen ELISA using two SARS-CoV-2 antigens. In addition, the seroprevalence in cats was significantly higher than in dogs, which has also been published in different studies across the world.

**Key words:** ELISA, SARS-CoV-2, dogs, cats.

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad por coronavirus del 2019 (COVID-19) fue descrita por primera vez en diciembre de 2019 en Wuhan, China. Es causada por SARS-CoV-2, que afecta principalmente al tracto respiratorio superior en el humano (Hu *et al.*, 2020). Hasta el momento ha provocado cerca de 600 millones de casos y más de 6 millones de muertes en todo el mundo (OMS, 2021). SARS-CoV-2 puede infectar a diversos animales, entre los que se encuentran animales de compañía como perros y gatos, comúnmente conocidos como mascotas, y cuya infección se ha relacionado a un contagio directo con sus dueños (Leroy *et al.*, 2020). A la fecha, solo existen reportes de transmisión antropozoonótica, es decir, del humano hacia la mascota, pero no de la mascota hacia el humano (Hernández *et al.*, 2020). Por ende, la alta cantidad de casos por COVID-19 en humanos es un potencial riesgo para la transmisión antropozoonótica de SARS-CoV-2 hacia animales de compañía. Además, en México 7 de cada 10 hogares cuenta con un animal de compañía, y hay aproximadamente 28 millones de animales domésticos en total (Gómez, 2018). Debido a la relación cercana y la gran cantidad de tiempo de convivencia del humano con los animales de compañía, su papel en la cadena de transmisión de SARS-CoV-2 podría ser importante tanto en el ámbito científico como social.

Hasta el momento, diversos autores han reportado la infección por SARS-CoV-2 en animales de compañía. Algunos casos aislados de perros y gatos que cursaron con COVID-19 fueron asintomáticos, con la muerte de un perro posterior a la infección (Garigliany *et al.*, 2020; Leroy *et al.*, 2020; Sit *et al.*, 2020). No obstante, estos casos no reflejan la situación a mayor escala de una cierta región, como los estudios epidemiológicos. En Francia se reportó una seroprevalencia de 23.5% de gatos y 15.4% de perros con anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2, todos provenientes de hogares con pacientes infectados (Fritz *et al.*, 2020). Sin embargo, sus resultados se limitan a su población, pudiendo ser distintos en otros países. De igual manera, en Wuhan se encontró una seroprevalencia de 14.7% en gatos con IgG anti-SARS-CoV-2, pero no se incluyeron muestras de perros, y sus resultados tampoco definen la situación de otros países (Zhang *et al.*, 2020). Por otra parte, Temmam y colaboradores (2020) reportaron ausencia de anticuerpos en suero de perros y gatos que tuvieron contacto previo con humanos sospechosos de COVID-19. No obstante, solo se confirmó la infección de dos dueños que tuvieron contacto con las mascotas, por lo que este pudo

no darse en los 19 animales restantes. Esta evidencia respalda la existencia de la infección en perros y gatos, pero no revela la situación epidemiológica de otros países como México.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), lleva un registro de los casos de infección por SARS-CoV-2 en animales de todo el mundo. En México se han reportado 10 casos positivos en perros, y aún no existen reportes de caso en gatos, lo que podría deberse a que la población de perros es mayor (85%) en comparación a la de gatos (15%), cuya enfermedad podría estar subestimada (INEGI, 2014; OIE, 2021). Así también, en el país aún no existen reportes seroepidemiológicos sobre la infección en animales de compañía. En Veracruz, no se logró detectar material genético de SARS-CoV-2 en perros y gatos. Sin embargo, el tiempo para la toma de muestra fue dos semanas después del contacto con humanos infectados, lo que pudo influir en sus resultados (Sánchez-Montes *et al.*, 2021). Además, no se utilizaron pruebas serológicas para detectar una infección previa a la toma de muestra. Entonces, en México aún no se ha determinado la prevalencia de la COVID-19 en animales de compañía.

Definir la situación epidemiológica de la infección en perros y gatos de México puede prevenir que se infecten, la replicación viral y la generación de nuevas variantes virales (Bonilla-Aldana *et al.*, 2020). Para este fin, las pruebas serológicas son ampliamente utilizadas ya que la mayoría son sencillas y poco invasivas. Entre estas, el Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) presenta otras ventajas como que es económica, rápida y permite evaluar una gran cantidad de muestras (Eftekhar *et al.*, 2021). La mayoría de los estudios publicados hasta el momento utilizan la prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos en perros y gatos, mientras que algunos otros utilizan una prueba de ELISA doble antígeno. Sin embargo, aún no existen estudios que comparen el uso de las distintas pruebas de ELISA, ni de los distintos antígenos utilizados en las mismas. La prueba de ELISA doble antígeno ha demostrado una mejor sensibilidad y especificidad al desarrollarse para otros patógenos como VIH en comparación a la prueba de ELISA indirecta (Barik *et al.*, 2018). Con base en esto, se espera que el desarrollo de una prueba ELISA doble antígeno para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2 sea más sensible y específica que la prueba de ELISA indirecta.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Enfermedad por Coronavirus del 2019**

La COVID-19 es provocada por el agente etiológico SARS-CoV-2, y fue descrita por primera vez en diciembre del 2019 en Wuhan, China, siendo en la actualidad uno de los mayores problemas de salud pública. En poco tiempo el virus se expandió en China convirtiéndose en una epidemia, y posteriormente los casos fueron descritos en diversos países, hasta finalmente ser declarada pandemia por la Organización Mundial de la Salud el día 11 de marzo de 2020 (OMS, 2021). Esta enfermedad ha generado muchas consecuencias como el aumento en la mortalidad a causa del virus, impactos negativos en la salud mental, la pérdida de empleos, deterioro en la economía y educación. Así también, la COVID-19 ha provocado una saturación de servicios de salud y secuelas a largo plazo en las personas que han sido infectadas (Burgess y Sievertsen, 2020; Cullen *et al.*, 2020; McKibbin y Fernando, 2020). Debido a que se trata de una enfermedad nueva, es importante seguir estudiando el mecanismo de transmisión del virus, posibles tratamientos y formas de prevención.

#### **2.1.1. Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad**

La COVID-19 se puede manifestar de forma asintomática, moderada, severa o hasta un estado crítico y finalmente la muerte. Los síntomas suelen presentarse en un lapso de 5 a 14 días después de tener contacto con el virus, y están restringidos en su mayoría al tracto respiratorio superior (Hu *et al.*, 2020). Los más comunes son la fiebre, la tos y la disnea; y en menor medida escalofríos, fatiga, mialgia, dolor de garganta, congestión nasal, rinorrea, náuseas, vómito y diarrea. De igual manera, la anosmia (pérdida del olfato) y ageusia (pérdida del gusto), se han reportado más frecuentemente que en otras infecciones virales (Vahey *et al.*, 2021). La presencia de estos síntomas es importante para realizar un diagnóstico adecuado de la enfermedad, y se ha relacionado



con diversos factores que influyen en su severidad.

Algunos factores de riesgo como edad avanzada, sexo masculino y diabetes se han asociado a mayor mortalidad por COVID-19; así como hipertensión, enfermedades cardiovasculares preexistentes, síntomas de disnea, obesidad y enfermedad renal crónica (Chidambaram *et al.*, 2020; Rozenfeld *et al.*, 2020). Por otra parte, los pacientes que presentan rinorrea, dolor de cabeza, mialgia, congestión nasal, dolor de garganta, anosmia o ageusia han mostrado un menor riesgo de ser hospitalizados. Mientras que aquellos con síntomas como disnea, vómito, estado mental alterado, deshidratación y sibilancias tienen mayor riesgo de requerir hospitalización (Vahey *et al.*, 2021). Por lo que identificar estos factores de riesgo resulta necesario para mejorar el tratamiento de los pacientes infectados.

A pesar de que la edad avanzada implica un riesgo de presentar la enfermedad, los niños y adolescentes también son susceptibles a contraerla. Los síntomas son muy similares a los que presentan los adultos y, en general, suele ser una enfermedad asintomática o moderada, con un menor porcentaje de enfermedad severa. En un metaanálisis que incluía países de América, China y España la incidencia de enfermedad severa fue mayor en niños menores a un año (Cui *et al.*, 2021). Por otra parte, aún no se tiene claro si el virus puede transmitirse en el embarazo de madre a hijo, es decir, por transmisión vertical. Algunos estudios relacionan la presencia del virus en placenta con complicaciones, y se han encontrado anticuerpos IgG e IgM en recién nacidos; sin embargo, el virus no ha sido aislado (Wastnedge *et al.*, 2021). Por ende, la población joven también es capaz de desarrollar la enfermedad, transmitirla y en pocos casos presentar complicaciones.

Una vez superada la enfermedad, se ha reportado sintomatología que se mantiene hasta seis meses después, así como posibles secuelas que se presentan usualmente en pacientes con enfermedad moderada o severa. La fatiga, anosmia y ageusia son los síntomas más comunes a largo plazo; entre otros se encuentran una disminución de la calidad de vida relacionada a la salud e impactos negativos en al menos una actividad diaria (Logue *et al.*, 2021). Algunas posibles secuelas son la fibrosis pulmonar a largo plazo, daño neurológico agudo (depresión respiratoria, demencia y convulsiones) y crónico (enfermedades neurodegenerativas) (Wang *et al.*, 2020). Por lo tanto, la COVID-19 no solamente se limita al desarrollo de la enfermedad, sino a diversas consecuencias que afectan la vida futura de las personas infectadas.

### 2.1.2. Tasa de Fatalidad a Nivel Mundial

Los reportes de casos de COVID-19 y el número de muertes a nivel mundial se han reportado a través de la Organización Mundial de la Salud (OMS); sin embargo, solamente se plasman los datos crudos de la enfermedad. Las medidas de frecuencia epidemiológicas para determinar la mortalidad son de gran utilidad debido a que eliminan las variaciones por el tamaño de la población en los diferentes países. En el cuadro 1 se muestran las tasas de fatalidad, obtenidas para los tres países con mayor cantidad de muertes reportadas y para México, al mes de marzo de 2022 (OMS, 2021). Con base a estos datos, se observa que la cantidad de muertes en México es muy elevada para la totalidad de los casos que se presentan en el país. Así también, la tasa de fatalidad de México es mucho mayor que la global y la de los países con mayor cantidad neta de muertes, como Estados Unidos. Esto puede deberse a los registros que se lleven a nivel nacional de la enfermedad y el uso de pruebas diagnósticas utilizadas para confirmar.

Cuadro 1. Tasa de fatalidad de casos a nivel mundial, para México y los países con mayor cantidad de casos reportados hasta septiembre de 2022.

| <b>País</b>             | <b>Número de Casos<br/>Totales Acumulados</b> | <b>Número de Muertes<br/>Totales Acumuladas</b> | <b>Tasa de Fatalidad<br/>(%)</b> |
|-------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Todos los Países</b> | 599,825,400                                   | 6,469,458                                       | 1.08                             |
| <b>Estados Unidos</b>   | 93,060,268                                    | 1,033,467                                       | 1.11                             |
| <b>India</b>            | 44,428,393                                    | 527,874                                         | 1.19                             |
| <b>Brasil</b>           | 34,397,205                                    | 683,622                                         | 1.99                             |
| <b>México</b>           | 7,014,510                                     | 329,390                                         | 4.69                             |

Por otro lado, y más específicamente para COVID-19, se han propuesto diversos factores que influyen en la mortalidad por la enfermedad, como una población de mayor edad, mayor cantidad de pobladores con comorbilidades, fumar, obesidad, niveles de contaminación, así como la calidad y desempeño del sistema de salud nacional (Pana *et al.*, 2021). A su vez, la calidad en los servicios de salud depende de la economía y nivel de desarrollo de cada país. Cabe mencionar que existen

ciertas situaciones de riesgo para el contagio de la infección por SARS-CoV-2, entre las que se encuentran reuniones de varias personas en lugares poco ventilados y una falta de medidas básicas de higiene, como el lavado de manos adecuado (Rashedi *et al.*, 2020). Entonces, una de las formas para prevenir los contagios por la enfermedad es la aplicación de medidas sanitarias por parte del sistema de salud que disminuyan la exposición de la población a los posibles factores de riesgo.

### 2.1.3. Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2

SARS-CoV-2 pertenece a la familia *Coronaviridae*, la cual forma parte del orden *Nidovirales* y se conforma por virus envueltos, con un genoma de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario de sentido positivo, que tiene un tamaño aproximado de 25 a 32 kilobases. Son virus grandes, el diámetro del virión mide entre 118-136 nm, son semiesféricos, y contienen una glicoproteína característica denominada “espiga” o proteína S, que genera un efecto estructural parecido al de una corona, a lo cual le deben su nombre. Dentro de la familia se encuentran las subfamilias *Torovirinae* y *Coronavirinae*, y a su vez, en esta última se encuentran los géneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* y *Gammacoronavirus* (Payne, 2017a). Los virus pertenecientes a la subfamilia *Coronavirinae* infectan una diversidad de mamíferos, generando usualmente infecciones entéricas y respiratorias leves. Entre los mamíferos más comúnmente infectados se encuentran los camellos, las civetas de palma enmascaradas y los murciélagos, siendo estos últimos principalmente infectados por el género *Betacoronavirus* (Payne, 2017a; Sharma *et al.*, 2021). Por lo general, las infecciones por *Betacoronavirus* están asociadas a hospederos de distintas especies.

2.1.3.1. Género de los *Betacoronavirus*. El SARS-CoV-2 pertenece al género de los *Betacoronavirus*, específicamente a la especie de los coronavirus relacionados al SARS (Wacharapluesadee *et al.*, 2021). Este género está compuesto por virus denominados comúnmente coronavirus (CoVs), y se compone de cuatro linajes nombrados de la A-D. Dentro de estos se encuentran virus capaces de infectar mamíferos y algunos patógenos para el humano, conocidos

como coronavirus humanos (HCoV). Los *Betacoronavirus* humanos del linaje A son el OC34, los coronavirus entéricos humanos y el HKU1; los del linaje B son los coronavirus relacionados al síndrome respiratorio agudo severo (SARS), y del linaje C son los coronavirus del síndrome respiratorio del Este Medio (MERS). Así también, dentro del género se encuentran otros coronavirus que no infectan humanos. En el linaje A se encuentran el virus de la hepatitis murina y el coronavirus bovino, en el linaje B el coronavirus de murciélago relacionado al SARS, en el linaje C el coronavirus HKU4 de murciélagos *Tylonycteris* y el coronavirus HKU5 de murciélagos *Pipistrellus*. Por último, en el linaje D se encuentra el coronavirus HKU9 de murciélagos *Rousettus* (Monto *et al.*, 2014). El posicionamiento taxonómico de los diversos coronavirus permite avanzar en la investigación filogenética y de su origen.

Hasta el año 2002, se conocía que los HCoVs tenían capacidad para provocar resfriado común moderado en el humano. Sin embargo, en noviembre de ese año se describió por primera vez al coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) en la población de Guangdong, China; y sucede la primera pandemia conocida por coronavirus. Este virus generaba una enfermedad que consistía en tres fases: una primera fase con síntomas inespecíficos como fiebre, tos, dolor de garganta, mialgia y disnea. La segunda fase se caracterizaba por dificultad para respirar, fiebre, hipoxia y diarrea ocasional. En la tercera fase ocurría dificultad respiratoria aguda con hospitalización y ventilación mecánica. La transmisión del virus era a través de gotas respiratorias e interacción directa con individuos infectados, lo que facilitó su diseminación a aproximadamente 30 países de Europa y Norteamérica (Al-Salihi y Khalaf, 2021). Se reportaron 8096 casos totales y un aproximado de 744 muertes, con una tasa de fatalidad del 10% (Sharma *et al.*, 2021). En el año 2003, la OMS reportó que la última cadena de transmisión del virus se había roto, y para 2004 hubo un último reporte de infecciones en laboratorios (Payne, 2017a). Es así como inició el interés por el potencial de los coronavirus para producir enfermedad grave.

En abril del 2012, se aisló por primera vez al coronavirus del síndrome respiratorio del Este Medio (MERS-CoV) en Jeddah, Arabia Saudita; de un hombre que falleció por falla renal y neumonía aguda. De manera general, la enfermedad se manifiesta con síntomas iniciales como tos, fiebre y problemas para respirar, pero puede progresar a enfermedad severa con falla de los riñones y neumonía (Payne, 2017a). Algunos otros síntomas son mialgia, dolor de garganta, escurrimiento nasal y malestar gastrointestinal. Además, se han reportado posibles secuelas neurológicas acompañadas de síntomas respiratorios (Al-Salihi y Khalaf, 2021). El MERS-CoV se transmite de

humano a humano a través de gotitas, aerosoles, contacto directo o indirecto por fómites, así como de forma fecal-oral. Desde el inicio de la enfermedad y hasta diciembre del 2019 se han confirmado 2502 casos y 861 muertes en 27 países, con una tasa de fatalidad de 34.4% (Park, 2020). El brote por este virus actualmente sigue en curso, y la mayor parte de la transmisión ocurre en hospitales (Payne, 2017a). Sin embargo, la atención se ha enfocado en el nuevo virus que surge siete años después del MERS-CoV.

En 2019 se detectaron 27 casos de personas con síntomas respiratorios y siete casos de enfermedad grave en la ciudad de Wuhan, China. Se aisló un coronavirus de los pacientes enfermos, el cual fue nombrado inicialmente como el nuevo coronavirus del 2019 (2019-nCoV) y renombrado por la OMS en febrero del 2020 como SARS-CoV-2 causante de la COVID-19. La forma de transmisión del virus es muy similar a la de SARS-CoV, mediante gotas respiratorias, exposición directa persona-persona a través de tos, estornudos o plática directa. También se ha sugerido una posible transmisión mediante contacto indirecto por superficies y la posterior inoculación en ojos, nariz o boca (Al-Salihi y Khalaf, 2021). Sin embargo, aún se sigue debatiendo si esta forma de transmisión puede ocurrir en el SARS-CoV-2 y más estudios son necesarios para determinar una conclusión sobre ello (Goldman, 2020). A pesar de que la tasa de fatalidad por el SARS-CoV-2 es menor (2.17%), que la de SARS-CoV (10%) y MERS-CoV (34.4%), su capacidad de transmisión es mayor y ha logrado llegar hasta 214 países, con más del doble de casos y una mayor cantidad de muertes totales (Sharma *et al.*, 2021). Por lo tanto, este virus ha sido de aún más interés que los descritos anteriormente.

2.1.3.2. Receptor viral y mecanismos involucrados en la entrada celular. Los viriones del SARS-CoV-2 están compuestos por cuatro proteínas estructurales principales. La proteína M o “membranal” es un dímero que se encuentra embebido en la envoltura lipídica del virus y se cree que tiene la capacidad de anclar complejos de ribonucleoproteínas a dicha envoltura. Por otra parte, la proteína N o de la “nucleocápside” se asocia con el ARN viral y forma una estructura de ribonucleoproteína al interior del virión. Así también, se presume que la proteína E o de “envoltura” forma canales iónicos pentaméricos en la bicapa lipídica y contribuye a la formación de la envoltura viral. Por último, la proteína S o “espiga” es un trímero glicosilado que media la entrada y fusión del virus, al unir las secuencias de sus péptidos a los de la célula blanco (Yu *et al.*, 2021). Dichas proteínas son esenciales para las funciones y sobrevivencia del virus, como la replicación viral y

el reconocimiento de la célula blanco a infectar.

La capacidad de un virus para reconocer e infectar a alguna célula de un organismo en particular se define como tropismo viral, y depende de diversos factores. Algunos de ellos son el sitio de entrada, el tipo de células que se infectan, la respuesta inmunológica local, así como la arquitectura y sistema vascular de los tejidos involucrados (McFadden *et al.*, 2009). Un aspecto importante sobre el tropismo viral es el receptor celular que se encuentra en la célula blanco, que es reconocido por una proteína específica del virus y permite su entrada. En el caso del SARS-CoV-2, SARS-CoV y el HCoV-NL63, la proteína S reconoce a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) como primer contacto con la célula a infectar. La ACE2 está presente en la membrana celular de diversas células del tracto gastrointestinal, riñones, corazón, pulmones y testículos del humano. Su función fisiológica enzimática es en la molécula angiotensina, a través de cortes en su estructura, provocando efectos antitrombóticos y de vasodilatación (Oz y Lorke, 2021). Entonces, la ACE-2 es un indicador de que una célula puede ser infectada por SARS-CoV-2 a través de su reconocimiento, pero también tiene una importante función en el organismo.

La proteína S se divide en dos subunidades funcionales, la subunidad S1 que tiene contacto directo con ACE2, y la subunidad S2 que participa en la fusión membranal y funciona como tallo anclado a la membrana viral. Debido a que se trata de un trímero, existen tres subunidades S1 y S2 respectivamente. La interacción sucede a través del dominio de unión al receptor (RBD) presente en el C-terminal de la subunidad S1, y es reconocida por el dominio peptidasa de la ACE2 (Oz y Lorke, 2021). El RBD puede tomar dos conformaciones: una denominada “de pie” que utiliza para la interacción con la célula blanco, y otra “acostada” que se propone que utiliza para evadir el reconocimiento del sistema inmunológico. Dentro del RBD se encuentra un motivo de unión al receptor (RBM) que contiene los residuos principales de interacción con ACE2, y esta interacción se da a través de puentes de hidrógeno (Al Adem *et al.*, 2020). Entonces, estos dominios son necesarios para el reconocimiento específico de ACE2 y el posterior establecimiento de la infección.

Una vez que la subunidad S1 interacciona con ACE2, es necesaria la acción de proteasas sobre la proteína S, que contiene un sitio de corte de la región entre S1 y S2, el cual es crítico para la entrada del virus a la célula. La enzima que corta en este sitio es la proteína furin humana transmembranal tipo I, y reconoce específicamente el sitio presente en la proteína S del SARS-CoV-2. Otra de las enzimas que participa en el procesamiento es la proteasa de serina transmembranal 2 (TMPRSS2), y en conjunto provocan cambios estructurales en la proteína S, que incluyen la disociación de la

subunidad S1 y cambios conformacionales de la subunidad S2. La nueva conformación de S2 facilita la fusión de la membrana viral con la membrana celular del hospedero, provocando la formación de una hélice y una región peptídica de fusión, que interacciona con la membrana del hospedero para permitir la entrada (Al Adem *et al.*, 2020). Otro mecanismo propuesto de entrada viral es vía endocitosis, por la formación de endosomas mediada por catepsina L. De igual forma, la catepsina B también se ha relacionado a acción enzimática sobre la proteína S. Se propone que la función de estas enzimas tienen un efecto colectivo con TMPRSS2 para permitir la acción de la proteína furin (Oz y Lorke, 2021). Todos estos mecanismos permiten al virus ingresar en la célula. Cuando el virus logra entrar a la célula comienza a replicar su material genético para producir más viriones. Uno de los problemas que evitan la erradicación de los virus es su capacidad de mutar, es decir, de producir cambios en su material genético durante su replicación, y que pueden resultar en fenotipos y variantes distintas del virus. Es importante resaltar que las mutaciones en los virus de ARN son más frecuentes, ya que estos codifican para su maquinaria de replicación. Por ejemplo, la ARN polimerasa dependiente de ARN de SARS-CoV-2 tiene una capacidad limitada de corrección de errores, por lo que las mutaciones serán más frecuentes que si utilizara la ARN polimerasa de la célula que infecta (Zeng *et al.*, 2021). Esto significa que en cada infección el virus tiene la oportunidad de continuar mutando, lo que le permite emerger en nuevos hospedadores y evolucionar para evadir la respuesta inmunológica, incluso la que se produce por la vacunación (Duffy, 2018). Con base a esto, las infecciones en diversas especies hospederas toman relevancia, pues le dan más oportunidad al virus de replicarse con la posible generación de nuevas variantes virales.

## 2.2. Transmisión de los *Betacoronavirus* Mediante Animales

### 2.2.1. Transmisión Zoonótica de los Virus SARS-CoV y MERS-CoV

El término zoonosis se refiere a una enfermedad que se transmite de los animales a las personas y viceversa, ya sea de forma directa o indirecta (RAE, 2014). Por ende, la transmisión zoonótica se refiere a que el agente etiológico de la enfermedad logra cruzar la barrera entre especies. Este tipo

de transmisión puede ocurrir en una diversidad de bacterias, virus, parásitos y hongos. Su importancia radica en que los reservorios zoonóticos son usualmente la causa de nuevas variantes de los virus, y provocan la aparición de nuevas enfermedades en los humanos. En el caso de los coronavirus, la mayoría tienen la capacidad de infectar animales y humanos, provocando enfermedades de síntomas moderados que afectan al tracto gastrointestinal y generan el resfriado común en individuos inmunocompetentes (Al-Salihi y Khalaf, 2021). Entonces, la transmisión zoonótica es un aspecto muy importante que se debe considerar en los coronavirus.

Dentro del género *Betacoronavirus*, el MERS-CoV y SARS-CoV han generado infecciones más severas en los humanos. Se presume que el inicio de la epidemia por SARS-CoV fue de origen zoonótico. Algunos estudios seroepidemiológicos y de aislamiento viral muestran que las civetas de palma enmascaradas fueron potenciales hospederos intermediarios del SARS-CoV, pues aquellas personas en contacto con dichos animales tenían anticuerpos anti-SARS-CoV. Así también, se relacionó su origen con los murciélagos de herradura (*Rhinolophus* sp.) como hospederos ancestrales. Otros estudios genéticos mostraron que los coronavirus tipo SARS aislados de dichos murciélagos, tenían entre 87-92% de similitud con el SARS-CoV, aislado de humanos y de las civetas de palma enmascaradas. (Al-Salihi y Khalaf, 2021). Con base a esto, los murciélagos se consideran el nicho ecológico inicial de la enfermedad por SARS-CoV.

En el caso de MERS-CoV, se determinaron a los murciélagos como su hospedero ancestral, ya que se observó una homología genética entre este virus y diversos coronavirus de murciélagos africanos, italianos, chinos y de tumba egipcios (Krishnamoorthy *et al.*, 2020). Sin embargo, los animales con la infección primaria fueron los camellos árabigos o dromedarios, ya que se demostró la transmisión camello-humano a través de análisis genéticos del virus. De igual manera, se encontró un genoma homólogo al del MERS-CoV, tanto en muestras de heces como nasales en los camellos (Ramadan y Shaib, 2019). Así también, se detectó la presencia del ARN viral en hisopado nasal de otros animales como burros, ovejas y cabras (Kumar *et al.*, 2020). Por lo tanto, MERS-CoV fue capaz de romper la barrera entre especies y transmitirse a diversos animales.

Existen diversas interacciones humano-animal, o viceversa, que son capaces de provocar el cruce de la barrera entre especies por ciertos microorganismos e infectar al humano. Algunos ejemplos son el consumo de animales como parte de la alimentación, el contacto directo o indirecto con animales y las mordeduras por los mismos. Estudios filogenéticos del genoma completo de MERS-CoV indicaron que durante la infección en los dromedarios ocurrió una evolución del virus,



generando diversos linajes que son capaces de atravesar la barrera entre especies e infectar al humano. Algunas prácticas como el entrenamiento y ordeña de los camellos dromedarios se relacionaron a un riesgo de infección por MERS-CoV, y también algunas otras como el consumo de leche cruda y carne mal cocinada de camello (Ramadan y Shaib, 2019). En el caso de SARS-CoV, se presume que sucedió una transmisión del murciélago hacia las civetas de granjas, que a su vez propagaron el virus a civetas de mercados, dándole la oportunidad al virus de mutar antes de su transmisión al humano (Dhama *et al.*, 2020). De esta forma, las diversas interacciones humano-animal son importantes en la transmisión de infecciones zoonóticas, especialmente en los coronavirus.

### **2.2.2. Cruce de la Barrera entre Especies por SARS-CoV-2**

Como parte de los *Betacoronavirus*, SARS-CoV-2 tiene la capacidad de infectar tanto humanos como animales, y estos últimos están involucrados como posibles hospederos ancestrales e intermediarios. A pesar de las diversas teorías en la comunidad sobre el origen del virus de un laboratorio de experimentación, esto no ha sido comprobado hasta el momento. Por otro lado, al comparar el genoma de SARS-CoV-2 con un coronavirus de murciélago (*Rhinolophus affinis*) de la provincia de Yunnan en China, denominado RaTG13 se encontró una similitud del 96.2% en la totalidad de los genomas (Zhou *et al.*, 2020). Así también, se han reportado genomas virales relacionados a SARS-CoV-2 aislados de murciélagos en Japón, el Este de China y el Sureste de Asia (Wacharapluesadee *et al.*, 2021). Debido a que los murciélagos raramente pueden infectar a los humanos de forma directa, y a que el virus del murciélago no presentaba una similitud >99% con el SARS-CoV-2, se ha propuesto al murciélago como el hospedero ancestral del virus. De esta manera, existe la posibilidad de que otro animal haya actuado como hospedero intermediario para romper la barrera entre especies y transmitir el virus hacia el humano.

Una de las teorías de la transmisión zoonótica del virus indica que sucedió en el mercado de mayorero de mariscos y animales Huanan en Wuhan, China. En este mercado se maneja la venta de animales exóticos y sus partes, que son utilizados en la población como alimento o medicina tradicional de la región (Al-Salihi y Khalaf, 2021). Además, los primeros pacientes en los que se

detectó el virus fueron relacionados con el comercio en dicho mercado. Posteriormente, se logró aislar al virus de muestras ambientales, que incluían personas, animales, tierra, descargas y estructuras alrededor del lugar, lo que hace incluso más probable que esta teoría sea verdadera (Dhama *et al.*, 2020). En el mercado Huanan no se realizaba la venta de murciélagos ni se les mantenía en cautiverio. Por otra parte, además de los mariscos, una gran cantidad de animales de vida silvestre eran comercializados, incluyendo a erizos, tejones, serpientes, aves de corral y perros mapaches, (Hedman *et al.*, 2021). Específicamente, los perros mapaches han tenido un papel como hospederos de coronavirus relacionados a SARS (Worobey, 2021). Con base a esto, resulta lógico sospechar la presencia de un hospedero intermediario que fuera el transmisor directo del virus hacia el humano.

El pangolín (*Manis javanica*) se ha propuesto como posible hospedero intermediario para SARS-CoV-2. Se trata de un mamífero nocturno que se encuentra en peligro de extinción y es contrabandeado de diversas partes de Asia hasta China, donde es utilizado como parte de la medicina tradicional, que hace uso de sus escamas secas y su carne es considerada un manjar exclusivo. Aunado a esto, se han aislado coronavirus que infectan al pangolín (Pangolín-CoV) y se ha reportado la homología de sus genomas de 85-92% con el genoma del SARS-CoV-2. Por otra parte, se ha observado un 100%, 98.6%, 97.8% y 90.7% de identidad de aminoácidos de Pangolin-CoVs con SARS-CoV-2 en sus proteínas S, M, N y E (do Vale *et al.*, 2021). Además, en alineamientos múltiples de segmentos del RBM del Pangolin-CoV se ha observado que comparte una similitud de nucleótidos del 89% y una identidad de aminoácidos del 98% con la proteína S del SARS-CoV-2, con una diferencia en solo un aminoácido clave en la unión. A pesar de que el porcentaje de similitud genómica entre el Pangolin-CoV y el SARS-CoV-2 no es tan elevado en comparación al del RaTG13 de murciélago, la región RBD de este último difiere en 5 aminoácidos clave del RBD de SARS-CoV-2 (Zhao *et al.*, 2020). Debido a sus características, el pangolín se considera un probable hospedero intermediario para el virus.

Otros animales se han propuesto como hospederos intermediarios para SARS-CoV-2. La serpiente y la tortuga fueron evaluados como reptiles que podrían infectarse, sin embargo, la evidencia es aún muy limitada y ningún coronavirus ha sido aislado de estas especies, por lo que es poco probable que cumplan un papel en la cadena de transmisión (do Vale *et al.*, 2021). Por otra parte, en diversas granjas de los Países Bajos, los visones se han infectado por SARS-CoV-2, provocando síntomas respiratorios y muertes en algunos casos. Estudios epidemiológicos han demostrado que

el virus se introdujo a los visones a través de un humano, y que también es posible una transmisión del visón hacia el humano y hacia otros animales (Zhao *et al.*, 2020). Aunado a esto, diversos estudios experimentales han demostrado la susceptibilidad de los hurones hacia la infección por SARS-CoV-2 y los ha llevado a proponerlo como hospedero intermediario, pero la infección natural en estos animales no se ha observado hasta el momento (Hedman *et al.*, 2021). Además de estos, existen otros animales propuestos, sin embargo, sigue siendo más probable una transmisión a partir de aquellos en los que se ha demostrado una infección natural y un probable contacto con los primeros casos reportados en humanos.

### 2.3. SARS-CoV-2 en Animales de Compañía

#### 2.3.1. Papel de los Animales de Compañía en la Transmisión Viral

Se define como animal doméstico a aquellos animales que pertenecen a especies acostumbradas a la convivencia con el hombre (RAE, 2021). Entre estos se encuentran los animales de producción y los de compañía (McHugo *et al.*, 2019). Existe una diversidad de infecciones zoonóticas que pueden ser transmitidas de animales de compañía hacia los humanos. Algunos ejemplos incluyen la transmisión de parásitos como *Toxoplasma gondii* a partir de los gatos domésticos, con una afectación mayor en los fetos de mujeres embarazadas (Al-Malki, 2020). Sin embargo, la vacunación de los gatos domésticos contra este parásito previene el riesgo de zoonosis (Hasan y Nishikawa, 2022); por lo que es fundamental realizar esta práctica preventiva y evitar su abandono cuando convive con una mujer embarazada. Así también, la transmisión de algunas bacterias con resistencia a antibióticos se ha reportado, como en el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Enterococcus* sp. resistentes a vancomicina y *Salmonella typhi* resistente a múltiples antibióticos (Bhat, 2021). Esto nos muestra que el intercambio microbiológico entre las mascotas y sus dueños es un evento común y que puede impactar en la salud humana.

De la misma forma, diversos virus tienen la capacidad de transmitirse a partir de animales de compañía. Por ejemplo, el virus de la influenza tiene la capacidad de infectar a gatos de manera frecuente, e incluso durante los brotes de influenza por el virus HPAI (H5N1), la presencia de gatos

es un factor de riesgo para desarrollar enfermedad o muerte por dicha infección. Es así como se considera que los gatos son parte importante de la epidemiología de este virus (Day *et al.*, 2012). Así también, durante la pandemia provocada por SARS-CoV, se reconoció una probable infección inicial de gatos. Además, experimentalmente se ha observado un daño respiratorio por parte de este virus en gatos y hurones, pero no en perros (Stout *et al.*, 2020). Otro ejemplo es el virus de la rabia, cuyos principales transmisores son los perros, y en menor medida los gatos. Usualmente la forma de transmisión es a través de la saliva por una mordedura, y se ha observado que dicha transmisión ha disminuido posterior a la vacunación de las mascotas (O'Neil, 2018). Por lo tanto, la vigilancia de una transmisión zoonótica viral es importante para mantener un control en la salud tanto humana como animal, y la prevención de la enfermedad en ambos organismos genera un beneficio mutuo. Por otra parte, también es posible la infección de los animales de compañía a partir de los humanos, que se conoce como antropozoonosis o zoonosis inversa. Se han reportado diversos patógenos transmitidos a partir de un humano hacia un animal de compañía. Algunos ejemplos de este tipo de transmisión son las infecciones bacterianas por SARM, *Mycobacterium tuberculosis* y *Escherichia coli*; infecciones fúngicas por *Candida albicans*, y ciertas infecciones virales por el virus de la influenza A H1N1 así como los virus del herpes humano 1 y 4 (Messenger *et al.*, 2014). Se ha reportado la infección por el virus de la influenza A en perros y gatos que tenían un contacto cercano con los humanos y presentaron un cuadro clínico similar al de los humanos (Trujillo *et al.*, 2012). A pesar de que estas infecciones suelen ser comunes, pues muchos de los patógenos que infectan a humanos pueden infectar también a otras especies, los estudios sobre el tema siguen siendo muy limitados.

Una de las razones por las cuales los animales de compañía tienen la capacidad de transmitir virus o microorganismos hacia el ser humano, o bien, ser infectados a partir de este, es la relación cercana que usualmente se mantiene con estos animales. De hecho, las interacciones de los humanos con animales de compañía tienen amplios beneficios hacia la salud humana, entre los cuales se encuentran el desarrollo social y una mejor calidad de vida asociada al acompañamiento e inspiración generados por las mascotas (Day *et al.*, 2012). Aunado a esto, los perros pueden ser entrenados para acompañar a personas con alguna discapacidad, e incluso durante alguna enfermedad mental como la ansiedad. Por lo tanto, los animales de compañía pasan a ser una parte importante de la vida humana, generando un contacto íntimo con sus dueños en el cual pueden llegar a ingerir comidas similares al humano, compartir su cama y acompañarlos en viajes, haciendo que el riesgo de contagio de ambas partes por un mismo patógeno sea similar (Schmidt,

2009). A partir de esto, es importante reconocer la relevancia de las mascotas como parte de la salud pública y la epidemiología de las enfermedades de transmisión zoonótica o antropozoonótica.

### 2.3.2. Identificación y Casos Reportados en Gatos y Perros

Cuando se habla de mascotas, la mayoría de las infecciones reportadas se refieren a las que ocurren en perros y gatos, debido a que son los animales con los que se convive en un hogar más comúnmente. En el caso del virus SARS-CoV-2, existen perros y gatos que se han reportado como probables hospederos. Aunque aún se desconoce su posición en la cadena de transmisión, la mayoría de los estudios indican una transmisión humano-animal de compañía, mientras que la transmisión animal de compañía-humano no se ha observado. La posible dinámica de la transmisión de SARS-CoV-2 entre humanos y animales se observa en la figura 1 y los estudios revisados, así como sus puntos principales se enlistan en el cuadro 2.

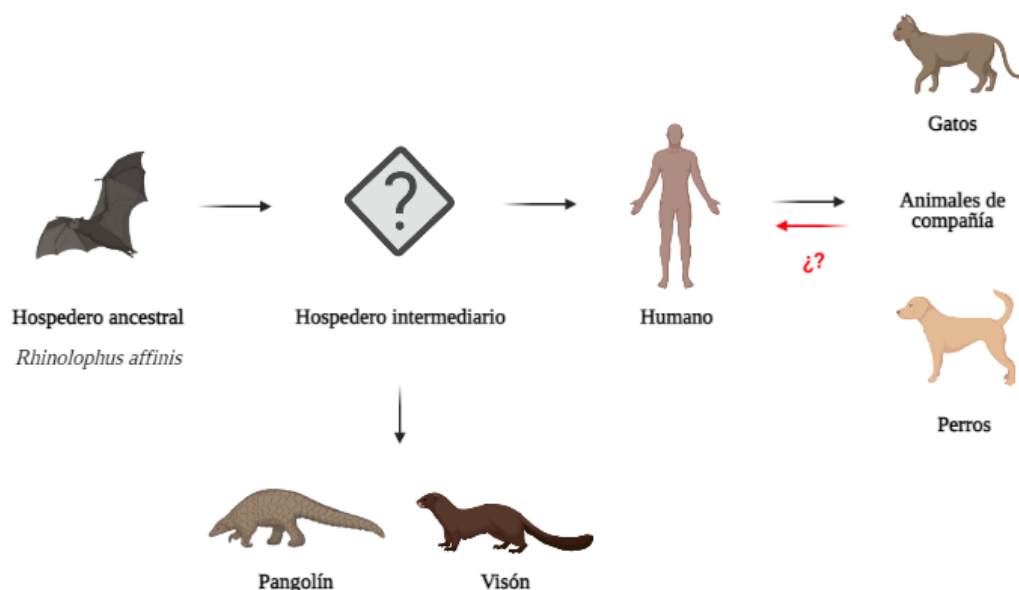


Figura 1. Cadena de transmisión del virus SARS-CoV-2 en diversas especies y su relación con el humano. El hospedero ancestral propuesto se trata del murciélago *Rhinolophus affinis*. Diversos animales se han propuesto como hospederos intermediarios, y los estudios indican que más probablemente se trate del pangolín o el visón. La transmisión del humano hacia perros y gatos ha sido reportada, sin embargo, aún no se ha reportado que estos animales puedan infectar a los humanos (do Vale *et al.*, 2021; Leroy *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020).

Cuadro 2. Evaluación de la infección por SARS-CoV-2 en animales de compañía.

| <b>Animales evaluados</b> | <b>Resultados</b>                                                                                                                                                                   | <b>Tipo de Estudio</b>       | <b>Autores</b>                      |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Perros y Gatos</b>     | ARN viral en cornete nasal, paladar, amígdala, tráquea, pulmón e intestino delgado de gatos.<br>Perros con ARN viral en muestras de hisopado rectal. Anticuerpos en perros y gatos. | Experimental                 | Shi <i>et al.</i> (2020)            |
| <b>Perros y Gatos</b>     | No se detectó ARN viral ni anticuerpos en perros y gatos posiblemente expuestos                                                                                                     | Epidemiológico, transversal  | Temmam <i>et al.</i> (2020)         |
| <b>Perros y Gatos</b>     | Anticuerpos en 23.5% de gatos y 15.4% de perros                                                                                                                                     | Epidemiológico, transversal  | Fritz y <i>col.</i> (2020)          |
| <b>Perros y Gatos</b>     | Anticuerpos neutralizantes en 43.8% de gatos y 11.9% de perros                                                                                                                      | Epidemiológico, longitudinal | Hamer <i>et al.</i> (2021)          |
| <b>Gatos</b>              | 14.7% seropositivos de refugios, hogares con pacientes COVID-19 y clínicas veterinarias                                                                                             | Epidemiológico, transversal  | Zhang <i>et al.</i> (2020)          |
| <b>Perros y Gatos</b>     | No se detectó ARN viral<br>1.3% de mascotas con anticuerpos<br>0.8% en perros y 1.75% en gatos                                                                                      | Epidemiológico, transversal  | Cardillo y <i>col.</i> 2022         |
| <b>Perros y Gatos</b>     | ARN viral en 28% de perros y 40% de gatos<br>Anticuerpos neutralizantes, 3.4% en perros y 20% en gatos                                                                              | Epidemiológico, longitudinal | Calvet <i>et al.</i> (2021)         |
| <b>Perros y Gatos</b>     | ARN viral en un gato<br>Anticuerpos anti-S1 en dos gatos                                                                                                                            | Epidemiológico, transversal  | Fuentealba <i>et al.</i> (2021)     |
| <b>Perros y Gatos</b>     | Ausencia de ARN viral en perros y gatos. No se evaluaron anticuerpos.                                                                                                               | Epidemiológico, transversal  | Sánchez-Montes <i>et al.</i> (2021) |

Se han reportado casos aislados de las infecciones por SARS-CoV-2 en gatos. El primer caso involucró a una mujer que viajó desde Italia hacia Bélgica, y una semana después desarrolló síntomas respiratorios y posteriormente gastrointestinales. Se le tomó una muestra y se confirmó un diagnóstico de COVID-19 al identificar el material genético viral. Una semana después, su gato comenzó a presentar diversos síntomas como vómito, letargia pronunciada, anorexia y diarrea. Días después el gato comenzó a tener síntomas respiratorios como tos productiva y fuerte, estornudos, dificultad para respirar y emaciación. Se tomaron muestras sucesivas de heces y fluido gástrico de

su gato, donde se identificó el ARN en una carga viral baja, a excepción de una muestra de vómito en los primeros días. Así también, se realizó la detección de anticuerpos y se observó un efecto neutralizante de los mismos a una dilución más alta que la detectada en su dueño (Garigliany *et al.*, 2020). Este estudio presenta una sospecha inicial de la infección en gatos por SARS-CoV-2. Sin embargo, al tratarse de un caso aislado no se puede confirmar la presencia del virus de manera consistente en los gatos.

Aunado a esto, en Hong Kong el dueño de un gato de pelo corto fue diagnosticado con COVID-19 el 30 de marzo del 2020, su gato fue puesto en cuarentena en un refugio inmediatamente después, y ahí mismo se recolectaron muestras de cavidad oral, nasal y rectal. Se detectó el material genético proveniente de SARS-CoV-2 en todas las muestras, pero este gato no presentó síntomas de la enfermedad (Leroy *et al.*, 2020). Este reporte es consistente con el estudio anterior y aumenta la sospecha de la enfermedad en gatos. Sin embargo, no se determina la presencia de anticuerpos, lo cual sería de utilidad para confirmar la enfermedad y descartar una contaminación cruzada, así como para evaluar parte de la respuesta inmunológica del gato, principalmente porque fue asintomático. Así como el primer caso reportado, este caso se limita no solamente a la población de Hong-Kong, sino también a las condiciones específicas del ambiente individual del gato y no permite conocer el estado general de la enfermedad en los gatos.

La presencia de SARS-CoV-2 también ha sido reportada en perros. El primer caso aislado comenzó con una mujer de 60 años que fue diagnosticada con COVID-19 el 24 de febrero del 2020. Su mascota era un perro Pomerania macho de 17 años con diversas enfermedades preexistentes: soplo cardíaco de grado II, hipertensión pulmonar y sistémica, enfermedad renal crónica, hipotiroidismo y antecedentes de hiperadrenocorticismos. El perro fue transferido a un refugio donde se le tomaron muestras nasales, orales y rectales, en las cuales se detectó una carga viral baja del ARN de SARS-CoV-2, la cual es una probable razón por la que tampoco se pudo aislar al virus infeccioso. Desafortunadamente, el perro falleció después de 2 días de haber salido del refugio (Sit *et al.*, 2020). Este caso fue reportado en los primeros meses de la pandemia, y la sospecha de la enfermedad en perros comenzó a generarse.

El segundo caso reportado se trata de un perro pastor alemán, cuyo dueño fue diagnosticado con COVID-19 el 17 marzo de 2020. Posteriormente, el ARN viral fue detectado en muestras orales y nasales del perro, así como en muestras fecales, pero con una carga viral menor a las primeras. Además, el pastor alemán tuvo contacto con otro perro de la misma residencia, pero el virus no fue detectado en este último ni presentó síntomas de enfermedad. Sin embargo, la infección pudo

existir, pero no haber sido detectada mediante la prueba de PCR debido a la carga viral tan baja que fue reportada en el primer perro. Los anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 fueron detectados en ambos casos. Así también, se realizó una comparación del genoma de los virus aislados en los perros y sus dueños, mostrando que ambos eran idénticos (Sit *et al.*, 2020). Con base a esto, se presume que la carga viral de los perros es baja, pero más estudios deben respaldar esta evidencia. Los estudios de caso reportados en perros abren paso a investigaciones posteriores que evalúen el problema a mayor escala, pero se limitan a las condiciones específicas de cada perro, que podrían variar según cada situación.

Estudios experimentales se han realizado para observar el potencial que tienen los gatos de desarrollar la COVID-19. Shi *et al.* (2020) inocularon al virus SARS-CoV-2 de forma intranasal en gatos jóvenes y otros con edad cercana a la adultez (6 a 9 meses). El ARN viral fue detectado a los 3 y 6 días post-infección (dpi) en el cornete nasal, paladar, amígdala, tráquea, pulmón e intestino delgado de los gatos; además, el virus infectivo fue aislado de todas las muestras, excepto de intestino delgado. De igual forma, se detectaron anticuerpos en los gatos inoculados con el virus, y con ello se demostró que los gatos podrían desarrollar una infección productiva. En el mismo estudio se evaluó la enfermedad en cinco perros inoculados con el virus. El material genético viral se detectó a los 2 y 6 dpi en muestras de hisopado rectal, pero no en hisopado nasal ni en ningún órgano, a diferencia de los gatos. Al día 14 se observó una seroconversión en 2 perros inoculados, pero no en el resto. Además, al ponerlos en contacto con otros perros, estos no los contagiaron (Shi *et al.*, 2020). En este estudio se muestra la capacidad de SARS-CoV-2 para infectar gatos y perros en un ambiente controlado, y aunque es útil para conocer el desarrollo de la infección y sus posibles mecanismos, no refleja el curso natural de la enfermedad.

En Francia, se realizó un estudio transversal donde se evaluó la presencia de anticuerpos en muestras de nueve gatos de pelo corto y 12 perros que tuvieron contacto directo con 18 estudiantes de veterinaria, de los cuales 11 presentaron síntomas de tos con o sin fiebre, y dos presentaron una prueba positiva para SARS-CoV-2. Ningún animal mostró anticuerpos contra las proteínas S1 y N del virus, ni se recuperó ARN viral de muestras de hisopado nasal y rectal (Temmam *et al.*, 2020). Sin embargo, este estudio no demuestra la presencia del virus en todos los estudiantes que tuvieron contacto con los animales, ya que la infección solamente se confirma en dos de ellos. Tampoco mencionan acciones realizadas para evitar el sesgo de los individuos que, al ser estudiantes de veterinaria y conocer sobre un riesgo de contagio a sus mascotas, podrían haber actuado de una manera precavida.



Algunos estudios epidemiológicos de mayor escala se han realizado en animales de compañía. En un estudio de seroprevalencia en Francia se comparó la presencia de anticuerpos en un grupo de perros y gatos que tuvieron contacto con al menos una persona que tenía síntomas respiratorios y prueba positiva de SARS-CoV-2. En un segundo grupo, los animales de compañía estaban en hogares en los que la exposición al virus era desconocida. Se demostró un 21.3% de animales positivos a anticuerpos contra SARS-CoV-2, de los cuales 23.5% eran gatos y 15.4% eran perros. Con base a esto, el riesgo de las mascotas de ser seropositivas era ocho veces mayor para aquellos animales que convivían y/o compartían espacio con una persona enferma por COVID-19, en comparación con los que estaban en hogares de estatus desconocido (Fritz *et al.*, 2020). La importancia de este estudio radica en que se comprueba el estado infeccioso de los pacientes en contacto con las mascotas, pero se limita a los pobladores de Francia en los que fue realizado.

Así también, en un estudio transversal en Wuhan, China, 14.7% de gatos en refugios, hogares de pacientes COVID-19 y en clínicas veterinarias fueron seropositivos para anticuerpos contra la proteína RBD de SARS-CoV-2. Además, 10.8% de los gatos presentaban anticuerpos neutralizantes, de los cuáles tres presentaban los títulos de neutralización más altos y coincidían en haber tenido un contacto previo con un humano infectado (Zhang *et al.*, 2020). A pesar de que esta publicación proporciona información importante sobre la infección en gatos, no se evaluaron muestras de perros. En Italia se encontraron anticuerpos contra la proteína N de SARS-CoV-2 en 1.3% de mascotas, incluidos cinco gatos y un perro, de los cuales tres gatos presentaban anticuerpos neutralizantes (Cardillo *et al.*, 2022). Los estudios analizados hasta el momento proporcionan evidencia de la presencia de COVID-19 en animales de compañía, sin embargo, siguen limitados a países como China, Francia y Estados Unidos, lo que impide contextualizar el problema en el resto de los países.

Algunos países de Latinoamérica han reportado estudios epidemiológicos de la infección por SARS-CoV-2 en perros y gatos. En Brasil se desarrolló un estudio longitudinal donde se detectó al virus mediante RT-PCR y/o secuenciación en el 28% de perros y 40% de gatos. Además, 4% de las muestras fueron positivas en la detección de anticuerpos neutralizantes contra el virus (Calvet *et al.*, 2021). Por otra parte, en Chile se realizó un seguimiento de tres gatos positivos a SARS-CoV-2 mediante RT-PCR, cuyos dueños cursaban con la enfermedad, y al secuenciar las muestras positivas de humanos y animales encontraron una alta similitud, lo cual confirma la transmisión del virus (Neira *et al.*, 2021). En Argentina, se encontró una muestra de gato positiva mediante RT-PCR (1/18), y dos muestras positivas de gatos (2/18) para anticuerpos contra la proteína S1, pero

ninguna muestra de perro positiva (0/20) (Fuatealba *et al.*, 2021). A pesar de que a partir de 2021 los estudios de países latinoamericanos han comenzado a producirse, tienen algunas limitaciones como el enfoque en solamente un caso, sin evaluar más muestras o bien, con pocas muestras evaluadas. Por ende, es necesario continuar con la investigación epidemiológica en el resto de los países que aún no han generado conocimiento al respecto, como en México.

La OMS desarrolló un enfoque multisectorial denominado "Una Salud" que reconoce la salud de los humanos estrechamente conectada a la salud de los animales y al ambiente en el que cohabitamos. Con base en esto, han declarado la necesidad de realizar estudios de la infección antropozoonótica por SARS-CoV-2 en países de América Latina, iniciando por el estudio de los animales que se encuentran en los hogares (Bonilla-Aldana *et al.*, 2020). Actualmente los estudios epidemiológicos están limitados a los países donde comenzó la pandemia como China, o bien, otros países desarrollados como Estados Unidos; mientras que la tasa de fatalidad de caso en México es mayor en comparación a este último, como se observa en el cuadro 1. En Veracruz, todas las muestras oro- y nasofaríngeas de perros y gatos fueron negativas a la presencia del virus mediante RT-PCR, lo que podría deberse al momento en que se recolectó la muestra. Además, en este estudio no se evaluaron anticuerpos contra el virus (Sánchez-Montes *et al.*, 2021). Hasta el momento, no existen estudios seroepidemiológicos en animales de compañía y humanos sobre infección por SARS-CoV-2 en México.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) lleva un registro de los casos de infección por SARS-CoV-2 en animales reportados a nivel mundial. Hasta el momento, en México se han reportado 10 casos positivos en perros de diversas zonas del país, desde agosto del 2020 hasta marzo del 2021, confirmados con prueba de laboratorio (Cuadro 3) (OIE, 2021). Sin embargo, aún no existen casos reportados en gatos, lo cual difiere con los estudios discutidos anteriormente, que muestran una presencia de la infección ligeramente mayor en estos animales. Esto podría explicarse debido a que en México las mascotas son mayormente perros (85%) en comparación a los gatos (15%) (INEGI, 2014). Por lo tanto, la infección por SARS-CoV-2 en gatos del país podría estar infravalorada. Es importante mencionar que los reportes de la OIE son de casos aislados, y no se reportan en el país cifras oficiales de frecuencia (prevalencia o incidencia) que reflejen el problema a una mayor escala.

Cuadro 3. Casos reportados de COVID-19 en perros de México por la OIE, para marzo 2022.

| <b>Animal en contacto con humano COVID-19(+)</b> | <b>Lugar del país</b> | <b>Duración de la enfermedad</b>   | <b>Casos nuevos</b> |
|--------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|---------------------|
| 1 perro                                          | Cuauhtémoc, CDMX      | 14/08/2020 – 28/08/2020<br>14 días | 1                   |
| 1 perro                                          | Iztacalco, CDMX       | 14/08/2020 – 28/08/2020<br>14 días | 1                   |
| 1 perro                                          | Cuautitlán, CDMX      | 13/11/2020 – 23/11/2020<br>10 días | 1                   |
| 4 perros                                         | Iztapalapa, CDMX      | 23/11/2020 – 06/12/2020<br>14 días | 2                   |
| 1 perro                                          | Benito Juárez, CDMX   | 24/12/2020 – 28/12/2020<br>4 días  | 1                   |
| 7 perros                                         | Toluca, CDMX          | 13/01/2021 – 15/01/2021<br>2 días  | 1                   |
| 1 perro                                          | Azcapotzalco, CDMX    | 04/03/2021 – 05/03/2021<br>1 día   | 1                   |
| 1 perro                                          | Guadalajara, Jalisco  | 02/03/2021 – 03/03/2021<br>1 día   | 1                   |
| 1 perro                                          | Teziutlán, Puebla     | 01/03/2021 – 04/03/2021<br>3 días  | 1                   |

La falta de estudios sobre la transmisión antropozoonótica en México probablemente se deba a que la principal ruta de transmisión observada es humano-humano, y es a la cual se le ha dado mayor importancia hasta el momento. Sin embargo, los estudios epidemiológicos en animales de compañía pueden prevenir la generación de nuevas variantes virales, proporcionar un mejor entendimiento sobre la ecología del virus, mejorar las medidas de prevención y determinar a la infección por SARS-CoV-2 en animales de compañía como un posible diagnóstico. Además, para mayo de 2021 se han reportado 17,763 casos activos en humanos en México, de los cuáles el 81.3% no fueron hospitalizados. De igual forma, para marzo de 2022 se han reportado un 88% de casos ambulatorios de COVID-19, que probablemente permanecieron en su hogar durante el curso de la enfermedad, y pudieron tener contacto con su mascota, sin embargo, este dato aún se desconoce (DGE, 2021). Es así como resulta muy útil determinar la presencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en los animales de compañía en una región específica, para poder disminuir su contagio y mejorar su diagnóstico.

## 2.4. Técnicas para Detección de SARS-CoV-2 en Animales de Compañía

### 2.4.1. Métodos Moleculares

Existen diversas técnicas que pueden ser utilizadas para reconocer la presencia de un virus en una muestra. Entre ellas se encuentra el cultivo celular, detección de antígeno viral, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes, entre otras. En particular, el crecimiento de virus en cultivo celular tiene la ventaja de que permite evaluar la infectividad del virus y su viabilidad (Payne, 2017b). Sin embargo, en el caso de SARS-CoV-2 la realización del cultivo viral requiere condiciones de un laboratorio de bioseguridad nivel 3 (BSL3), por el gran riesgo que implica la manipulación del virus en cultivo. El reconocimiento del antígeno viral, que usualmente es una proteína de la estructura del virión, es otra prueba utilizada para determinar la presencia del virus. Una de las técnicas para realizarla es la prueba de detección rápida de antígeno, que consiste en una tira inmunocromatográfica que identifica el antígeno del virus de forma cualitativa. Una de sus ventajas es que puede ser leída sin equipo especializado en un tiempo de 15 a 30 minutos (Schohy *et al.*, 2020). Además, es muy económica y accesible, lo que tiene un impacto positivo en la salud pública. Sin embargo, su uso en investigación está limitado por su baja sensibilidad (Mak *et al.*, 2020). Aunado a estas pruebas, existen otras técnicas que pueden ser utilizadas para detectar al virus en una muestra.

Los métodos moleculares también son utilizados para reconocer la presencia de SARS-CoV-2 en muestras clínicas. Uno de los métodos más utilizados es la PCR, que consiste en la identificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de su replicación *in vitro*, y que posteriormente es revelado mediante electroforesis (Payne, 2017b). Diversas variaciones en la técnica se han adecuado para determinar la presencia de moléculas como el ARN, que son identificadas a través de PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR). Esta técnica utiliza a la enzima transcriptasa reversa para sintetizar ADN complementario y amplificarlo, y es de gran utilidad en virus que tienen ARN como material genético, como es el caso del SARS-CoV-2 (Jalali *et al.*, 2017). Esta es la técnica más utilizada para comprobar diagnósticos de COVID-19, principalmente por la gran cantidad de ventajas que presenta, pues es mucho más sensible y específica a comparación de otras técnicas.

Además, el riesgo de contagio por manipulación de las muestras es menor que en la realización del cultivo viral, donde el virus debe permanecer vivo.

A pesar de que las técnicas moleculares de identificación viral tienen una gran especificidad y sensibilidad, también tienen diversas limitaciones. Entre estas se encuentran la incapacidad de identificar infecciones que hallan sucedido en el pasado, lo que limita su uso en estudios epidemiológicos retrospectivos, en comparación a las pruebas serológicas. Además, la calidad en la toma de muestra entra como un factor que influye en la sensibilidad de la prueba, y si no es adecuada podría disminuirla. Así también, en cuanto a la RT-qPCR, es necesario un equipo costoso y personal capacitado, lo que provoca que no sea útil en todos los casos (Eftekhari *et al.*, 2021). Con base a esto, surge la necesidad de la realización de otro tipo de pruebas, especialmente en los estudios epidemiológicos.

#### **2.4.2. Métodos Serológicos**

2.4.2.1. Respuesta inmune humoral contra SARS-CoV-2. Una alternativa para determinar la infección en humanos o animales es a través del reconocimiento de su sistema inmunológico. Al entrar en contacto con algún agente infeccioso o extraño, los organismos más desarrollados utilizan un sistema de defensa para evitar la propagación de dicho agente y eliminarlo, al cual se le denomina sistema inmunológico. Existen dos tipos de respuesta inmune: la respuesta innata y la respuesta adaptativa, siendo la segunda la que permite generar moléculas y células de memoria altamente específicas ante el contacto primario con algún patógeno, y que en una segunda exposición les permite eliminarlo más rápidamente. Además, la respuesta inmune puede clasificarse como una respuesta celular que engloba a todas las células que participan, o como una respuesta humoral que comprende a las proteínas o moléculas solubles del sistema inmunológico. Entre las principales proteínas activadas por la respuesta humoral adaptativa se encuentran las inmunoglobulinas o anticuerpos, que presentan regiones de identificación hacia algún epítipo en específico, las cuales se denominan parátomos (Murphy *et al.*, 2019). Debido a que la respuesta adaptativa presenta una mayor especificidad contra los patógenos o agentes a los que ataca, sus componentes tanto celulares como humorales son ampliamente utilizados para el diagnóstico de

diversas infecciones.

Una forma sencilla de detectar una infección previa es a través de la respuesta humoral. Dentro de esta respuesta se engloban diversos tipos de anticuerpos, por ejemplo, la inmunoglobulina M (IgM) que se produce a partir de un contacto inicial con algún microorganismo y se mantiene durante las primeras semanas de infección. Así también, la inmunoglobulina G (IgG) se produce después a la IgM y se mantiene circulando en sangre como anticuerpo de memoria (Abbas *et al.*, 2014). Estos anticuerpos son altamente específicos en el reconocimiento del agente extraño, por lo que la identificación de IgM e IgG en muestras de sangre provee conocimiento sobre la exposición previa hacia algún patógeno de interés, una vez que la infección ya ha ocurrido.

En cuanto a SARS-CoV-2, se considera que las proteínas más inmunogénicas del virus son la proteína S, específicamente el dominio RBD; así como la proteína N, es decir, que la mayor parte de los anticuerpos están dirigidos hacia estos antígenos virales (Karamloo y König, 2020). Los anticuerpos se producen en un tiempo determinado y pasan a la circulación, a lo cual se le denomina seroconversión. En los humanos, se ha reportado que la seroconversión de IgM posterior a la COVID-19 generalmente sucede en los días 10-14, y para IgG esto sucede en un promedio de tres a cuatro semanas. Sin embargo, los casos más leves pueden requerir de más tiempo para el desarrollo de anticuerpos (Kellam y Barclay, 2020). Existen estudios experimentales en perros y gatos donde se ha observado una seroconversión a los 14 días post infección con SARS-CoV-2, y anticuerpos que se pueden mantener o aumentar hasta 42 días post infección en la mayoría de los animales (Bosco-Lauth *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2020). De manera general, la seroconversión en perros, gatos y humanos sucede en tiempos similares, sin embargo, es posible que existan variaciones en los tiempos según cada caso.

2.4.2.2. Pruebas serológicas para la detección de anticuerpos. Las pruebas serológicas se refieren a aquellas en las que se detecta un analito en el suero sanguíneo. Entre estas, las pruebas para detección de anticuerpos son muy comunes. Existen diversas metodologías para realizar estas pruebas, específicamente para SARS-CoV-2 se encuentran la prueba de neutralización por reducción de placa (PRNT), la prueba de microneutralización (MN), el inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA), la prueba de ELISA, entre otras. En algunas de estas pruebas se utilizan proteínas como antígenos para detectar los anticuerpos. En el caso de SARS-CoV-2 los

antígenos que se utilizan más comúnmente son la proteína N, las subunidades de la proteína S (S1 y S2), así como el RBD, que es el dominio de unión de la proteína S (Espejo *et al.*, 2020). Estas técnicas se utilizan en diversos ámbitos como investigación o clínica, y con base en a las condiciones del laboratorio y a la capacitación del personal que las realiza.

Ciertas características de los anticuerpos son aprovechadas en el laboratorio para su detección. Estas proteínas participan en tres procesos principales para eliminar a un agente patógeno, los cuales incluyen a la opsonización, la activación del complemento y la neutralización. Esta última se refiere a la unión de los anticuerpos con proteínas del patógeno para evitar su internalización en células del hospedero. En las infecciones virales, los anticuerpos neutralizantes usualmente impiden la interacción del virus con su receptor celular, y a su vez esto evita la entrada del virus a la célula (Murphy *et al.*, 2019). Con base a estas características de los anticuerpos se han desarrollado diversas técnicas serológicas como la prueba de PRNT, que consiste en incubar al virus con la muestra serológica y posteriormente ponerlo en contacto con células blanco por 2-3 días. La formación de placas es característica de la entrada del virus en la célula, por lo que la reducción de las placas indica que los anticuerpos neutralizaron al virus y evitaron la infección de la célula (Shi y Ren, 2021). A pesar de ser el estándar de oro, esta técnica presenta las desventajas de que es necesario instalaciones de seguridad de tipo BSL3, así como más tiempo y habilidades técnicas para realizarla.

Así también, la MN es utilizada para detectar anticuerpos neutralizantes y es similar a PRNT, sin embargo, es más sencilla de automatizar. Consiste en incubar al virus con muestras serológicas, y posteriormente añadir esta mezcla a las células en placas de 96 pocillos. Esto se incuba durante 48 horas, y se observan las células buscando efectos citopáticos que serían característicos de la ausencia de anticuerpos neutralizantes (Amanat *et al.*, 2020). Debido al manejo del virus sigue siendo necesario contar con instalaciones tipo BSL3 y personal capacitado, sin embargo, esta técnica también se considera estándar de oro. Por otra parte, es posible determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes utilizando la prueba de neutralización con pseudovirus (PN), en la cual se utiliza una partícula viral inocua que se modifica genéticamente para expresar la proteína S de unión al receptor ACE-2. Estos pseudovirus son utilizados reemplazando a SARS-CoV-2 en un ensayo de neutralización como PRNT. Una ventaja es que los pseudovirus pueden crearse para producir un marcador de fluorescencia que se expresa al infectar la célula, e indica si la partícula viral fue neutralizada por los anticuerpos o no (Lu *et al.*, 2021). Esta técnica resuelve los problemas

de la necesidad de instalaciones tipo BSL3, sin embargo, sigue siendo laboriosa y requiriendo personal capacitado.

Existen otras técnicas para detectar anticuerpos contra SARS-CoV-2 en muestras serológicas, que no utilizan al virus sino a sus proteínas. La prueba de neutralización simulada (sVNT, por sus siglas en inglés) se basa en la capacidad de los anticuerpos para impedir la unión de una proteína viral con el receptor celular que permite la entrada al virus. En el caso de SARS-CoV-2, se incubaba a la proteína RBD con las muestras de suero y se pone en contacto con ACE-2 que está fijado en una placa de 96 pocillos. Si la proteína RBD no logra unirse al receptor celular es debido a que los anticuerpos en la muestra bloquearon la unión. Esta prueba tiene las ventajas de que no es necesario un laboratorio BSL3, es más rápida y se pueden evaluar muchas muestras, sin embargo es menos sensible que las pruebas que utilizan un virus (Lu *et al.*, 2021). En la prueba de CLIA se utilizan perlas magnéticas recubiertas de un antígeno recombinante para el reconocimiento de anticuerpos específicos, y se revela la reacción mediante la generación de luz detectable por un equipo especializado (Espejo *et al.*, 2020). Esta metodología tiene las ventajas de que se puede automatizar y es altamente sensible pero su costo es elevado y esto limita su uso para una gran cantidad de muestras (Cinquanta *et al.*, 2017).

Por otra parte, las pruebas de ELISA son también ampliamente utilizadas para la detección de anticuerpos. En estas generalmente se utilizan placas de 96 pocillos que pueden unir fuertemente algún antígeno o anticuerpo en su superficie. Además, suelen requerirse anticuerpos de detección, muestras o analitos, buffer, lavados y un sustrato para revelar la reacción (Konstantinou, 2017). Existen cuatro tipos principales de ELISA con distintos fines y variaciones. La técnica de ELISA directa se basa en fijar analitos al fondo del pocillo de la placa. Posteriormente, se agrega un anticuerpo primario de detección conjugado con una enzima que actúa sobre un sustrato para revelar la reacción. A pesar de que esta técnica suele ser más rápida, usualmente se utiliza para detectar antígenos con un anticuerpo comercial o prefabricado (Shah y Maghsoudlou, 2016). Por otra parte, en la prueba de ELISA competitiva puede utilizarse un anticuerpo fijado en el fondo del pocillo, al cual se agrega el antígeno de unión y la muestra que en teoría contiene al mismo antígeno. Estos dos compuestos compiten para unirse a los sitios libres en el anticuerpo fijado en la placa (Konstantinou, 2017). Esta técnica usualmente se utiliza para antígenos pequeños y tiene una baja variabilidad, pero también tiene una baja especificidad. A pesar de sus desventajas, estas pruebas son comúnmente utilizadas y con un alto valor diagnóstico.



Además de las ya mencionadas, existen otros dos tipos de ELISA que son muy comúnmente utilizadas. La técnica ELISA de sándwich o de captura se basa en un anticuerpo fijado en el fondo del pocillo, después se añade la muestra o analito a detectar. Finalmente se utiliza un anticuerpo conjugado a una enzima y se añade el sustrato para revelar la reacción. Suele ser una técnica muy sensible y específica, pero requiere de más tiempo y de anticuerpos que reconozcan diferentes epítomos de un mismo antígeno para detectarlo (Alhajj y Farhana, 2021). Por otra parte, la prueba de ELISA indirecta consiste en un antígeno fijado en el pocillo, donde se añade la muestra que se espera que tenga los anticuerpos de reconocimiento. Posteriormente, se agrega un segundo anticuerpo conjugado con una enzima, cuya función es reaccionar con el sustrato correspondiente para revelar el resultado. Esta prueba es ampliamente utilizada para detectar anticuerpos en muestras serológicas, y tiene las ventajas de que es altamente sensible, económica y flexible (Shah y Maghsoudlou, 2016). Esto hace que la prueba de ELISA indirecta sea ideal para estudios epidemiológicos que contemplan una gran cantidad de muestras y en los que es necesario obtener resultados rápidamente.

A pesar de las ventajas en la prueba de ELISA indirecta para evaluar seroprevalencia, el uso de un anticuerpo secundario para la detección puede llegar a ser un problema. Los anticuerpos secundarios suelen ser específicos para cada isotipo de los anticuerpos en las muestras (Murphy *et al.*, 2019). En los estudios de seroprevalencia generalmente se busca detectar todos los isotipos de anticuerpos contra el patógeno a evaluar, lo que implicaría la necesidad de anticuerpos secundarios específicos para cada isotipo. Además, los anticuerpos secundarios se producen de manera específica para reconocer anticuerpos de una única especie ya sea humano, perro, gato u otro animal (Lin, 2015). Al utilizar muestras de distintas especies animales sería necesario el uso de diversos anticuerpos secundarios contra cada especie animal. Con base a lo anterior, el desarrollo de una prueba de ELISA que no requiera un anticuerpo secundario facilitaría el uso de muestras de diversas especies y la detección de todos los isotipos de anticuerpos en las muestras.

Una variación de la prueba ELISA de captura es mediante el uso de un antígeno inmovilizado en un pocillo de una placa (antígeno de captura), donde se añadiría la muestra serológica. Si en la muestra existen anticuerpos contra el antígeno estos se unirían a través de uno de sus paratopos. Posteriormente, se agregaría el mismo antígeno que fue fijado en la placa, pero conjugado con una enzima, y que se uniría al paratopo libre del anticuerpo reconocido (antígeno de reconocimiento) (Deng *et al.*, 2008). Esta prueba presenta las ventajas de que puede ser utilizada para una gran

diversidad de especies y no es necesario un anticuerpo secundario, por lo que resulta muy conveniente para evaluar la transmisión antroponóica de SARS-CoV-2. Existen algunos estudios que han utilizado este tipo de ELISA para evaluar anticuerpos antiproteína N en perros y gatos (Barua *et al.*, 2021; Cardillo *et al.*, 2022), sin embargo, no se han comparado sus resultados con pruebas de ELISA indirecta, ni con el uso de otros antígenos virales. Por ende, surge la pregunta de investigación: Al comparar las pruebas de ELISA indirecta y doble antígeno, ¿cuál tiene mayor sensibilidad y especificidad para detectar anticuerpos contra SARS-CoV-2 en muestras de perros y gatos?

Otra manera de clasificar a las pruebas serológicas de ELISA es a través de sus generaciones. Esta clasificación se ejemplifica claramente con las pruebas desarrolladas para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Las pruebas de primera generación para la detección de anticuerpos contra VIH utilizaban lisados de células infectadas con el virus y tenían suficiente sensibilidad, pero no especificidad. Por otra parte, las pruebas de segunda generación utilizaban proteínas recombinantes como antígenos, y mejoraron su sensibilidad y especificidad. Tanto las pruebas de primera como de segunda generación eran de tipo indirecta. Posteriormente se desarrollaron pruebas ELISA de tercera generación de tipo doble antígeno, que permitían detectar IgG e IgM, y además se utilizaron péptidos recombinantes de ambos tipos de VIH (VIH-1 y VIH-2). Con esta prueba, se observó una mejora en la sensibilidad y especificidad. Finalmente, se desarrollaron pruebas de cuarta generación, donde se fijaban antígenos para detectar anticuerpos contra VIH-1 y VIH-2. Además, en este mismo sistema de ELISA se fijaba un anticuerpo para la detección del antígeno p24 en suero, que indicaba infección aguda (Alexander Thomas, 2016; Barik *et al.*, 2018).

Hasta el momento, una gran cantidad de los estudios publicados utilizan pruebas de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2, entre los cuáles se encuentran estudios publicados en gatos (Bold *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2020) y en perros (Dileepan *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022). Así también, algunos otros utilizan una prueba de ELISA doble antígeno comercial dirigida contra la proteína N de SARS-CoV-2 (Barua *et al.*, 2021; Cardillo *et al.*, 2022). Al igual que lo observado con la prueba de tercera generación para VIH, se esperaría que una prueba doble antígeno con dos proteínas distintas de SARS-CoV-2 tuviera una mejor sensibilidad y/o especificidad en comparación a las pruebas de ELISA indirecta. Además, esta prueba facilitaría el uso de muestras provenientes de distintas especies, lo cual resulta importante debido a que

SARS-CoV-2 puede infectar a diversas especies. Con ello, se podría mejorar la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2 en perros y gatos que estuvieron expuestos al virus, aunque esto se desconoce hasta el momento.

### **3. HIPÓTESIS**

El desarrollo de una prueba ELISA doble antígeno será más sensible y específica que una prueba de ELISA indirecta y permitirá evaluar la presencia de anticuerpos contra SARS-CoV-2 en diversas especies como perros, gatos y humanos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo General**

Desarrollar una prueba de ELISA doble antígeno multiespecie para determinar la presencia de anticuerpos contra SARS-CoV-2 en perros y gatos.

### **4.2. Objetivos Específicos**

- Obtener muestras serológicas de perros y gatos provenientes de hospitales veterinarios del estado de Sonora.
- Establecer una técnica de ELISA indirecta para detectar anticuerpos contra la proteína N, S1 y RBD de SARS-CoV-2 en muestras de perros y gatos.
- Establecer una técnica de ELISA doble antígeno multiespecie para detectar anticuerpos contra SARS-CoV-2 en muestras de perros, gatos y humanos.
- Correlacionar los resultados obtenidos mediante las pruebas de ELISA indirecta y ELISA doble antígeno con la prueba de microneutralización.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Muestras Serológicas: Obtención y Almacenamiento

Se utilizaron remanentes de muestras serológicas de animales de compañía (perros y gatos) que fueron colectadas bajo estrictas medidas de cuidado animal y por personal capacitado en veterinarias de Hermosillo, Sonora. Entre estas se encontraba la “Clínica Veterinaria Animal Home” localizada en calle Camelia 534 en Colonia Luis Encinas con código postal (C.P.) 83180. Además, también se obtuvieron muestras del “Hospital De Urgencias Veterinarias Borges”, localizado en Calle de los Olmos 50, en la Colonia Fuentes del Mezquital, C.P. 83240. Este último fue el sitio primordial para toma de muestras, ya que recibe animales de todas las áreas de la ciudad, así como de otras ciudades del estado de Sonora. Los procedimientos empleados para la toma de muestras se realizaron acorde a lo descrito en la NOM-062-ZOO-1999, con protocolos de mínima invasión y considerando en todo momento el bienestar animal. Además, este proyecto fue aprobado por el comité de ética de investigación de CIAD (CEI/005-2/2020).

Las muestras de animales fueron tomadas por un médico veterinario zootecnista que portaba un equipo de protección personal adecuado (bata, guantes, cubrebocas y gafas). Además, el personal realizó protocolos de asepsia entre cada paciente atendido, como lavado de manos con agua y jabón, y desinfección del área de trabajo. En todo momento se garantizó el bienestar animal, empleando métodos de sujeción adecuados para la especie, con el fin de minimizar el estrés del animal (NOM-062-ZOO-1999). Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción de la vena cefálica o yugular con previa limpieza de la zona. En caso de colectar la muestra de la vena cefálica, primero se colocó un torniquete en el plano proximal del miembro craneal. Los tubos estériles en los que se tomaron las muestras fueron rotulados con una clave diseñada para la correcta identificación de las muestras. Para la estandarización de la prueba ELISA doble antígeno se utilizaron muestras serológicas de humanos, debido a que se trata de una prueba multi especie. Las muestras negativas fueron recolectadas en un período previo a la pandemia y las muestras positivas fueron recolectadas como parte de un proyecto de investigación para la determinación de anticuerpos en pacientes vacunados con CanSino en enero de 2022. Se utilizaron tubos sin

anticoagulante para obtener el suero sanguíneo.

Todas las muestras se transportaron en hieleras a temperatura de refrigeración (4 °C) al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.), donde se llevó a cabo el procedimiento experimental. La toma de muestra animal se encuentra clasificada como actividad de baja invasión y riesgo según la NOM-062-ZOO-1999. Los materiales de desecho producidos en este procedimiento se dispusieron conforme a la NOM-087-ECOL-1996, entre estos están las jeringas, tubos y punzocortantes, que se desecharon en contenedores o bolsas apropiados para residuos biológicos. Los tubos con sangre se centrifugaron a 771 g por 15 minutos para obtener el suero. Los sueros se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Las muestras se procesaron en una campana de bioseguridad nivel IIA, empleando equipo de protección personal y tomando las medidas pertinentes para el manejo y desecho de residuos biológicos (NOM-087-ECOL-1996).

## 5.2. Detección de Anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en Perros y Gatos

### 5.2.1. Detección de Anticuerpos en Perros y Gatos contra la Proteína N, S1 o RBD Recombinante

5.2.1.1. ELISA Indirecta. Se utilizaron pruebas de ELISA indirecta para detectar anticuerpos IgG contra la proteína N, RBD y S1 recombinantes de SARS-CoV-2, las cuales fueron producida en el laboratorio de inmunología de CIAD (Melgoza-González *et al.*, 2021). Para la estandarización de la técnica se probaron distintas condiciones. Esta técnica se estandarizó utilizando distintas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) al 2% y 3% en el amortiguador de bloqueo (2% o 3% BSA, 0.02% azida de sodio y 3% glucosa en amortiguador de fosfatos (PBS, 0.8% NaCl, 0.115% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02% KCl) con Tween20 (Sigma Aldrich) al 0.05%). Además, se utilizaron diferentes concentraciones de leche (NFDM, Non-Fat Dry Milk Omniblok, AmericanBio) al 1%, 2% y 3%, y distintas diluciones de los sueros con esta leche que fueron 1:100, 1:150 y 1:200. Así también, se probaron placas bloqueadas con un amortiguador de bloqueo comercial (General Block, ImmunoChemistry Technologies), en las cuáles se utilizó una solución

comercial para diluir las muestras (General Serum Diluent GSD, ImmunoChemistry Technologies). También se probaron variaciones en la concentración del anticuerpo secundario anti-IgG de perro conjugado con peroxidasa HRP (Goat anti-Dog IgG HRP Conjugate, BETHYL). Con base a esto, se determinaron las mejores condiciones de la prueba, con el fin de reducir uniones inespecíficas. La técnica quedó establecida como se presenta a continuación. Se utilizó una placa de 96 pocillos de máxima adherencia (ThermoFisher Scientific) para fijar las proteínas N, S1 o RBD recombinante, según fue el caso. La fijación se realizó diluyendo la proteína con amortiguador de carbonatos ( $\text{NaHCO}_3$  0.01 M y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.0875M pH 9) a una concentración de 2  $\mu\text{g/mL}$ , después se añadió a los pocillos y se incubó a 4 °C durante toda la noche. Al siguiente día la placa se decantó, se lavaron los pocillos con 250  $\mu\text{L}$  de solución de amortiguador de fosfatos (PBS, 0.8% NaCl, 0.115%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.02%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.02% KCl) y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  del amortiguador de bloqueo (2% BSA, 0.02% azida de sodio y 3% glucosa en PBS con Tween20 (Sigma Aldrich) al 0.05%) durante una hora a temperatura ambiente.

Las muestras serológicas se manejaron en una campana de bioseguridad nivel II, diluyéndose 1:150 con leche (NFDM, Non-Fat Dry Milk Omniblok, AmericanBio) al 1% y se agregaron 50  $\mu\text{L}$  a cada pocillo para incubarse por 30 minutos. Después se agregaron 50  $\mu\text{L}$  del anticuerpo secundario anti-IgG de perro conjugado con peroxidasa (Goat anti-Dog IgG HRP Conjugate, BETHYL) diluido 1:100,000 con PBS, y se incubó por 30 minutos. Finalmente, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  del reactivo 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB 1-Component HRP Microwell Substrate, ImmunoChemistry Technologies) por 20 minutos para revelar la reacción, y después se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M para detener la reacción.

Todas las incubaciones mencionadas anteriormente se realizaron en agitación constante, oscuridad y temperatura ambiente (25 °C), excepto durante la fijación del antígeno. Además, se realizaron cinco lavados entre incubaciones con 250  $\mu\text{L}$  de Tween20 al 0.1% en PBS, posteriores a la incubación de los sueros y a la adición del anticuerpo secundario. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan FC) a una longitud de onda de 450 nm. Estas condiciones se mantuvieron al utilizar los tres antígenos, ya que solamente se buscaba reducir el fondo de las uniones inespecíficas provocadas por los anticuerpos de la muestra o el anticuerpo secundario.

En el caso de los gatos, las condiciones de la prueba para la detección de proteína N, S1 y RBD se mantuvieron iguales a las utilizadas con perros, ya que se buscaba disminuir las uniones



inespecíficas, con un único cambio al utilizar un anticuerpo secundario anti-IgG de gato (Goat anti-Cat HRP Conjugate, BETHYL). Se probaron cuatro diluciones distintas del anticuerpo secundario contra IgG de gato (Goat anti-Cat HRP Conjugate, BETHYL) que fueron 1:50,000 diluido con estabilizador (Antigen-Down HRP Conjugate Stabilizer, 5X, ImmunoChemistry Technologies) y 1:100,000 diluido con PBS, así como 1:25,000; 1:50,000 y 1:100,000 diluidos con GSD. Estas condiciones se probaron para observar si las diluciones del anticuerpo con GSD podrían disminuir el fondo o las uniones inespecíficas. Con base a esto, se decidió utilizar el anticuerpo diluido 1:50,000 con estabilizador. Tomando en cuenta los resultados, las condiciones de la prueba quedaron establecidas como se presentan a continuación.

Se utilizó una placa de 96 pocillos de máxima adherencia (ThermoFisher Scientific) para fijar al antígeno N, S1 o RBD recombinante. La fijación se realizó diluyendo la proteína N, S1 o RBD con amortiguador de carbonatos, a una concentración de 2 µg/mL, después se añadió a los pocillos y se incubó a 4 °C durante la noche. Al siguiente día la placa se decantó, se lavaron los pocillos una vez con 250 µL de solución de PBS y se agregaron 100 µL del amortiguador de bloqueo (2% BSA, 0.02% azida de sodio y 3% glucosa en PBS con Tween20 al 0.05%) durante una hora a temperatura ambiente. Las muestras serológicas se manejaron en una campana de bioseguridad nivel II, diluyéndose 1:150 con leche al 1% y se agregaron 50 µL a cada pocillo para incubarse 30 minutos. Después se agregaron 50 µL del anticuerpo secundario anti-IgG de gato conjugado con peroxidasa diluido 1:50,000 con estabilizador y se incubó por 30 minutos. Finalmente, se adicionaron 50 µL del reactivo TMB por 20 minutos para revelar la reacción, y después se añadieron 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M para detener la reacción.

Todas las incubaciones mencionadas anteriormente se realizaron en agitación constante, oscuridad y temperatura ambiente (25 °C), excepto durante la fijación del antígeno. Además, se realizaron cinco lavados entre incubaciones con 250 µL de Tween20 al 0.1% en PBS, posteriores a la incubación de los sueros y a la adición del anticuerpo secundario. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan FC) a una longitud de onda de 450 nm. Estas condiciones se mantuvieron al utilizar el antígeno S1, ya que solamente se buscaba reducir el fondo de las uniones inespecíficas provocadas por los anticuerpos de la muestra o el anticuerpo secundario.

5.2.1.2. ELISA Doble Antígeno. Se desarrollaron pruebas de ELISA doble antígeno multiespecie para evaluar la presencia de anticuerpos contra SARS-CoV-2 en muestras de perros y gatos. En una prueba se utilizó la proteína N como antígeno, en otra se utilizó a la proteína RBD y en una tercera prueba se utilizaron ambas proteínas fijadas en la placa. Estas proteínas recombinantes de SARS-CoV-2 fueron producidas en el laboratorio de inmunología de CIAD (Melgoza-González *et al.*, 2021). Las proteínas se diluyeron en una solución comercial (Antigen Coating Buffer 5X, ImmunoChemistry Technologies), se agregaron 50 µL a cada pocillo en una placa de 96 pocillos y esto se incubó por 24 horas a temperatura ambiente. La cantidad de antígeno de captura y de antígeno de reconocimiento se estableció probando distintas concentraciones con la proteína N. Después, la proteína N se fijó a concentraciones de 3 µg/mL para perros y gatos. La proteína RBD se fijó a una concentración de 2 µg/mL para perros y gatos. Ambos antígenos se fijaron en una misma placa a una concentración de 1 µg/mL cada uno. Las proteínas de reconocimiento peroxidadas se utilizaron a la misma concentración que la proteína fijada.

Las placas se bloquearon utilizando un amortiguador de bloqueo comercial (General Block, ImmunoChemistry Technologies) durante 24 horas a temperatura ambiente. Las muestras se diluyeron 1:1 con una solución comercial (GSD, ImmunoChemistry Technologies) y se incubaron 50 µL de las diluciones durante 1 hora en una incubadora (Shel Lab) a 37 °C. Posteriormente se agregaron las proteínas N y RBD peroxidadas (N-HRP, RBD-HRP) a cada placa según correspondiera, las cuáles se encontraban a la misma concentración que la proteína fijada, y se incubaron 30 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Para revelar la reacción se agregó el reactivo TMB y se incubó durante 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Para detener la reacción se agregaron 50 µL de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. Se realizaron cinco lavados con 250 µL de Tween20 al 0.1% en PBS, posteriores a la incubación de los sueros y a la adición de las proteínas peroxidadas. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan FC) a una longitud de onda de 450 nm.

## **5.2.2. Detección de Anticuerpos Neutralizantes de Perros y Gatos contra SARS-CoV-2**

5.2.2.1. Prueba de Neutralización Simulada. Para evaluar la presencia de anticuerpos neutralizantes

se utilizó una prueba de neutralización simulada. Se utilizó una placa de 96 microtubos (Corning) para realizar una dilución 1:10 de los sueros con PBS para obtener un volumen final de 60 µL. En cada pocillo se agregaron 60 µL de RBD-HRP a una concentración de 400 ng/mL y se incubó durante 30 minutos en una incubadora (Shel Lab) a 37 °C. Después se agregaron 100 µL de esta mezcla a una placa fijada con 3 µg/mL de ACE-2 recombinante y se incubó durante 15 minutos en una incubadora (Shel Lab) a 37 °C. Posteriormente se realizaron tres lavados con 250 µL de Tween20 al 0.1% en PBS. Para revelar la reacción se utilizaron 100 µL de TMB y se incubó durante 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Para detener la reacción se agregaron 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan FC) a una longitud de onda de 450 nm. El punto de corte se determinó al 20%, con base a lo observado en los cálculos de sensibilidad y especificidad. Para determinar los porcentajes de neutralización se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% N = \left( 1 - \left( \frac{Abs\ Muestra}{Abs\ CN} \right) \right) \times 100\% \quad (1)$$

Donde %N es el porcentaje de neutralización, Abs Muestra es la absorbancia de la muestra y Abs CN es la absorbancia del control negativo.

5.2.2.2. Prueba de Microneutralización. Los sueros fueron inactivados por radiación gamma con cobalto 60 y se mantuvieron a 56 °C por una hora. Se utilizó la línea celular Vero C1008 a una concentración de 1.5x10<sup>5</sup> células/mL en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Las células se prepararon entre 12-18 horas previas para alcanzar una confluencia del 70 al 80%. Posteriormente se realizó una dilución inicial de 1:10 de los sueros inactivados en placas de 96 pocillos de fondo plano (Corning® Cat. No. CLS3585-50EA). La dilución se realizó con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco® Cat. No. 11995-065) suplementado con 2% de suero fetal bovino (BFS ATCC, Cat. No. 30-2020) y 2% de solución de antibióticos penicilina-estreptomicina-anfotericina B (SIGMA, Cat. No. A5955). Se realizaron diluciones dobles con 50 µL hasta llegar a una dilución de 1:5,120. Después se agregaron 50 µL de virus ajustado a una concentración de

100 DICC50 (Dosis Infecciosa en Cultivo Celular) y se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 60 minutos. Después de la incubación, se transfirieron 100 µL de la mezcla suero-virus a las placas de 96 pocillos con células Vero. Además, se agregaron 100 µL de DMEM con 2% de BFS y las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas. Finalmente, se realizó la lectura e interpretación de los resultados.

Para corroborar y comparar los resultados obtenidos por las pruebas de ELISA, las muestras serológicas de perros y gatos se evaluaron mediante la técnica de microneutralización, que se realizó por un servicio externo (Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales, CPA del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, SENASICA).

### 5.3. Análisis Estadístico.

Se obtuvieron las medias aritméticas de los valores de absorbancia en muestras negativas para cada prueba, así como sus desviaciones estándar. Se determinaron los puntos de corte para la prueba de ELISA Indirecta y ELISA de doble antígeno mediante la suma de las medias más el doble de la desviación estándar. Los valores de absorbancia se transformaron a unidades arbitrarias (UA) a partir de una fórmula para cada prueba.

Los resultados de la estandarización de ELISA indirecta se analizaron a través de una prueba de Kruskal Wallis y de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Los resultados obtenidos en cada prueba se compararon utilizando una prueba de correlación de Spearman, con un nivel de significancia de 0.05. Estos análisis se realizaron en el paquete de análisis estadístico GraphPad PRISM versión 8.0.2.

Los intervalos de confianza para la sensibilidad y especificidad de las pruebas se obtuvieron con la prueba de Clopper-Pearson en el software MedCalc. Las curvas ROC se generaron en el programa R studio 2022.07.1. Además, los valores de frecuencia se compararon mediante pruebas de hipótesis para proporciones a un nivel de confiabilidad del 95%. Este análisis se llevó a cabo en el software NCSS 2021 versión 11.

Se realizó un alineamiento múltiple para evaluar la similitud de las secuencias de aminoácidos de

la proteína N de SARS-CoV-2 con las diversas nucleoproteínas pertenecientes a coronavirus que infectan a perros y gatos. Todas las secuencias fueron obtenidas del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). Las secuencias de la proteína N de SARS-CoV-2 fueron obtenidas de la secuencia de referencia de NCBI (NC\_045512.2). Además, se obtuvieron las secuencias de coronavirus canino (GenBank: AAR11076.1), coronavirus respiratorio canino (GenBank: ANA11064.1), coronavirus felino (GenBank: QSL97057.1) y del virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) (GenBank: QGH83691.1). El análisis se realizó utilizando el método Clustal W con el programa MegAlign.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. ELISA Indirecta

Se estandarizó la técnica de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos IgG en muestras serológicas de perros y gatos utilizando al antígeno N. Se establecieron como condiciones iniciales de la prueba al amortiguador de bloqueo con BSA al 2% incubado durante una hora, diluciones de los sueros 1:100 con leche al 1% y anticuerpo anti-IgG diluido 1:40,000, con el resto de las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos. En las pruebas de ELISA pueden ocurrir falsos positivos independientemente del antígeno utilizado, los cuales están involucrados con uniones inespecíficas como la unión hidrofóbica de inmunoglobulinas de la muestra a la superficie del pocillo, la cual genera los falsos positivos más intensos (Terato *et al.*, 2014). Con base a esto se realizaron modificaciones en la concentración de BSA en el amortiguador de bloqueo, en la leche para la dilución de los sueros y del anticuerpo secundario. Lo anterior con la finalidad de que las proteínas de estas soluciones se unieran a los espacios libres en el pocillo y evitar uniones inespecíficas de anticuerpos. Se utilizaron muestras de perros para estandarizar las concentraciones en el amortiguador de bloqueo de la prueba y en el diluyente de sueros, pero los resultados se aplicaron también a muestras de gatos, ya que solo se buscaba disminuir el fondo en las pruebas.

Se evaluaron diferentes condiciones con el diluyente de muestras y distintas diluciones del anticuerpo secundario anti-IgG de perro. Se seleccionaron cuatro muestras de perros con valores representativos de absorbancia para observar el efecto de la leche en una concentración a 2% y 3%, de BSA al 2% y de distintas diluciones del anticuerpo secundario (Cuadro 4). De manera general, las absorbancias tuvieron valores más elevados al utilizar BSA al 2% para diluir las muestras; mientras que al utilizar leche al 1% y 2% las absorbancias fueron más bajas y muy similares, por lo que se determinó que el uso de leche era el más adecuado para la dilución de los sueros. En cuanto al anticuerpo secundario contra IgG de perro, las muestras con absorbancias elevadas se mantuvieron con valores altos mientras que las muestras con absorbancias bajas disminuyeron sus valores con la dilución de anti-IgG a 1:80,000 en comparación a 1:40,000 y 1:60,000 (Cuadro 4). Debido a que la dilución más alta fue la que mostró mejores resultados, el anticuerpo secundario

se diluyó hasta 1:100,000 y 1:120,000. Para determinar a la mejor concentración de las anteriores, se evaluaron 48 muestras serológicas de perros (Figura 2a). Se decidió mantener el anticuerpo en una dilución 1:100,000, pues al diluirlo más (1:120,000) los valores más altos disminuían y podían confundirse con muestras negativas, produciendo posibles falsos negativos.

Cuadro 4. Estandarización de anticuerpo secundario y solución de bloqueo para ELISA indirecta contra antígeno N.

|                 | Muestra 1         | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1         | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1         | Muestra 2 | Muestra 3 |
|-----------------|-------------------|-----------|-----------|-------------------|-----------|-----------|-------------------|-----------|-----------|
|                 | Anti-IgG 1:40,000 |           |           | Anti-IgG 1:60,000 |           |           | Anti-IgG 1:80,000 |           |           |
| <b>Leche 1%</b> | 3.402             | 1.162     | 0.571     | 2.771             | 0.7045    | 0.3745    | 2.413             | 0.5365    | 0.2555    |
| <b>Leche 2%</b> | 3.3965            | 1.1735    | 0.5395    | 2.7205            | 0.7775    | 0.418     | 2.273             | 0.5965    | 0.4815    |
| <b>BSA 2%</b>   | 3.4665            | 1.465     | 0.8775    | 3.134             | 0.874     | 0.7215    | 2.652             | 0.585     | 0.6035    |

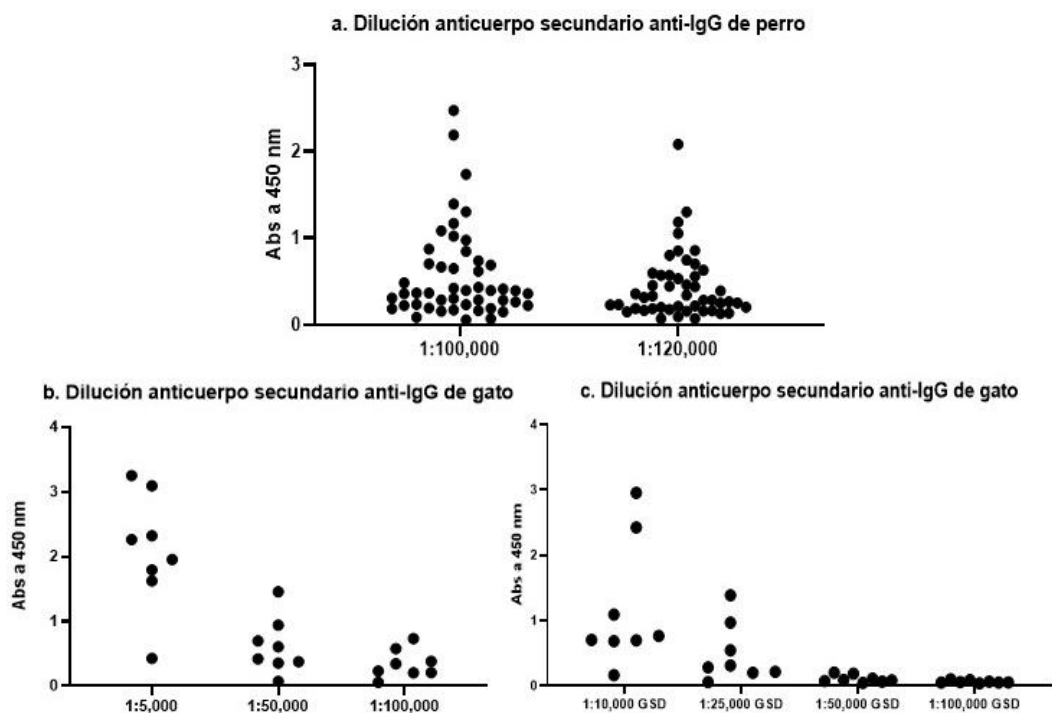


Figura 2. Estandarización del uso de anticuerpos secundarios en las pruebas de ELISA indirecta en perros y gatos. a) Valores de absorbancia a 450 nm de muestras serológicas de perros (n=48) evaluadas con anticuerpo secundario anti-IgG de perro en diluciones 1:100,000 y 1:120,000. b) Valores de absorbancia a 450 nm de muestras serológicas de gatos (n=31) evaluadas con anticuerpo secundario anti-IgG de gato en diluciones 1:5,000, 1:50,000 y 1:100,000 en estabilizador. c) Valores de absorbancia a 450 nm de muestras serológicas de gatos (n=31) evaluadas con anticuerpo secundario anti-IgG de gato en diluciones 1:10,000, 1:25,000, 1:50,000 y 1:100,000 en GSD.

Debido a que la leche fue la que mostró un mejor resultado en comparación a BSA, se probaron distintas concentraciones de leche en las diluciones de los sueros (1, 3 y 5%) (Figura 3a) y se observó que el aumento en la concentración no tuvo efecto significativo en las absorbancias de las muestras ( $p>0.05$ ). Con base en esto, se decidió mantener la leche al 1%, ya que es igual de útil y resulta más costeable. Por otra parte, se evaluaron 32 muestras con modificaciones en las concentraciones de BSA (2, 3 y 4%) en el amortiguador de bloqueo en el primer paso de la prueba de ELISA indirecta, así como una o dos horas de incubación (Figura 3b). Al aumentar la concentración de BSA se esperaba una disminución de la absorbancia en las muestras en caso de que existieran sitios donde podrían generarse uniones inespecíficas. Sin embargo, no se observó disminución significativa en las absorbancias de las muestras evaluadas al aumentar la concentración de BSA ni al aumentar el tiempo de incubación a dos horas con el amortiguador de bloqueo ( $p>0.05$ ). Por lo tanto, se concluyó que es suficiente realizar un bloqueo durante una hora con BSA al 2%.

Una vez determinadas las condiciones del bloqueo y dilución de los sueros, se utilizaron los reactivos comerciales General Block y General Serum Diluent para comparar con el amortiguador de bloqueo BSA 2% y la leche al 1% (Figura 3c). Se utilizaron 32 muestras de perros para realizar las pruebas de ELISA bajo las mismas condiciones, pero con soluciones comerciales y soluciones preparadas en el laboratorio. Los resultados de ambas pruebas fueron muy similares y no se observaron cambios significativos al utilizar las soluciones comerciales ( $p>0.05$ ), por lo que se determinó que se podían utilizar ambas soluciones de manera indistinta sin afectar los resultados. Por otra parte, se probaron diferentes diluciones de los sueros, en 1:150 y 1:200. Se transformaron los valores a unidades arbitrarias y se obtuvieron puntos de corte preliminares utilizando la media más dos desviaciones estándar (Figura 3d). Las muestras con valores menores a 20 fueron negativas, las que tuvieron valores entre 20 y 30 fueron sospechosas y aquellas con unidades arbitrarias sobre 30 fueron positivas. La fórmula para transformar los valores a unidades arbitrarias en la dilución 1:150 fue:

$$UA = (Abs\ muestra \times 10) \div 0.187 \quad (2).$$

Mientras que para la dilución 1:200 fue:



$$UA = (Abs\ muestra \times 10) \div 0.227 \quad (3).$$

Donde UA representa las unidades arbitrarias y Abs muestra es la absorbancia de la muestra

Como era de esperarse, los valores de UA fueron menores en la dilución 1: 200 en comparación a la dilución 1:150. Con la finalidad de permitir el reconocimiento de las muestras sospechosas y mantener una buena sensibilidad de la prueba se mantuvo la dilución de 1:150 donde más muestras fueron reconocidas como sospechosas.

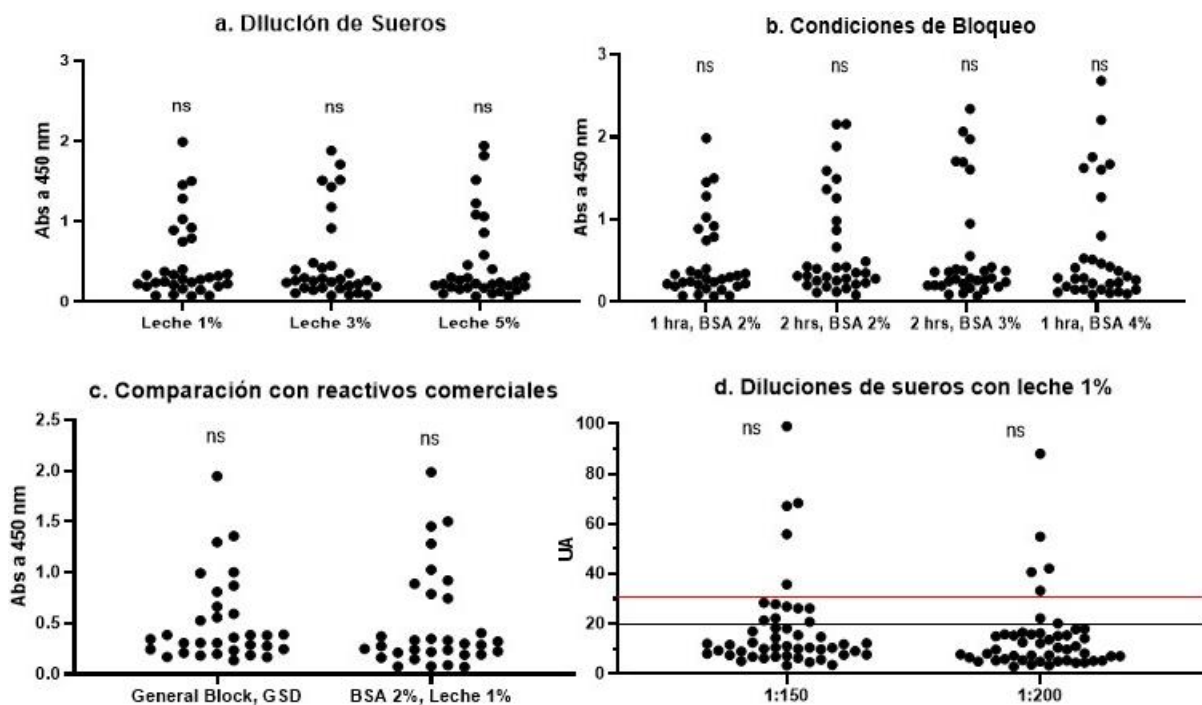


Figura 3. Optimización de diluyentes para la estandarización de la prueba de ELISA Indirecta para disminuir las uniones inespecíficas. a) Valores de absorbancia a 450 nm de muestras serológicas de perros (n=32) diluidas con leche al 1, 3 y 5%. b) Valores de absorbancia a 450 nm de muestras serológicas de perros (n=32) en placas bloqueadas con BSA a concentraciones de 2%, 3% y 4% así como distintos tiempos. c) Valores de absorbancia a 450 nm de muestras serológicas de perros (n=32) evaluadas con soluciones comerciales y del laboratorio. d) Unidades arbitrarias de muestras serológicas de perros (n=48). ns: no hubo diferencia significativa.

Finalmente, se estandarizó el uso del anticuerpo secundario contra IgG de gato. Se evaluaron diluciones 1:5,000, 1:50,000 y 1:100,000 en estabilizador (Figura 2b) así como diluciones 1:10,000, 1:25,000, 1:50,000 y 1:100,000 en GSD (Figura 2c) con la finalidad de probar su capacidad para reducir uniones inespecíficas en este paso. Al diluir 1:50,000 y 1:100,000 con GSD las absorbancias de las muestras eran muy bajas y todas las muestras aparentaban ser negativas, sin embargo, al diluirlo 1:10,000 todas las muestras aparentaban ser positivas. Por otra parte, al evaluar el anticuerpo diluido con estabilizador se observó que al diluirlo en 1:5,000 las absorbancias aumentaban mucho en todos los casos; pero al diluirlo 1:100,000 disminuían hasta aparentar ser todas negativas. Con base en esto, se concluyó que las mejores condiciones para diluir el anticuerpo secundario anti-IgG de gato eran 1:50,000 diluido en estabilizador y 1:25,000 diluido en GSD. Se continuó utilizando al anticuerpo diluido 1:50,000 para economizar el uso de GSD.

Una vez estandarizadas las técnicas, se evaluaron un total de 453 muestras de perro y 31 muestras de gatos. Las muestras de perro se recolectaron desde marzo de 2021 hasta marzo de 2022, y las muestras de gatos fueron recolectadas entre diciembre de 2021 y marzo de 2022. Todas las muestras fueron evaluadas para los tres antígenos recombinantes de SARS-CoV-2 utilizados en el laboratorio: N, S1 y RBD. Inicialmente, no se tuvo acceso al uso de controles positivos o negativos, por lo tanto, para determinar los puntos de corte se calcularon las medias y desviación estándar de los datos, y el valor de corte se determinó sumando dos desviaciones estándar a la media. Los valores se expresaron como unidades arbitrarias y se estableció una fórmula para cada prueba, las cuáles se enlistan en el cuadro 5, donde también se mencionan los puntos de corte establecidos en cada prueba. Se consideraron 10 unidades arbitrarias sobre el valor de corte para establecer una zona gris o de muestras sospechosas. Con base a esto se obtuvieron los resultados positivos, sospechosos y negativos en perros y gatos para las tres proteínas (N, S1 y RBD) de SARS-CoV-2.

Cuadro 5. Valores de corte y fórmulas para las pruebas de ELISA Indirecta en perros y gatos.

| <b>Especie</b> | <b>Proteína</b> | <b>Fórmula</b>                                 | <b>Valor de Corte</b> |           |
|----------------|-----------------|------------------------------------------------|-----------------------|-----------|
| <b>Perro</b>   | N               | $UA = (Abs \text{ muestra} \times 10) / 0.290$ | Negativos             | < 20      |
|                |                 |                                                | Sospechosos           | 20 – 29.9 |
|                |                 |                                                | Positivos             | $\geq 30$ |
| <b>Perro</b>   | S1              | $UA = (Abs \text{ muestra} \times 10) / 0.126$ | Negativos             | < 23      |
|                |                 |                                                | Sospechosos           | 23 – 32.9 |
|                |                 |                                                | Positivos             | $\geq 33$ |
| <b>Perro</b>   | RBD             | $UA = (Abs \text{ muestra} \times 10) / 0.124$ | Negativos             | < 21      |
|                |                 |                                                | Sospechosos           | 21 – 30.9 |
|                |                 |                                                | Positivos             | $\geq 31$ |
| <b>Gato</b>    | N               | $UA = (Abs \text{ muestra} \times 10) / 0.485$ | Negativos             | < 18      |
|                |                 |                                                | Sospechosos           | 18 – 27.9 |
|                |                 |                                                | Positivos             | $\geq 28$ |
| <b>Gato</b>    | S1              | $UA = (Abs \text{ muestra} \times 10) / 0.360$ | Negativos             | < 20      |
|                |                 |                                                | Sospechosos           | 20 – 29.9 |
|                |                 |                                                | Positivos             | $\geq 30$ |
| <b>Gato</b>    | RBD             | $UA = (Abs \text{ muestra} \times 10) / 0.396$ | Negativos             | < 20      |
|                |                 |                                                | Sospechosos           | 20 – 29.9 |
|                |                 |                                                | Positivos             | $\geq 30$ |

De las 31 muestras de gatos evaluadas, para el antígeno RBD se obtuvieron tres muestras positivas y cuatro muestras sospechosas. Así también, para el antígeno S1 hubo cuatro muestras positivas y una muestra sospechosa; mientras que para el antígeno N hubo una muestra positiva y tres muestras sospechosas (Figura 4). La única muestra positiva a la proteína N también fue positiva a RBD y S1. De las cuatro muestras positivas para S1, tres fueron positivas para RBD y coincidieron en un resultado sospechoso para una muestra. Por otra parte, de las 453 muestras de perro evaluadas hubo 32 muestras positivas para RBD, 13 muestras positivas para la proteína N y 21 muestras positivas para el antígeno S1 (Figura 5). En el caso de las muestras con resultados sospechosos, hubo 19 para la proteína RBD, 18 para el antígeno N y 68 para la proteína S1. Al comparar los resultados, entre el antígeno S1 y la proteína N solamente hubo una coincidencia en una muestra positiva y 10 coincidencias en muestras sospechosas. En cuanto al antígeno RBD y la proteína N hubo 12 coincidencias en muestras positivas y cuatro en muestras sospechosas. Finalmente, al comparar a la proteína S1 con la proteína RBD hubo cuatro coincidencias de muestras positivas y ocho coincidencias en muestras sospechosas.

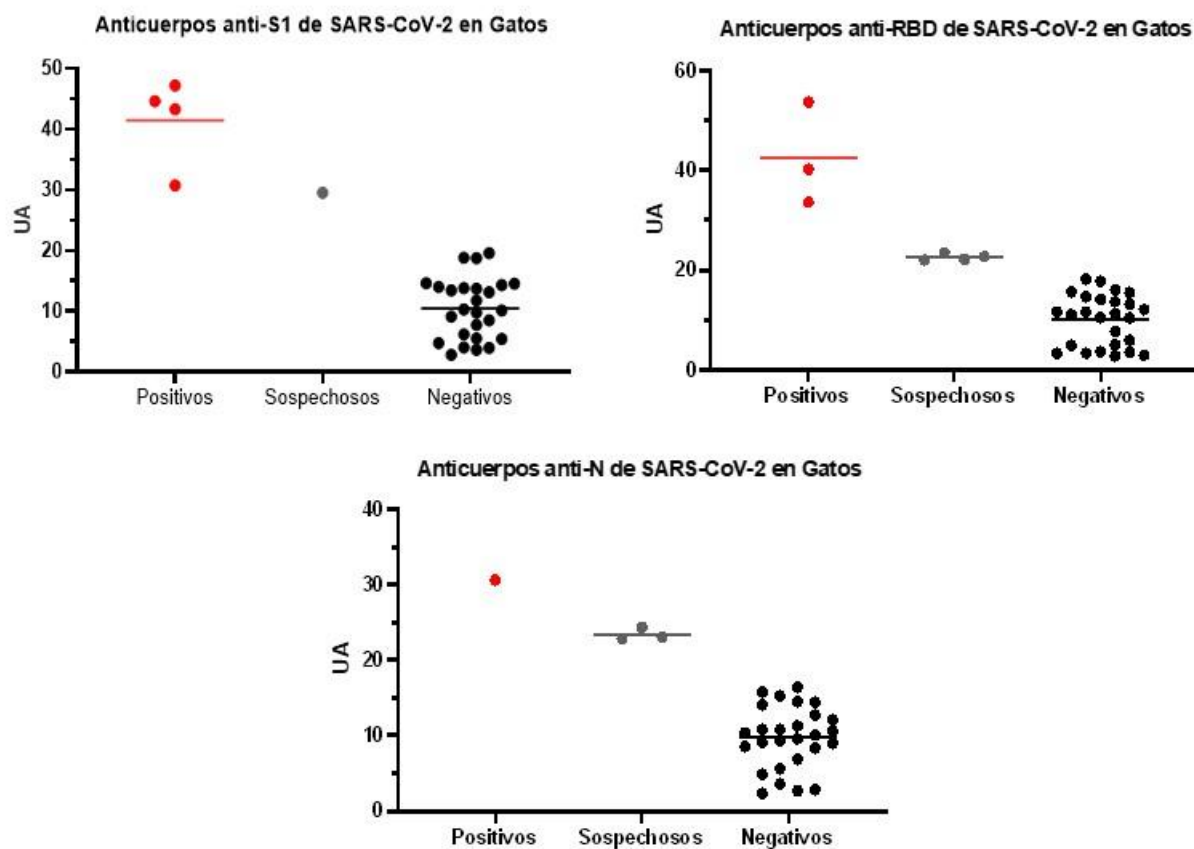


Figura 4. Sueros de gatos evaluados mediante ELISA Indirecta contra los antígenos S1, N o RBD de SARS-CoV-2 (n=31).

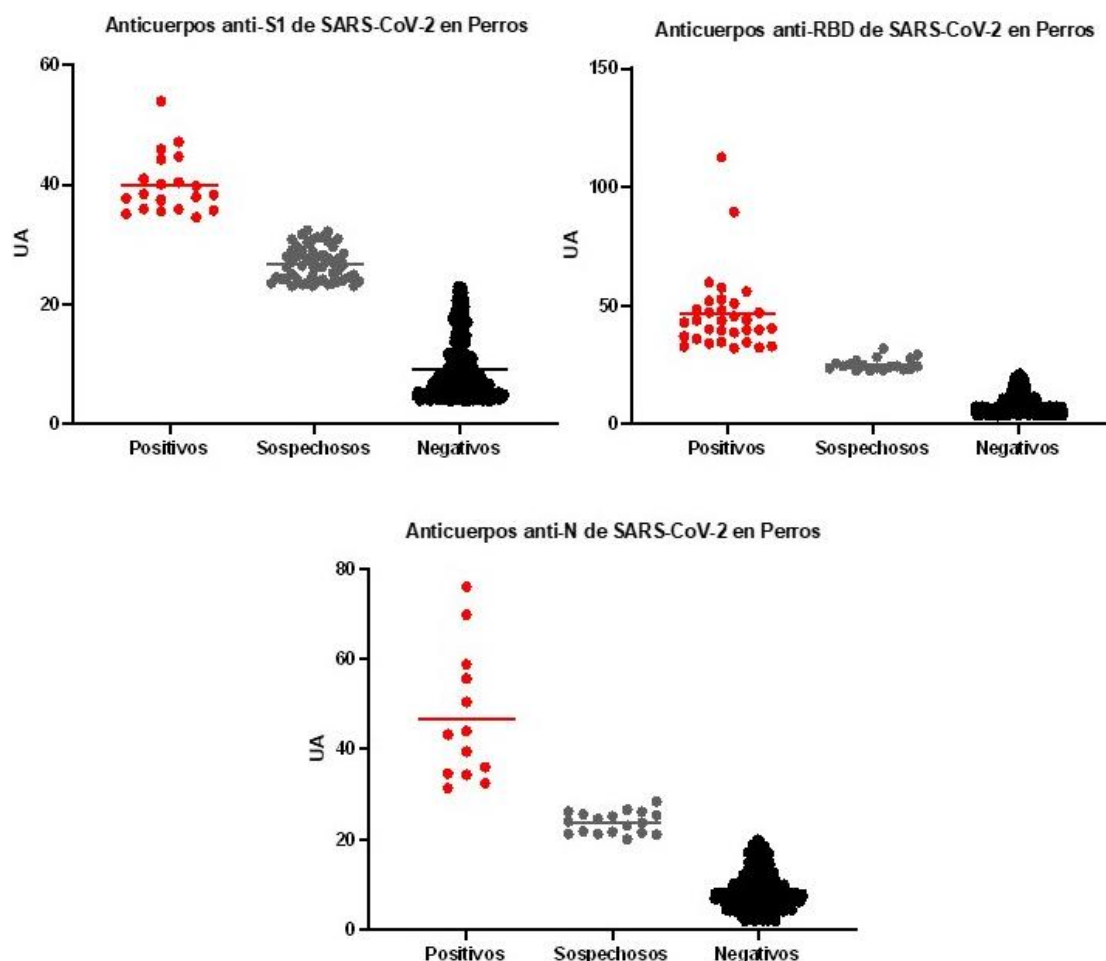


Figura 5. Sueros de perros evaluados mediante ELISA Indirecta contra los antígenos S1, N o RBD de SARS-CoV-2 (n=453).

Con base en las diferencias obtenidas para los tres antígenos en perros y gatos en las pruebas de ELISA indirecta, y con la finalidad de esclarecer los resultados obtenidos, se evaluaron las muestras mediante una prueba de microneutralización. Esta prueba es considerada estándar de oro, así como altamente sensible y específica, debido a que se utiliza el virus infeccioso para evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos (Mohit *et al.*, 2021). Por lo tanto, los resultados de esta técnica se utilizaron como punto de referencia para comparar los resultados obtenidos mediante ELISA. Para la prueba de microneutralización se evaluaron 31 muestras de gatos y 448 muestras de perros. En el caso de los gatos, hubo cinco muestras positivas de las 31 muestras evaluadas, tres de estas tuvieron títulos de 1:10, una de 1:20 y otra de 1:40. En el caso de los perros, 20 muestras fueron positivas de las 448 evaluadas, la mayoría de estas tuvieron títulos bajos de 1:10 (n=13), hubo cuatro con títulos de 1:20, una con título de 1:40, una con título de 1:80 y una con título de 1:320.

Diversos estudios han reportado la presencia de anticuerpos neutralizantes en muestras de perros y gatos. En el caso de los perros, se han reportado títulos de anticuerpos contra SARS-CoV-2 entre 1:20 y 1:180 (Zhao *et al.*, 2022), o entre 1:40 y 1:160 (Perera *et al.*, 2021) mediante la técnica de PRNT. Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestras muestras de perros que tuvieron títulos entre 1:20 y 1:320. En el caso de los gatos, también se han reportado títulos entre 1:20 y 1:1,080 en estudios con muestras grandes de sueros de felinos (n=102) (Zhang *et al.*, 2020), y otros han encontrado títulos entre 1:60 y 1:160 (n=313) (Cardillo *et al.*, 2022) mediante la técnica de microneutralización. Los títulos más altos determinados en las muestras de gatos fueron de 1:20 y 1:40, sin embargo, el tamaño de muestra de gatos evaluado en este estudio es menor, lo cual puede influir en las diferencias de resultados con los estudios publicados.

Con base en los resultados de la prueba de microneutralización se obtuvo la sensibilidad y especificidad de cada prueba desarrollada. La sensibilidad y especificidad son parámetros que evalúan el desempeño de las pruebas diagnósticas, basándose en los resultados de una prueba estándar de referencia. La sensibilidad se refiere a la proporción de muestras verdaderas positivas que son correctamente identificadas como positivas por la prueba diagnóstica, para evaluar su desempeño en contraste con la prueba de referencia. Por otra parte, la especificidad es la proporción de muestras verdaderas negativas que son identificadas correctamente como negativas por la prueba diagnóstica (Trevethan, 2017). Además, se realizaron curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) para determinar el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) de cada prueba. Con estas curvas se evalúa el desempeño de una prueba con relación a la sensibilidad y especificidad de sus distintos puntos de corte posibles. En estas curvas, se grafica la tasa de verdaderas positivas (sensibilidad) en el eje de las “y”, y la tasa de verdaderas negativas (1 - especificidad) en el eje de las “x” (Mandrekar, 2010). Una curva que se acerque más al punto superior izquierdo de la gráfica indica una mejor sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica evaluada. Al suceder esto aumenta el AUC, que indica una mejor sensibilidad y especificidad de la prueba.

En la figura 6 se observan las curvas ROC obtenidas para las pruebas de ELISA indirecta para gatos. La prueba con el mejor AUC fue la prueba de ELISA indirecta con RBD (AUC 84.6%) (Figura 6b), además esta prueba tubo una sensibilidad de 75% y una especificidad de 100%. La prueba de ELISA indirecta con S1 tuvo un AUC de 59%, una sensibilidad de 60% y una especificidad de 96% (Figura 6a). Por otra parte, la prueba de ELISA indirecta con N tuvo un AUC

de 53.8% (Figura 6c), una sensibilidad de 20% y una especificidad de 100%. Todas las pruebas tuvieron valores elevados de especificidad; sin embargo, la sensibilidad fue mucho mayor en la prueba de ELISA indirecta con RBD. Además, esta prueba también tuvo un AUC mayor en comparación al resto. En el caso de los perros, las curvas ROC se observan en la figura 7. La prueba con el mejor AUC fue la prueba de ELISA indirecta con RBD (AUC 88%) (Figura 7b), la sensibilidad de esta fue de 33.33% y su especificidad fue de 93.56%. Además, la prueba de ELISA indirecta con S1 tuvo un AUC de 71.2% (Figura 7a), así como una sensibilidad de 6.67% y una especificidad de 95.05%. La prueba de ELISA indirecta con la proteína N tuvo un AUC de 66.4% (Figura 7c), una sensibilidad de 0% y una especificidad de 96.9%. Cabe mencionar que la sensibilidad y especificidad fueron calculadas con base al punto de corte establecido.

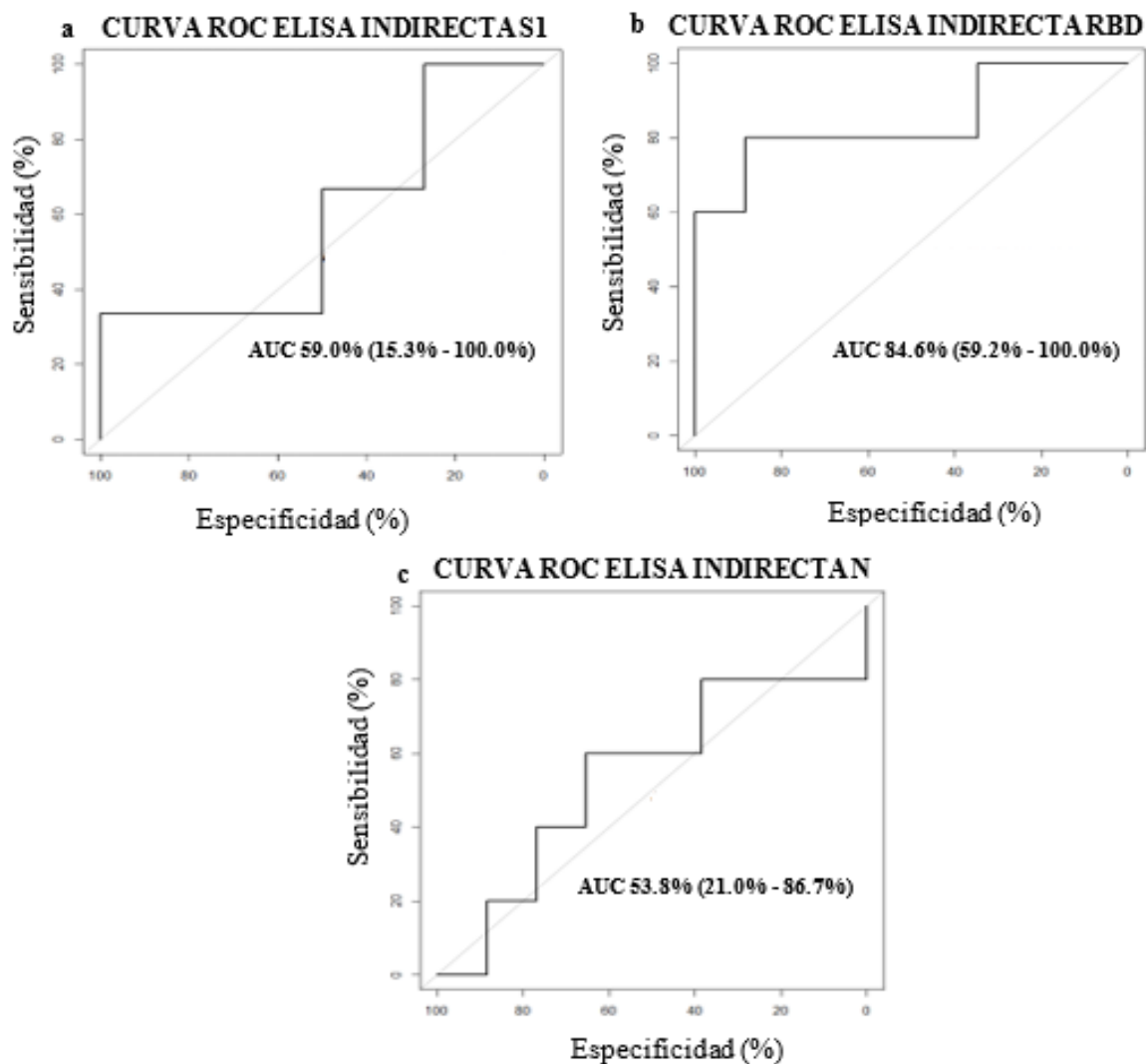


Figura 6. Curvas ROC de las pruebas de ELISA indirecta para distintos antígenos con base a la prueba de microneutralización en muestras serológicas de gatos. El eje de las “y” muestra el porcentaje de sensibilidad y el eje de las “x” muestra 100 – % especificidad, graficado de manera inversa para facilitar la interpretación. a) Curva ROC de la prueba de ELISA indirecta utilizando a la proteína S1 como antígeno b) Curva ROC de la prueba de ELISA indirecta utilizando a la proteína RBD como antígeno c) Curva ROC de la prueba de ELISA indirecta utilizando a la proteína N como antígeno.



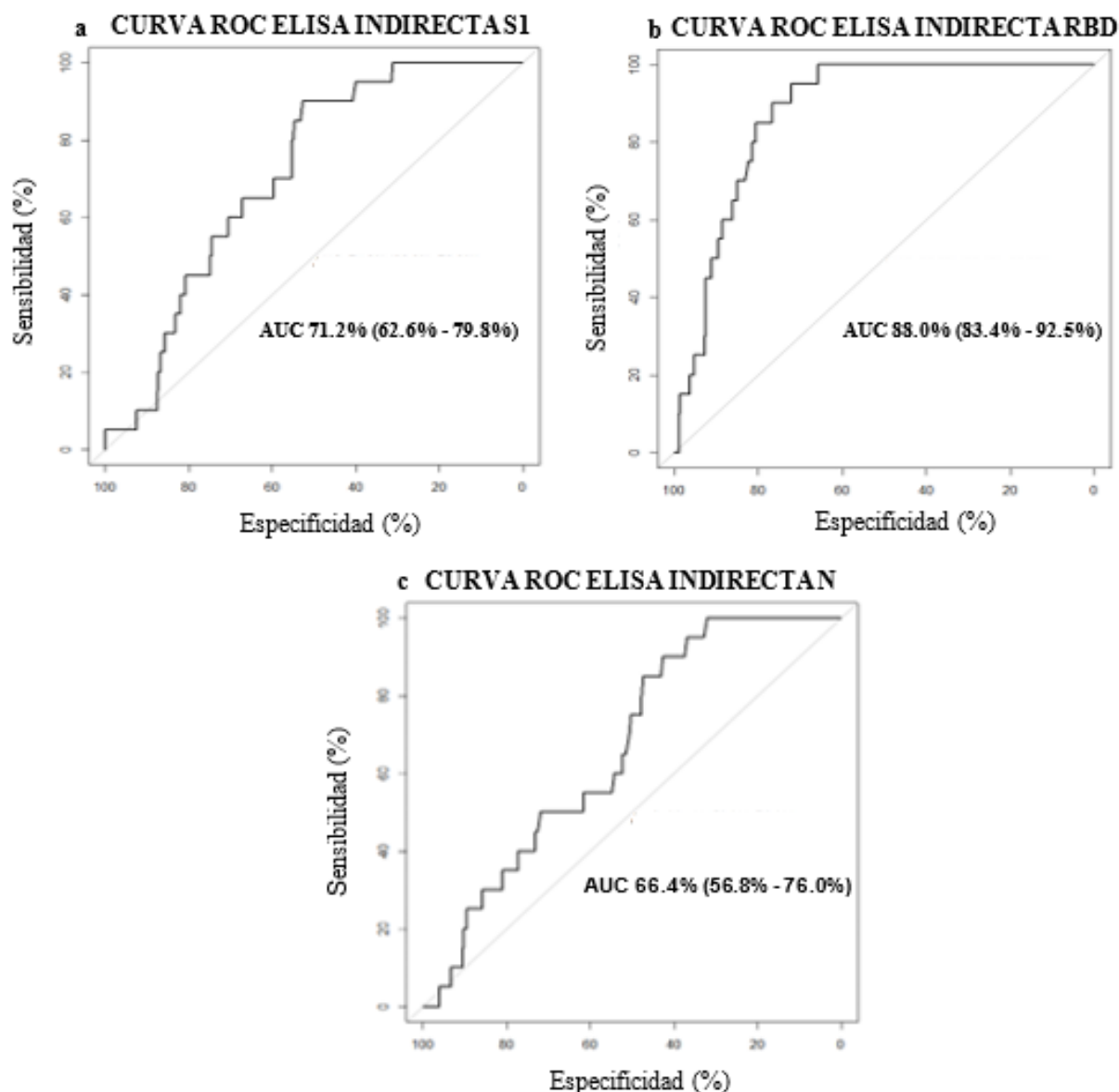


Figura 7. Curvas ROC de las pruebas de ELISA indirecta para distintos antígenos con base a la prueba de microneutralización en muestras serológicas de perros. El eje de las “y” muestra el porcentaje de sensibilidad y el eje de las “x” muestra 100 – % especificidad, graficado de manera inversa para facilitar la interpretación. a) Curva ROC de la prueba de ELISA indirecta utilizando a la proteína S1 como antígeno b) Curva ROC de la prueba de ELISA indirecta utilizando a la proteína RBD como antígeno c) Curva ROC de la prueba de ELISA indirecta utilizando a la proteína N como antígeno.

Además, se realizaron correlaciones con los resultados de la prueba de microneutralización. En la figura 8 se observan las gráficas y coeficientes de correlación de los resultados de ELISA indirecta y microneutralización en muestras de gatos. Los resultados de anticuerpos contra la proteína N de

SARS-CoV-2 obtenidos por ELISA indirecta no tuvieron una correlación significativa con los resultados de microneutralización ( $r = -0.0291$ ,  $p > 0.05$ ). Solamente una muestra con un título de microneutralización de 1:10 fue positiva al antígeno N, pero el resto fueron negativas (Figura 8c). En la prueba de ELISA indirecta donde se utilizó a la proteína S1 hubo correlación, pero no fue significativa ( $r = 0.3399$ ,  $p > 0.05$ ), mientras que con el uso de la proteína RBD hubo una correlación significativa con los resultados de microneutralización ( $r = 0.4552$ ,  $p < 0.05$ ). Tanto para la proteína S1 como para RBD hubo tres muestras positivas a ELISA y a microneutralización, aquellas con los títulos más altos (1:40 y 1:20) además de una con un título de 1:10, la misma que fue positiva a la proteína N. El resto de las muestras positivas a microneutralización y negativas a ELISA con los antígenos RBD o S1 tenían títulos de 1:10 (Figuras 8a y 8b).

En la figura 9 se ilustran las correlaciones de los resultados de ELISA indirecta y microneutralización en muestras de perros. La prueba con el coeficiente de correlación más bajo fue aquella donde se utilizó a la proteína N como antígeno ( $r = 0.1161$ ,  $p < 0.05$ ). En esta prueba solamente se detectó una muestra positiva a microneutralización como sospechosa, pero el resto fueron negativas (Figura 9c). Así también, todas las muestras con valores positivos para el antígeno N fueron negativas a microneutralización. Por otra parte, la prueba con el antígeno S1 tuvo un coeficiente de correlación muy similar a la del antígeno N, aunque ligeramente mayor ( $r = 0.1521$ ,  $p < 0.05$ ). Una de las muestras positivas a microneutralización con un título de 1:40 fue reconocida como positiva también al antígeno S1, sin embargo, las muestras con títulos 1:320, 1:80 y cinco muestras con título de 1:10 fueron reconocidas como sospechosas. Además, hubo 20 muestras positivas y 62 sospechosas para el antígeno S1 pero negativas a microneutralización (Figura 9a).

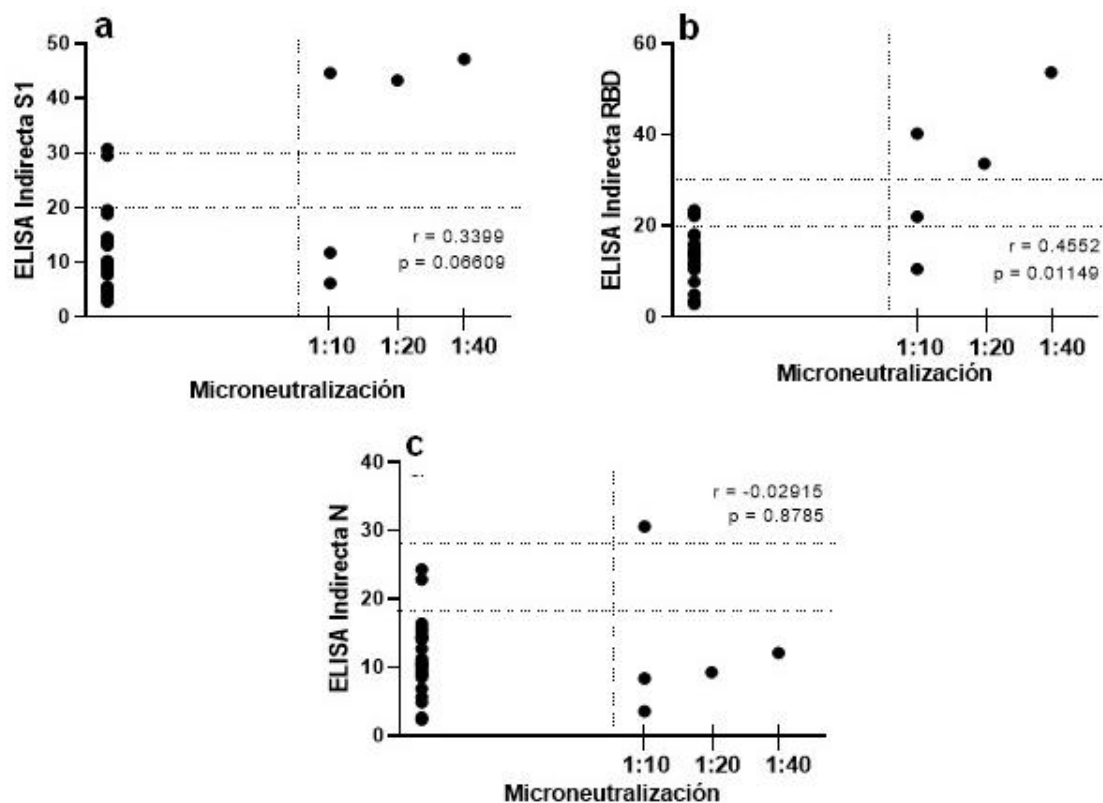


Figura 8. Correlación entre la prueba de ELISA indirecta para distintos antígenos y la prueba de microneutralización en muestras serológicas de gatos. De abajo hacia arriba la primera línea punteada indica el inicio de la zona de muestras sospechosas, y la segunda línea indica el punto de corte para positivas. a) Correlación entre la prueba de ELISA indirecta utilizando a la proteína S1 como antígeno y la prueba de microneutralización en escala de logaritmo base 2. b) Correlación entre la prueba de ELISA indirecta utilizando a la proteína RBD como antígeno y la prueba de microneutralización en escala de logaritmo base 2. c) Correlación entre la prueba de ELISA indirecta utilizando a la proteína N como antígeno y la prueba de microneutralización en escala de logaritmo base 2.

Por otra parte, los resultados de la prueba de ELISA indirecta con el antígeno RBD en muestras de perros tuvieron el coeficiente de correlación más elevado ( $r = 0.2723$ ,  $p < 0.05$ ) en comparación al resto de las pruebas en perros. En esta prueba, tres muestras con títulos de 1:10, una muestra con título de 1:40 y otra con título de 1:80 fueron reconocidas como positivas hacia RBD, además las muestras con títulos 1:320, 1:20 y tres muestras con títulos 1:10 fueron reconocidas como sospechosas (Figura 9b). De aquellas muestras que fueron negativas a microneutralización, 26 fueron positivas a RBD y 14 fueron sospechosas. Así también, hubo 10 muestras con títulos de 1:10 y tres muestras con títulos 1:20 que resultaron negativas.

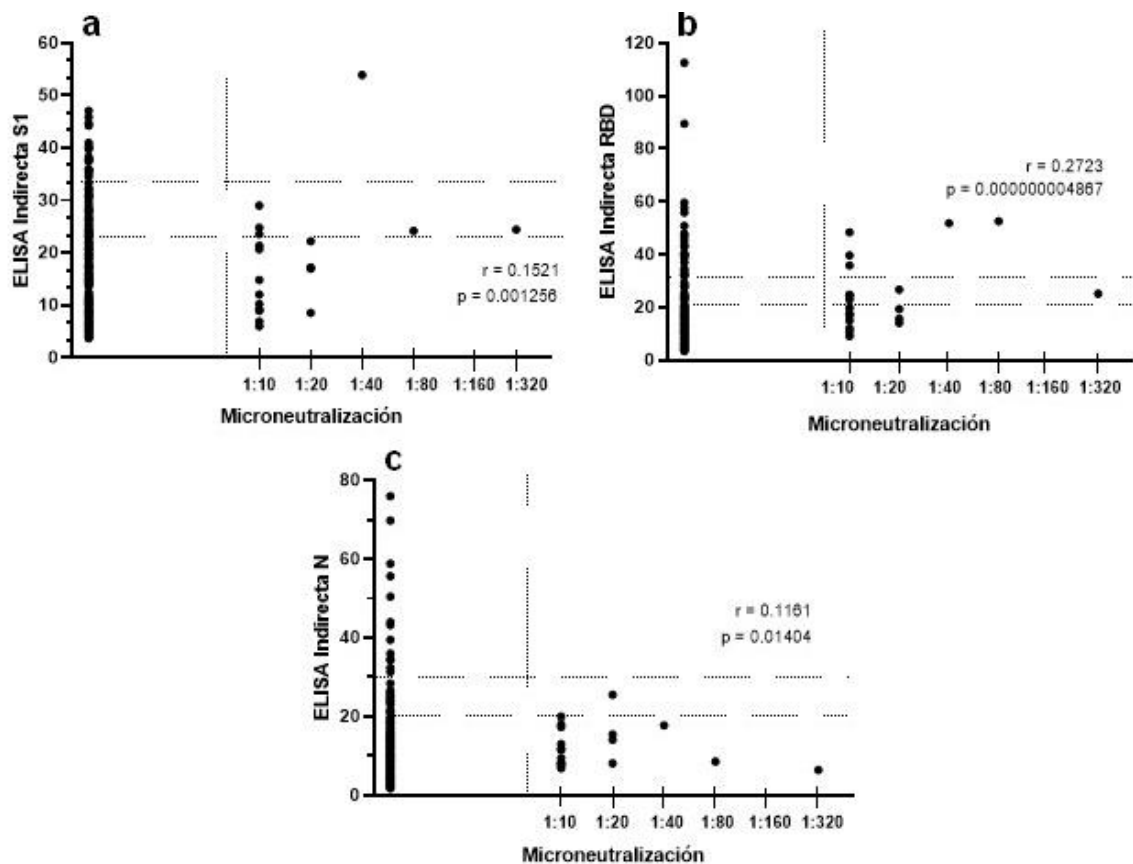


Figura 9. Correlación entre la prueba de ELISA indirecta para distintos antígenos y la prueba de microneutralización en muestras serológicas de perros. De abajo hacia arriba, la primera línea punteada indica el inicio de la zona de muestras sospechosas, y la segunda línea indica el punto de corte para resultados positivos. a) Correlación entre la prueba de ELISA indirecta utilizando a la proteína S1 como antígeno y la prueba de microneutralización en escala de logaritmo base 2. b) Correlación entre la prueba de ELISA indirecta utilizando a la proteína RBD como antígeno y la prueba de microneutralización en escala de logaritmo base 2. c) Correlación entre la prueba de ELISA indirecta utilizando a la proteína N como antígeno y la prueba de microneutralización en escala de logaritmo base 2.

Al evaluar la presencia de anticuerpos en muestras de gatos la prueba de ELISA indirecta contra el antígeno RBD tuvo la mejor AUC de 84.6%. Esto indica que la prueba tiene una buena capacidad para discriminar entre las muestras negativas y positivas. Aunado a esto, esta prueba tuvo la mejor sensibilidad de 75%, así como la mejor especificidad de 100% en gatos, en comparación al resto de pruebas. La especificidad de las pruebas fue mejor que la sensibilidad, lo cual indica que la prueba tiene una gran capacidad para establecer a las muestras negativas como tales. En el caso de la sensibilidad, para determinar a las muestras verdaderas positivas como tales, la prueba en gatos

tuvo una buena capacidad, pero únicamente del 75%. Además, esta prueba también tuvo la mejor correlación ( $r= 0.4552$ ) con microneutralización, lo cual indica que al aumentar el título de anticuerpos neutralizantes también se aumenta el valor de anticuerpos detectados por ELISA. Esto es un indicador de que los anticuerpos detectados por la prueba de ELISA contra RBD son aquellos detectados por la prueba de microneutralización, lo cual indica que es una buena prueba para detectar anticuerpos neutralizantes en muestras de gatos.

Por otra parte, en los resultados de perros la prueba de ELISA indirecta contra el antígeno RBD tuvo el AUC más alto de 88%, con una muy buena capacidad para discriminar entre muestras negativas y positivas. La sensibilidad en la prueba de ELISA indirecta contra RBD fue la más alta (33.33%) en comparación a N (0%) y a S1 (6.67%). La especificidad fue mejor en la prueba de ELISA indirecta contra N con 96.9%, mientras que al utilizar el antígeno S1 la especificidad fue de 95.05% y al utilizar RBD fue de 93.56%. Sin embargo, la prueba de ELISA indirecta contra RBD tiene los mejores resultados, ya que las pruebas con S1 y N tienen una sensibilidad muy baja o nula, mientras que la especificidad de la prueba con RBD, aunque es ligeramente más baja, sigue siendo buena. Además, esta prueba tuvo el coeficiente de correlación más alto con la prueba de microneutralización ( $r= 0.2723$ ), lo que indica que es la prueba de ELISA indirecta con mejor relación para la detección de anticuerpos neutralizantes en muestras de perros.

## 6.2. ELISA Doble Antígeno

Debido a que las sensibilidades en las pruebas de ELISA indirecta fueron bajas, especialmente en el caso de los perros, se desarrolló una nueva prueba de ELISA de doble antígeno. Diversos artículos han reportado la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2 a través de una prueba de ELISA de doble antígeno comercial contra el antígeno N en muestras de perros y gatos. Se han reportado porcentajes de positividad de 1.7% en gatos, y de los 5 gatos que fueron positivos tres fueron positivos por PRNT, lo cual muestra una buena relación con esta prueba, aunque en perros solo una muestra fue positiva a ELISA y negativa a PRNT (Cardillo *et al.*, 2022). Con base a esto, se determinaron las condiciones para la estandarización de una prueba de ELISA doble antígeno con la proteína N, y debido a que los mejores resultados en la prueba de ELISA indirecta ocurrieron

con el antígeno RBD, también se incluyó a este antígeno en esta prueba.

Además, fue producida una tercera prueba donde se incluían ambos antígenos (RBD y N) para captura y reconocimiento de anticuerpos. Esta prueba presenta las ventajas de la detección de anticuerpos contra N y anticuerpos contra RBD de SARS-CoV-2 en una misma prueba. Al ser en un formato de doble antígeno permite detectar distintos isotipos de anticuerpos, sin limitarse únicamente a los anticuerpos IgG. Esto podría mejorar la sensibilidad en comparación al resto de pruebas al incluir ambos antígenos, como se ha observado en pruebas serológicas ELISA de tercera generación para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Barik *et al.*, 2018). Hasta el momento únicamente se ha reportado una prueba de ELISA indirecta donde se utilizan al antígeno S1 y al antígeno N en una misma prueba (Stevanovic *et al.*, 2021b); sin embargo, no existen reportes de pruebas de ELISA doble antígeno donde se utilicen dos antígenos distintos (RBD y N) de SARS-CoV-2.

Para estandarizar la técnica se probaron distintas concentraciones del antígeno N, tanto fijado (de captura) como soluble (de detección), en controles positivos y negativos de muestras de humanos, que habían sido evaluadas previamente mediante ELISA indirecta con la proteína N. Inicialmente se evaluaron concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5  $\mu\text{g/mL}$  de proteína N fijada en los pocillos. Además, se evaluaron concentraciones de 50, 100, 150 y 200  $\text{ng/mL}$  de proteína N peroxidada. Al probar estas condiciones, la mejor combinación fue utilizando 2  $\mu\text{g/mL}$ , 3  $\mu\text{g/mL}$  y 5  $\mu\text{g/mL}$  de proteína N fijada con 200  $\text{ng/mL}$  de proteína N peroxidada, ya que las muestras positivas daban la absorbancia más elevada y las muestras negativas se mantenían con valores bajos (Figura 10). Aun cuando los resultados muestran que se pueden diferenciar las muestras positivas de las negativas, los valores de absorbancia aún eran bajos, por ello, para optimizar la técnica se probaron concentraciones más altas de la proteína peroxidada a partir de 200  $\text{ng/mL}$  (Figura 11). Se determinó que las mejores combinaciones fueron aquellas con 3  $\mu\text{g/mL}$  y 5  $\mu\text{g/mL}$  de proteína N fijada con 1600  $\text{ng/mL}$  de proteína N peroxidada.

Con la intención de optimizar los resultados positivos obtenidos previamente, se probaron concentraciones mayores de proteína peroxidada, que se había mantenido a una concentración más baja en comparación a la proteína de captura, la cual se mantuvo en las concentraciones de 3  $\mu\text{g/mL}$  y 5  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 12). Se estableció como la concentración adecuada a 3  $\mu\text{g/mL}$  tanto de proteína de captura como de proteína de reconocimiento peroxidada, ya que se observó una discriminación ligeramente mejor entre las muestras positivas débiles y negativas fuertes en comparación al resto.

En el caso del antígeno RBD, se probó una concentración de 2  $\mu\text{g/mL}$  y se mantuvo tanto para el antígeno fijado como para el antígeno de reconocimiento, pues se observaron buenos resultados al probar muestras de humanos. Fueron 12 muestras con resultados positivos y 12 muestras con resultados negativos por ELISA indirecta contra RBD (Figura 13). Ninguna muestra negativa fue detectada como positiva, mientras que todas las positivas fueron detectadas como tal, a excepción de tres muestras con valores similares a los negativos. Sin embargo, estas muestras eran positivas débiles en la prueba de ELISA indirecta.

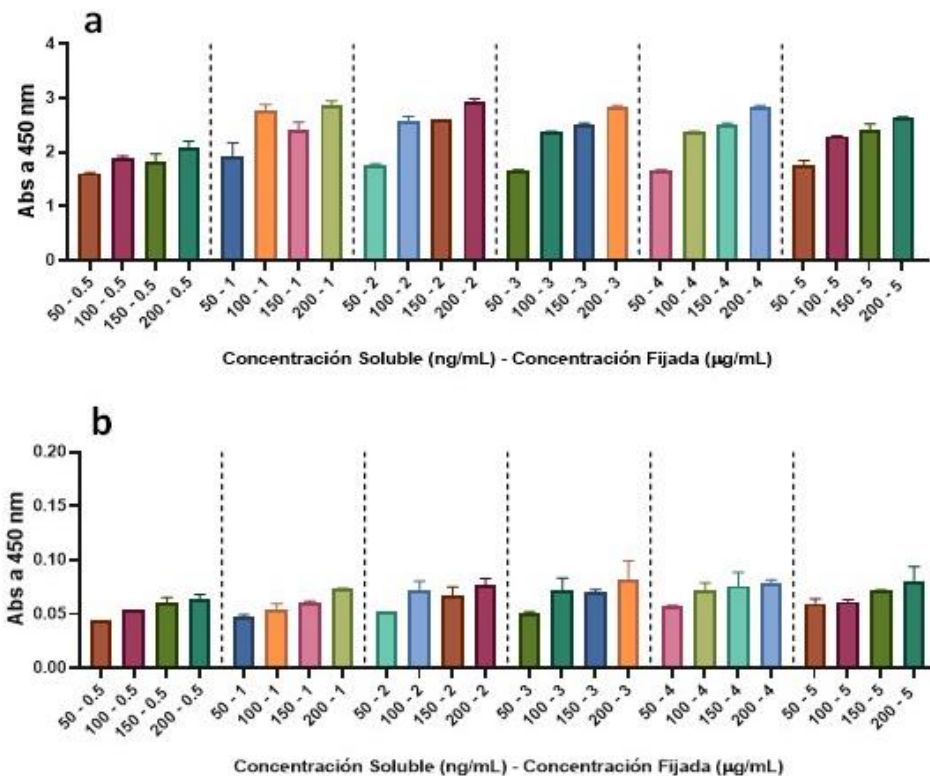


Figura 10. Estandarización de concentraciones de proteína para el antígeno N soluble de reconocimiento y el antígeno N fijado de captura en la prueba de ELISA doble antígeno. a) Resultados de controles positivos de humanos. b) Resultados de controles negativos de humanos.

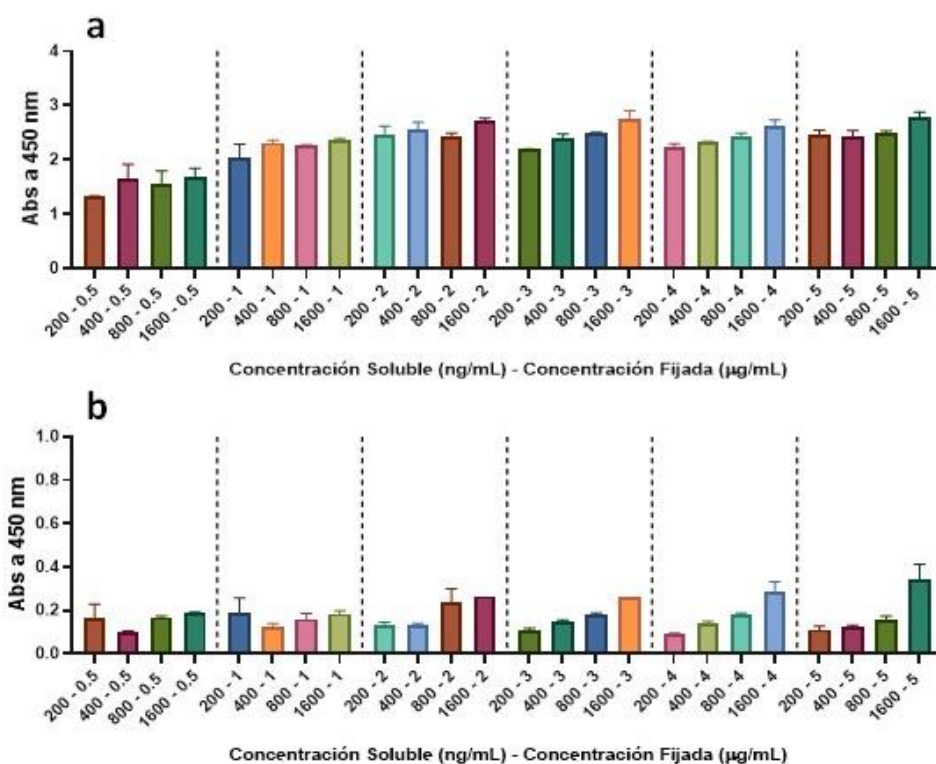


Figura 11. Optimización de concentraciones probadas para el antígeno N soluble de reconocimiento y el antígeno N fijado de captura en la prueba de ELISA doble antígeno. a) Resultados de controles positivos de humanos. b) Resultados de controles negativos de humanos.

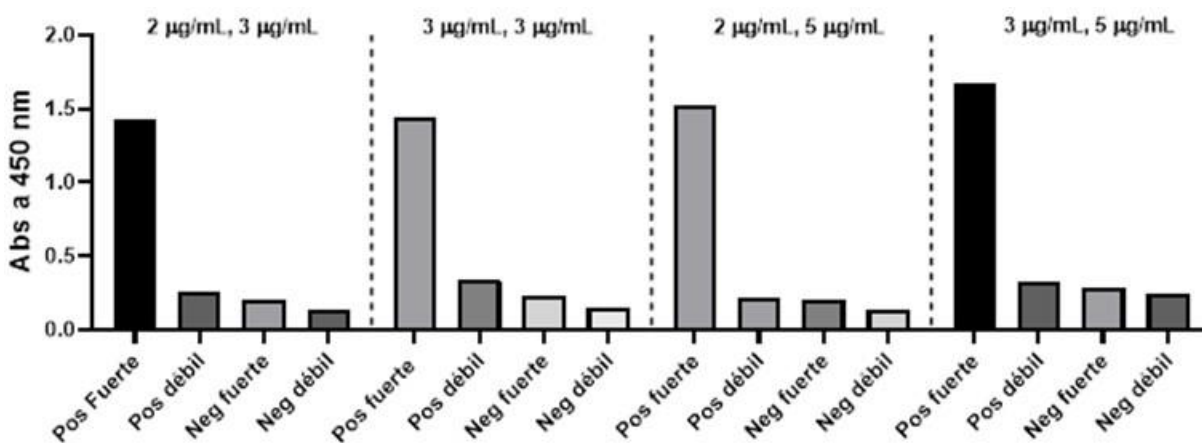


Figura 12. Variación en las concentraciones del antígeno N de reconocimiento con concentraciones de 3 µg/mL y 5 µg/mL del antígeno N de captura en la prueba de ELISA doble antígeno con muestras serológicas de humanos positivas y negativas.





Cuadro 6. Valores de corte y fórmulas para las pruebas de ELISA Doble Antígeno en perros, gatos y humanos.

| <b>Especie</b> | <b>Proteína</b> | <b>Fórmula</b>                                 | <b>Valor de Corte</b> |           |
|----------------|-----------------|------------------------------------------------|-----------------------|-----------|
| <b>Humano</b>  | N               | $UA = (Abs \text{ muestra} \times 10) / 0.135$ | Negativos             | < 13      |
|                |                 |                                                | Sospechosos           | 13 – 22.9 |
|                |                 |                                                | Positivos             | $\geq 23$ |
| <b>Humano</b>  | RBD             | $UA = (Abs \text{ muestra} \times 10) / 0.126$ | Negativos             | < 14      |
|                |                 |                                                | Sospechosos           | 13 – 23.9 |
|                |                 |                                                | Positivos             | $\geq 24$ |
| <b>Humano</b>  | RBD y N         | $UA = (Abs \text{ muestra} \times 10) / 0.116$ | Negativos             | < 23      |
|                |                 |                                                | Sospechosos           | 13 – 22.9 |
|                |                 |                                                | Positivos             | $\geq 23$ |
| <b>Gatos</b>   | N               | $UA = (Abs \text{ muestra} \times 10) / 0.168$ | Negativos             | < 14      |
|                |                 |                                                | Sospechosos           | 14 – 23.9 |
|                |                 |                                                | Positivos             | $\geq 24$ |
| <b>Gatos</b>   | RBD             | $UA = (Abs \text{ muestra} \times 10) / 0.169$ | Negativos             | < 16      |
|                |                 |                                                | Sospechosos           | 16 – 25.9 |
|                |                 |                                                | Positivos             | $\geq 26$ |
| <b>Gatos</b>   | RBD y N         | $UA = (Abs \text{ muestra} \times 10) / 0.133$ | Negativos             | < 14      |
|                |                 |                                                | Sospechosos           | 14 – 23.9 |
|                |                 |                                                | Positivos             | $\geq 24$ |
| <b>Perros</b>  | N               | $UA = (Abs \text{ muestra} \times 10) / 0.236$ | Negativos             | < 16      |
|                |                 |                                                | Sospechosos           | 16 – 25.9 |
|                |                 |                                                | Positivos             | $\geq 26$ |
| <b>Perros</b>  | RBD             | $UA = (Abs \text{ muestra} \times 10) / 0.193$ | Negativos             | < 14      |
|                |                 |                                                | Sospechosos           | 14 – 23.9 |
|                |                 |                                                | Positivos             | $\geq 24$ |
| <b>Perros</b>  | RBD y N         | $UA = (Abs \text{ muestra} \times 10) / 0.349$ | Negativos             | < 13      |
|                |                 |                                                | Sospechosos           | 13 – 22.9 |
|                |                 |                                                | Positivos             | $\geq 23$ |

Al evaluar muestras de humanos mediante la prueba ELISA doble antígeno con RBD y N desarrollada en este estudio; todas las muestras negativas fueron detectadas como negativas y todas las muestras positivas fueron detectadas como tal, con excepción de tres muestras, dos de las cuales también fueron negativas al utilizar solo al antígeno RBD. Cabe mencionar que todas las muestras con resultados negativos para las pruebas de RBD y RBD con N se recolectaron de personas días previos de recibir su próxima dosis de vacunación. Esto indica que probablemente sus anticuerpos se encontraban en niveles más bajos, como ya ha sido reportado (Grigoryan y Pulendran, 2020) Al utilizar únicamente al antígeno N en la prueba ELISA doble antígeno, todas las muestras pertenecientes al grupo de no infectados y no vacunados resultaron negativas. Así también, todas las muestras fueron negativas en el grupo de vacunados no infectados, debido a que los anticuerpos presentes en estos pacientes fueron producidos por vacunas que utilizan solo a la proteína S o sus fragmentos para inmunizar (Poland *et al.*, 2020). En el grupo de vacunados e infectados hubo dos

muestras positivas, cinco sospechosas y una negativa. Por otra parte, en el grupo de infectados no vacunados hubo una muestra positiva, cinco muestras sospechosas y dos muestras negativas.

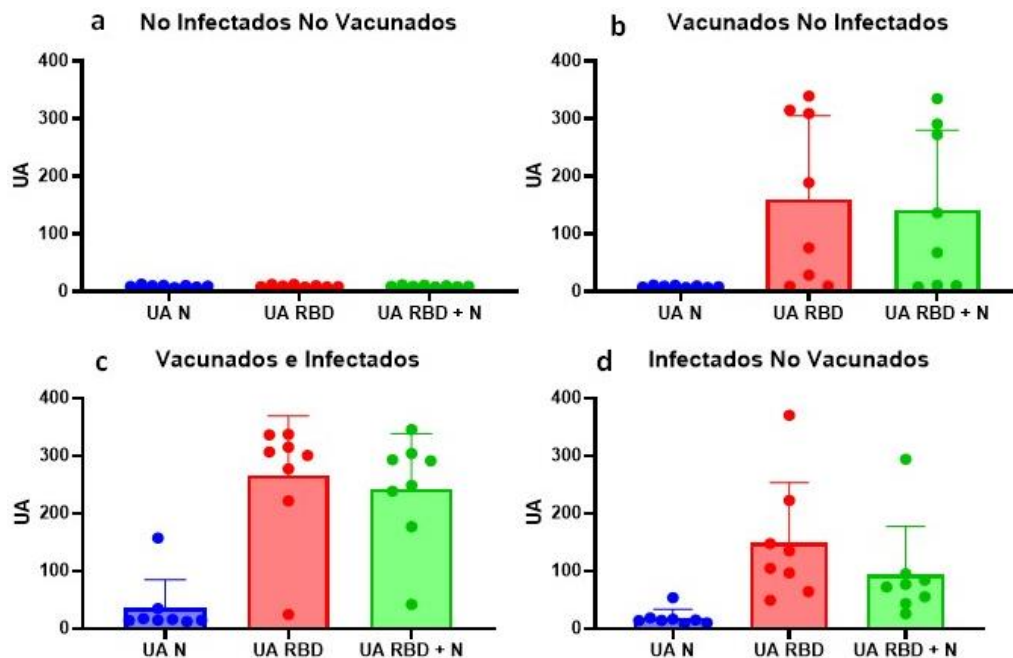


Figura 14. Comparación de pruebas de ELISA de antígeno simple (N o RBD) y doble antígeno (N + RBD) en sueros de humano. a) Sujetos no vacunados, no infectados. b) Personas vacunadas no infectadas. c) Personas vacunadas e infectadas. d) Personas infectadas no vacunadas

Se repitió la prueba ELISA doble antígeno con la proteína N pues la mayoría de las muestras positivas resultaron sospechosas. Se utilizaron muestras que habían sido previamente positivas al antígeno N mediante otra técnica de ELISA indirecta. Se utilizaron las mismas condiciones y se seleccionaron tres grupos: muestras negativas prepandemia (n=8), muestras positivas débiles con valores de UA muy cercanos al punto de corte de ELISA indirecta (n=8) y muestras positivas fuertes, mayor a 200 UA sobre el punto de corte (n=8). Los resultados se ilustran en la figura 15. Todas las muestras negativas se detectaron como tal, y las muestras positivas fuertes también se detectaron como positivas, a excepción de dos que resultaron sospechosas. De las muestras positivas débiles hubo dos que resultaron positivas, una sospechosa y cinco negativas. Esto podría indicar una baja sensibilidad de la prueba para detectar anticuerpos contra N en valores muy bajos, sin embargo, con base a que la referencia de positividad de estas muestras es una prueba de ELISA indirecta, también podría indicar falsos positivos en dicha prueba.

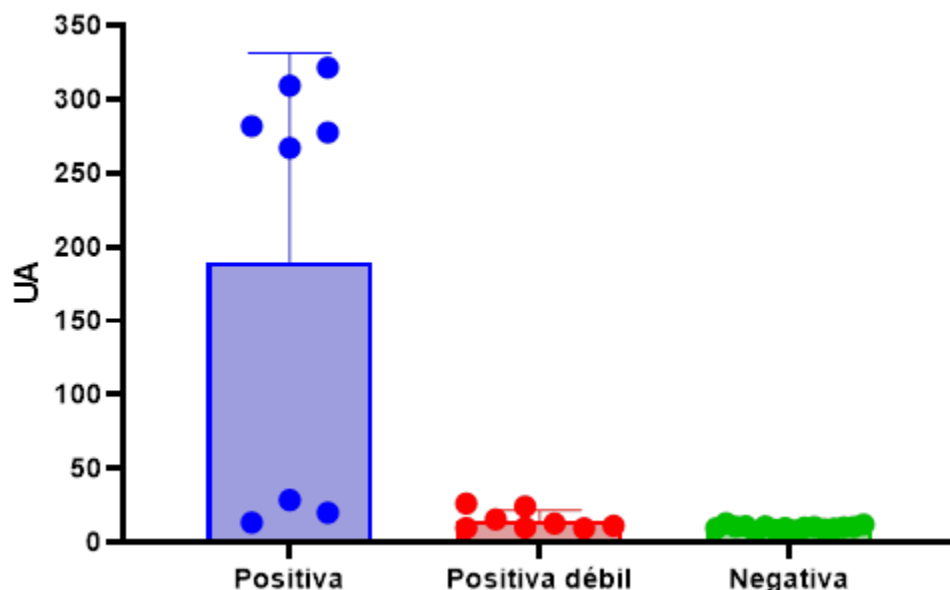


Figura 15. Detección de anticuerpos contra el antígeno N de SARS-CoV-2 con una prueba ELISA doble antígeno en sueros de humanos.

Una vez que se determinó que las pruebas eran adecuadas para la detección de anticuerpos en humanos se probaron las muestras de gatos ( $n=31$ ) con los antígenos RBD, N y la combinación (RBD y N). En perros se probaron la mayor parte de las muestras ( $n=441$ ) en la prueba de RBD y N combinada, mientras que en la prueba de RBD se probaron 118 muestras y en la de N 142 muestras. En el cuadro 6 se resumen las fórmulas utilizadas para obtener las unidades arbitrarias, así como los puntos de corte obtenidos para cada técnica y especie. Estos puntos de corte fueron obtenidos con base al promedio de los resultados en las muestras negativas a microneutralización, sumando una o dos desviaciones estándar.

Al evaluar las muestras de gatos con la prueba combinada de RBD y N se obtuvieron cuatro muestras positivas que también fueron positivas a microneutralización. Así también, hubo cuatro muestras sospechosas, mientras que el resto fueron negativas. Solamente una de las muestras positivas a microneutralización con un título de 1:10 fue reconocida como negativa (Figura 16a). Esta prueba tuvo el coeficiente de correlación más elevado en el caso de los gatos ( $r= 0.5013$ ,  $p<0.05$ ). Por otra parte, la prueba con RBD también tuvo un coeficiente de correlación alto con microneutralización ( $r= 0.4815$ ,  $p<0.05$ ), donde las muestras con los títulos más altos de 1:20 y 1:40 fueron reconocidas como positivas, así como una muestra con título 1:10. Otra muestra con título 1:10 fue sospechosa y una tercera con este mismo título fue negativa (Figura 16b). Así

también, cuatro muestras negativas a microneutralización resultaron sospechosas. Con el antígeno N, solamente una muestra fue positiva, y con un título de 1:10 para microneutralización (Figura 16c). Otra muestra con título 1:10 y una con título 1:20 resultaron sospechosas, mientras que el resto de positivas a microneutralización fueron negativas a ELISA. Además, hubo dos muestras positivas y tres sospechosas entre las negativas a microneutralización. El coeficiente de correlación fue más bajo en comparación al resto de pruebas ( $r= 0.2148$ ,  $p>0.05$ ).

En las muestras de perros evaluadas mediante el uso combinado de antígenos se detectaron como positivas las muestras con títulos más altos en la prueba de microneutralización (1:80 y 1:320), así como una muestra con un título 1:20. Seis muestras con títulos 1:10 y tres muestras con títulos de 1:20 fueron detectadas como sospechosas. Así también, siete muestras con título 1:10 y una muestra con título 1:40 fueron detectadas como negativas. Por otra parte, hubo 13 muestras positivas a ELISA, pero negativas a microneutralización, así como 82 muestras sospechosas a ELISA y negativas a microneutralización. Un total de 326 muestras fueron negativas en ambos casos. El coeficiente de correlación de los resultados de esta prueba con los resultados de microneutralización fue el más elevado en comparación al resto y fue significativo ( $r= 0.1967$ ,  $p<0.05$ ), sin embargo, es un coeficiente bajo (Figura 17a).

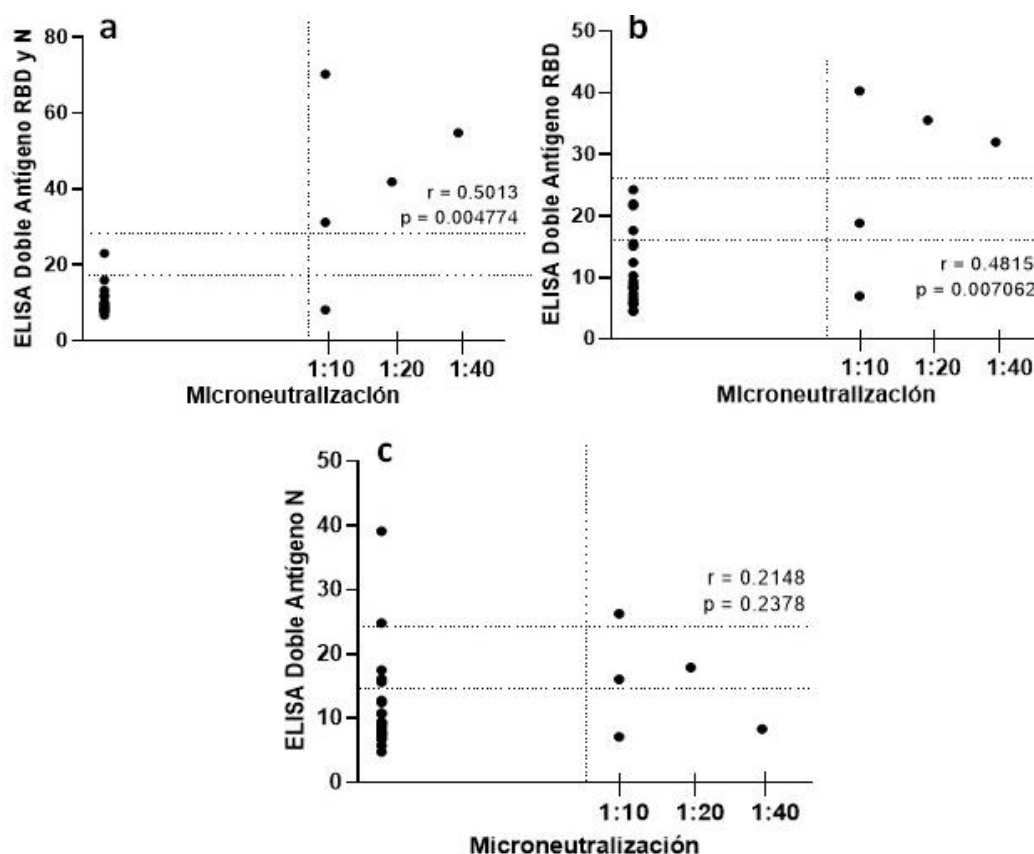


Figura 16. Correlación entre la prueba de ELISA doble antígeno para antígenos de SARS-CoV-2 y la prueba de microneutralización en muestras serológicas de gatos. De abajo hacia arriba la primera línea punteada indica el inicio de la zona de muestras sospechosas, y la segunda línea indica el punto de corte para positivas. a) Correlación de la prueba doble antígeno (RBD+N) y los títulos de microneutralización en escala logaritmo base 2. b) Correlación de la prueba con antígeno RBD y los títulos de microneutralización en escala logaritmo base 2 c) Correlación de la prueba con antígeno N y los títulos de microneutralización en escala logaritmo base 2.

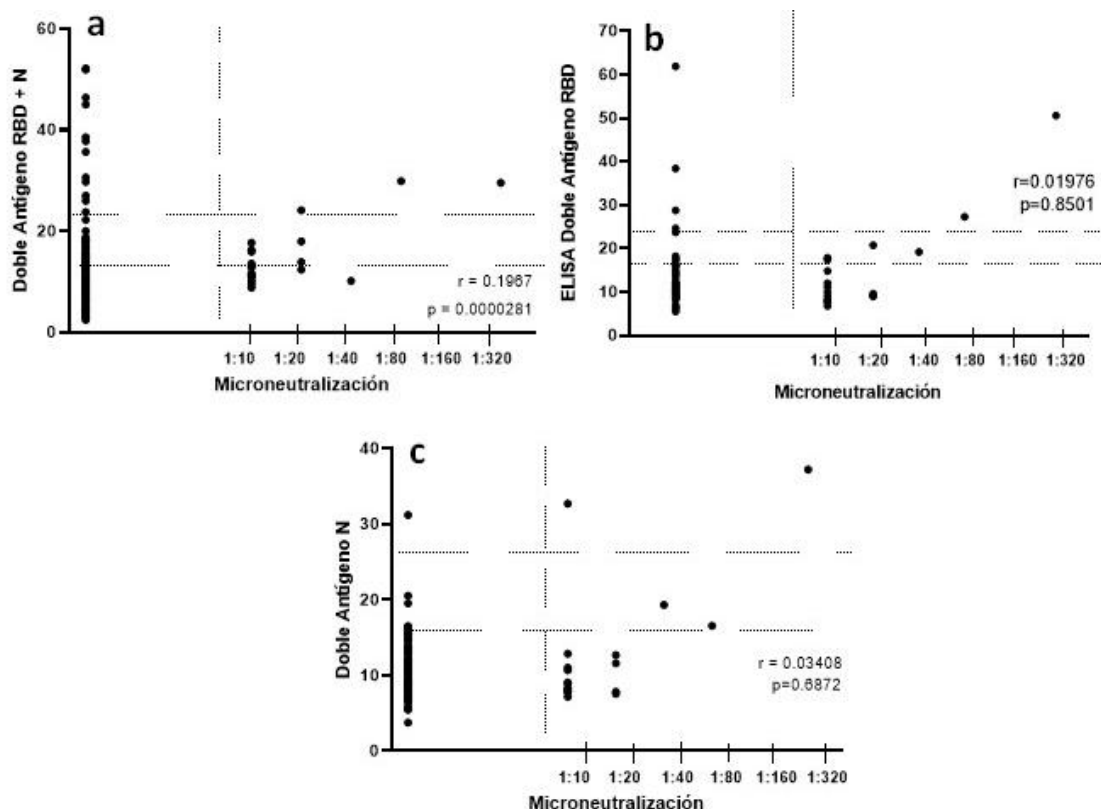


Figura 17. Correlación entre la prueba de ELISA doble antígeno para antígenos de SARS-CoV-2 y la prueba de microneutralización en muestras serológicas de perros. De abajo hacia arriba la primera línea punteada indica el inicio de la zona de muestras sospechosas, y la segunda línea indica el punto de corte para positivas. a) Correlación de la prueba con ambos antígenos (RBD+N) y los títulos de microneutralización en escala logaritmo base 2. b) Correlación de la prueba con antígeno RBD y los títulos de microneutralización en escala logaritmo base 2. c) Correlación de la prueba con antígeno N y los títulos de microneutralización en escala logaritmo base 2.

Al evaluar las muestras de perros solamente con el antígeno RBD el coeficiente de correlación con los resultados de microneutralización fue bajo y no significativo ( $r = 0.0197$ ,  $p > 0.05$ ). A pesar de esto, en la prueba se detectaron como positivas aquellas muestras con los títulos más elevados (1:320 y 1:80), y como sospechosas una muestra con título de 1:40, dos con título de 1:20 y tres con título de 1:10. Sin embargo, hubo dos muestras con título de 1:20 que resultaron negativas, así como nueve negativas con título de 1:10 (Figura 17b). Al utilizar el antígeno N en la prueba se obtuvo un coeficiente de correlación bajo y no significativo con los resultados de microneutralización ( $r = 0.0340$ ,  $p > 0.05$ ) (Figura 17c). A pesar de esto, se detectó como positiva a la muestra con el título más elevado de 1:320 y a una muestra con un título de 1:10. Las muestras con títulos 1:80 y 1:40 resultaron sospechosas y el resto de las muestras con títulos entre 1:20 y

1:10 fueron negativas (n=15). Por otra parte, hubo una muestra positiva a N y negativa a microneutralización, así como once muestras sospechosas a N y negativas a microneutralización. El resto coincidieron en ser negativas.

Se obtuvieron las curvas ROC y el AUC para cada prueba de ELISA doble antígeno para las muestras de gatos (Figura 18). El mejor valor de AUC fue en la prueba de ELISA doble antígeno donde se utilizaron ambos antígenos con un valor de 88%. Además, en esta prueba se tuvo el mejor resultado con respecto a sensibilidad (80%) y especificidad (100%) en comparación al resto. La prueba donde se utiliza solamente al antígeno RBD tuvo un AUC de 86.4%, además su sensibilidad fue de 75% y su especificidad fue del 100%. Por otra parte, la prueba de ELISA doble antígeno con la proteína N tuvo un AUC de 67.4%, con una sensibilidad de 33.33% y una especificidad de 91.67%. En la figura 19 se muestran las curvas ROC para las pruebas de ELISA doble antígeno en perros. La prueba con un mejor valor de AUC (77%) fue la de doble antígeno donde se utilizaron ambos antígenos. Además, en esta prueba se encontró una sensibilidad de 27.27% y una especificidad de 96.17%. Por otra parte, en la prueba de ELISA doble antígeno con la proteína RBD se tuvo un AUC de 59.1%, así como una sensibilidad de 15.38% y una especificidad de 96.17%. Así también, en la prueba de ELISA doble antígeno con la proteína N se tuvo un AUC de 48.3%, con valores de sensibilidad de 11.76% y especificidad de 99.11%.

Se realizaron correlaciones de algunas muestras de humanos evaluadas por las pruebas de ELISA doble antígeno, y que también fueron evaluadas por la prueba de microneutralización (n=12) (Figura 20). Las correlaciones entre ELISA de doble antígeno con RBD y N por separado fueron más bajas ( $r= 0.2979$  y  $r= 0.1478$ ) en comparación a la prueba con ambos antígenos ( $r= 0.4682$ ). Además, se calculó la sensibilidad y especificidad para cada prueba, y se obtuvo una sensibilidad de 83.33% en la prueba de doble antígeno con ambos antígenos, así como una especificidad de 66.67%. Por otra parte, para la prueba con el antígeno RBD se obtuvo una sensibilidad de 83.33% y una especificidad de 33.33%. Así también, para la prueba con el antígeno N se obtuvo una sensibilidad de 12.5% y una especificidad de 100%. En este caso, la prueba de doble antígeno con ambas proteínas parece una mejor opción al evaluar muestras de humanos, con valores más elevados de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, es necesario confirmar estos resultados y compararlos evaluando una mayor cantidad de muestras.



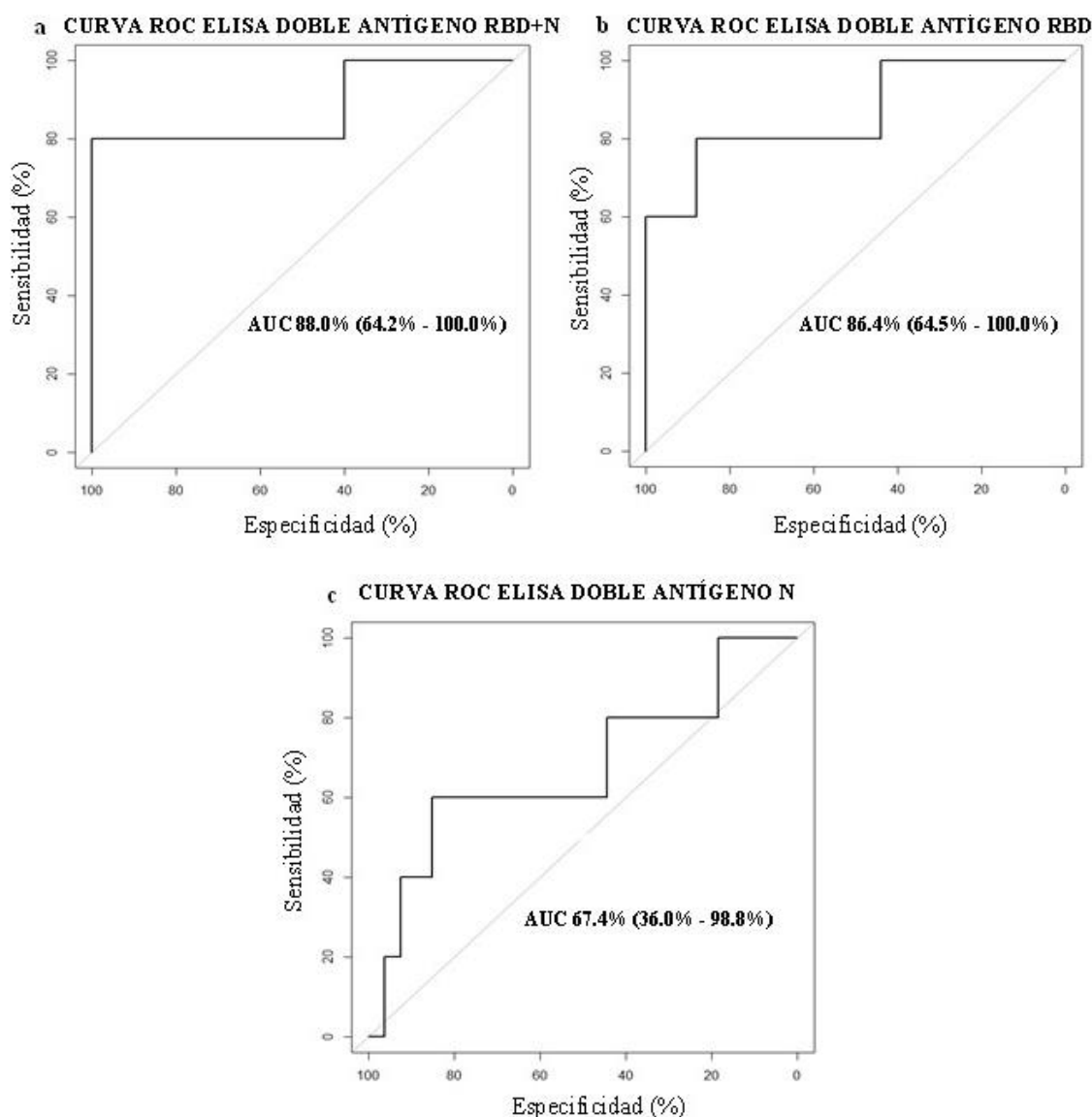


Figura 18. Curvas ROC de las pruebas de ELISA doble antígeno para distintas proteínas con base a la prueba de microneutralización en muestras serológicas de gatos. El eje de las “y” muestra el porcentaje de sensibilidad y el eje de las “x” muestra 100 – % especificidad, graficado de manera inversa para facilitar la interpretación. a) Curva ROC de la prueba de ELISA doble antígeno utilizando ambas proteínas (RBD y N) b) Curva ROC de la prueba de ELISA doble antígeno utilizando a la proteína RBD como antígeno c) Curva ROC de la prueba de ELISA doble antígeno utilizando a la proteína N como antígeno.

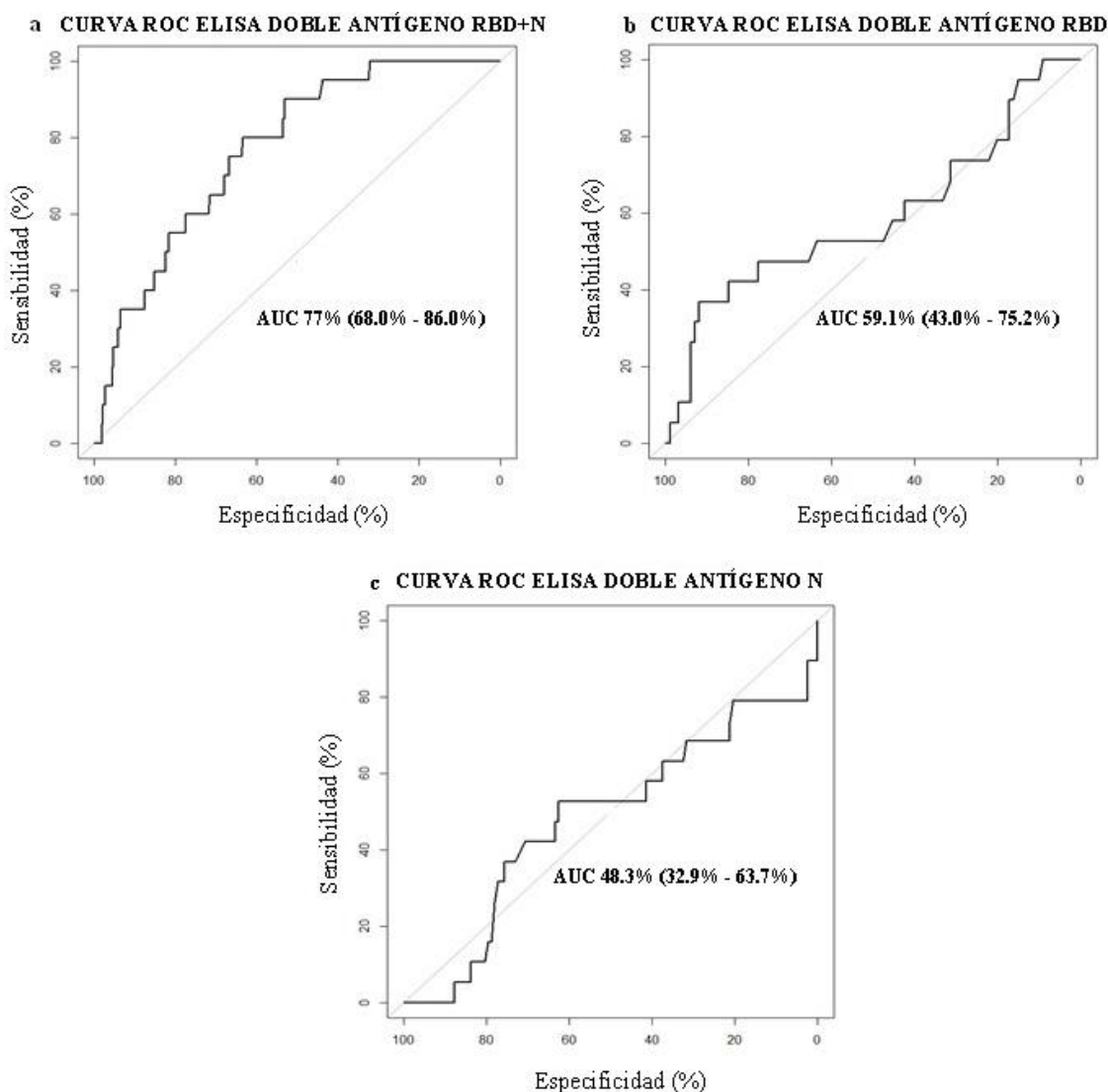


Figura 19. Curvas ROC de las pruebas de ELISA doble antígeno para distintas proteínas con base a la prueba de microneutralización en muestras serológicas de perros. El eje de las “y” muestra el porcentaje de sensibilidad y el eje de las “x” muestra 100 – % especificidad, graficado de manera inversa para facilitar la interpretación. a) Curva ROC de la prueba de ELISA doble antígeno utilizando ambas proteínas (RBD y N) b) Curva ROC de la prueba de ELISA doble antígeno utilizando a la proteína RBD como antígeno c) Curva ROC de la prueba de ELISA doble antígeno utilizando a la proteína N como antígeno.

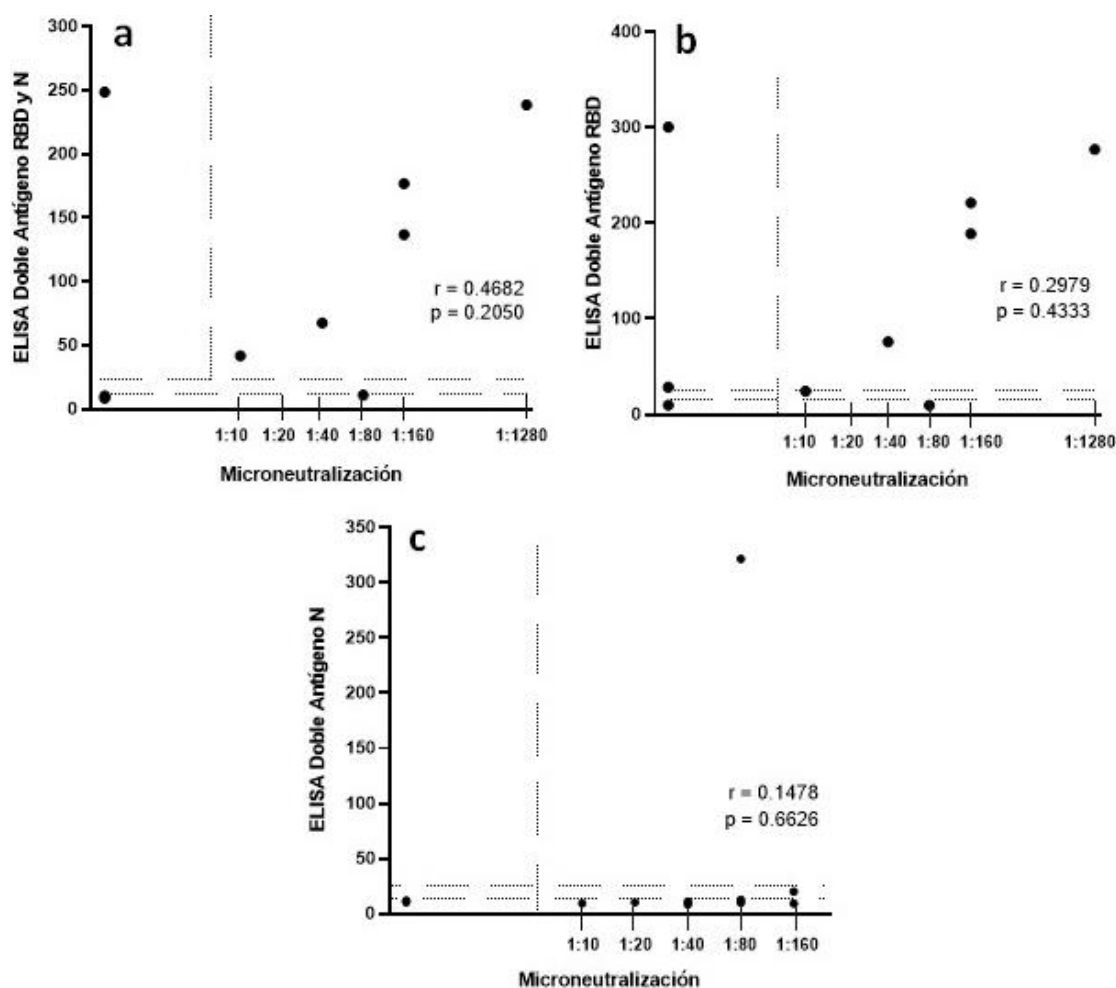


Figura 20. Correlación entre la prueba de ELISA doble antígeno para antígenos de SARS-CoV-2 y la prueba de microneutralización en muestras serológicas de humanos. De abajo hacia arriba la primera línea punteada indica el inicio de la zona de muestras sospechosas, y la segunda línea indica el punto de corte para positivas. a) Correlación de la prueba de doble antígeno (RBD+N) y los títulos de microneutralización en escala logaritmo base 2. b) Correlación de la prueba con antígeno RBD y los títulos de microneutralización en escala logaritmo base 2. c) Correlación de la prueba con antígeno N y los títulos de microneutralización en escala logaritmo base 2.

Entre las distintas pruebas de doble antígeno desarrolladas para gatos, la prueba de ELISA doble antígeno contra ambos antígenos tuvo la mejor AUC de 88%, lo que indica una buena capacidad para discriminar entre las muestras negativas y positivas. Además, esta prueba tuvo la mejor sensibilidad de 80%, así como la mejor especificidad de 100% en gatos, en comparación al resto de pruebas. La especificidad de todas las pruebas fue mejor que la sensibilidad, demostrando una gran capacidad para establecer a las muestras negativas como tales. En el caso de la sensibilidad, para determinar a las muestras verdaderas positivas como tales, la prueba en gatos tuvo una buena

capacidad del 80%. Así también, esta prueba también tuvo la mejor correlación ( $r= 0.5013$ ) con la prueba de microneutralización, lo cual indica que los anticuerpos detectados por la prueba de ELISA doble antígeno contra ambos antígenos son aquellos detectados por la prueba de microneutralización. Con base en esto, la prueba de ELISA doble antígeno contra ambos antígenos en gatos es una buena prueba para detectar anticuerpos neutralizantes, y tiene una buena capacidad para clasificar a las muestras positivas y negativas como tales.

Por otra parte, en los resultados de perros la prueba de ELISA doble antígeno contra ambos antígenos tuvo el AUC más alto de 77%, demostrando una buena capacidad para discriminar entre muestras negativas y positivas en comparación a las pruebas de este formato donde solo se utiliza un antígeno. La sensibilidad en la prueba de ELISA doble antígeno contra ambos antígenos fue la más alta (27.27%) en comparación a N (11.76%) y a RBD (15.38%). La especificidad fue mejor en la prueba de ELISA doble antígeno contra N con 99.11%, mientras que al utilizar el antígeno RBD la especificidad fue de 93.18% y al utilizar ambos fue de 96.17%. A pesar de que la sensibilidad permaneció en valores bajos en las tres pruebas, la prueba de ELISA doble antígeno contra ambos antígenos tuvo el mejor resultado. Además, esta prueba tuvo el coeficiente de correlación más alto con la prueba de microneutralización ( $r= 0.1967$ ), ya que en el resto de las pruebas no hubo correlación con microneutralización. Por ello, la prueba de ELISA doble antígeno contra ambas proteínas tiene la mejor correlación para la detección de anticuerpos neutralizantes en muestras de perros.

### 6.3. Prueba de Neutralización Simulada

Se estableció una técnica de neutralización simulada y se evaluó en muestras de perros ( $n=107$ ) y gatos ( $n=31$ ). En el caso de los gatos, los resultados de esta prueba tuvieron una correlación de  $r= 0.4409$  con los resultados de microneutralización (Figura 21a). Las muestras con títulos de 1:20 y 1:40 fueron reconocidas como positivas, así como dos muestras con título de 1:10, mientras que una de estas fue negativa. Además, una muestra entre las negativas a microneutralización resultó positiva. Por otra parte, los resultados de perros para la prueba de neutralización simulada tuvieron una correlación de  $r= 0.5308$  con los resultados de microneutralización (Figura 21b). Hubo 13

muestras positivas que coincidieron con los resultados de microneutralización, con títulos de 1:320, 1:80 y 1:40, así como tres muestras con título de 1:20 y siete muestras con título de 1:10. Además, once muestras negativas a microneutralización también resultaron positivas. El resto de las muestras coincidieron en ser negativas para ambas pruebas. Los valores de AUC para estas pruebas fueron altos, de 89.1% en perros y 82.3% en gatos. Un valor ligeramente más bajo en gatos puede ser debido a que en este grupo se evaluaron menos muestras. La sensibilidad para la prueba de neutralización simulada en perros fue de 65% y la especificidad de 87.36%. En el caso de los gatos, la sensibilidad fue de 80% y la especificidad de 96.15%.

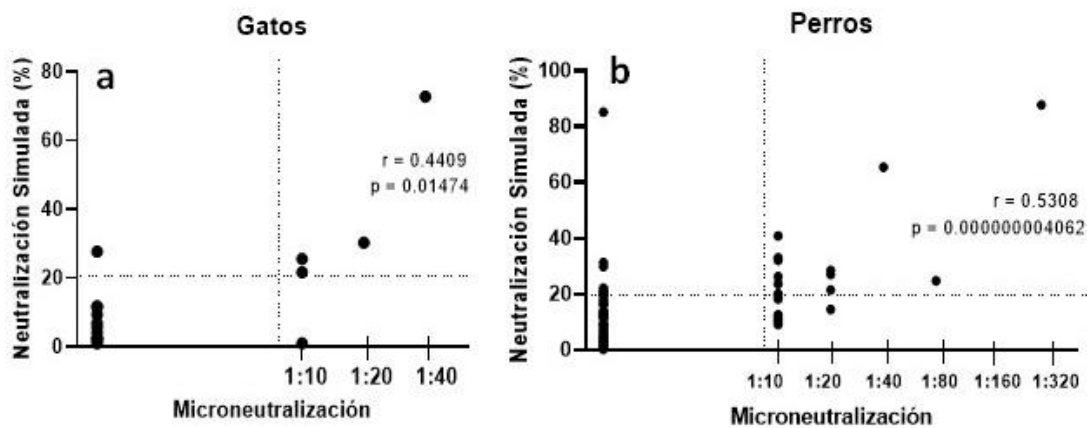


Figura 21. Correlación entre la prueba de neutralización simulada para SARS-CoV-2 y la prueba de microneutralización en muestras serológicas de gatos y perros. De abajo hacia arriba, la línea punteada indica el punto de corte para positivas. a) Correlación de la prueba de neutralización simulada y los títulos de microneutralización en escala logaritmo base 2 en muestras de gatos. b) Correlación de la prueba de neutralización simulada y los títulos de microneutralización en escala logaritmo base 2 en muestras de perros.

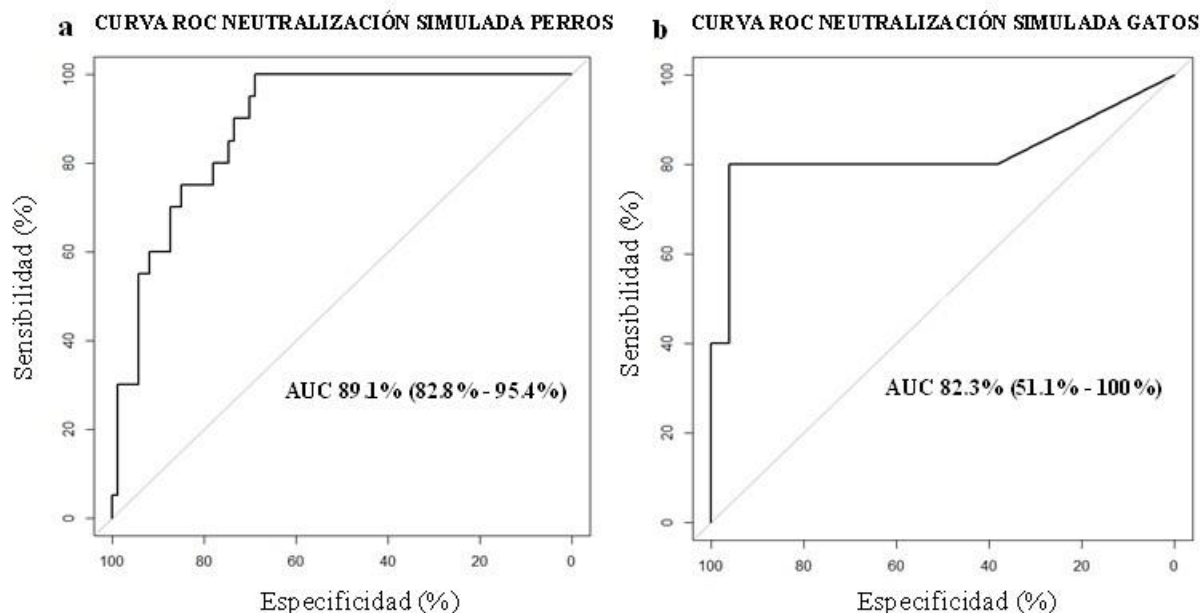


Figura 22. Curvas ROC de las pruebas de neutralización simulada con base a la prueba de microneutralización en muestras serológicas de perros y gatos. El eje de las “y” muestra el porcentaje de sensibilidad y el eje de las “x” muestra 100 – % especificidad, graficado de manera inversa para facilitar la interpretación. a) Curva ROC de la prueba de neutralización simulada para perros b) Curva ROC de la prueba de neutralización simulada para gatos.

#### 6.4. Comparación entre Pruebas y Valores de Frecuencia

La sensibilidad y especificidad para las pruebas de ELISA desarrolladas en este estudio se determinaron con base a los resultados positivos y negativos obtenidos mediante la prueba de microneutralización, ya que esta se considera el estándar de oro. De manera general, la mayoría de las pruebas de ELISA doble antígeno tuvieron una mayor sensibilidad que las pruebas de ELISA indirecta en gatos (Cuadro 7) y en perros (Cuadro 8). En la segunda columna del cuadro 7 se resumen los valores de sensibilidad y especificidad para las muestras de gatos. Como se puede observar, la prueba que resultó mejor para detectar anticuerpos contra SARS-CoV-2 en gatos fue la prueba ELISA doble antígeno con ambos antígenos, pues tuvo la especificidad y sensibilidad más alta, así como el mayor AUC. Por otra parte, en la segunda columna del cuadro 8 se puede observar que una de las pruebas con mejores resultados fue la prueba de ELISA indirecta contra RBD, con una alta sensibilidad en comparación al resto, combinada junto con una buena especificidad y un AUC alto. Sin embargo, la prueba de neutralización simulada tuvo un AUC

ligeramente mayor que la prueba de ELISA indirecta contra RBD, su sensibilidad fue el doble, y a pesar de que su especificidad fue ligeramente menor, esta prueba tuvo los mejores resultados en perros.

Cuadro 7. Sensibilidad, especificidad y área bajo la curva (AUC) de seis pruebas de ELISA y neutralización simulada en muestras de gatos para dos puntos de corte distintos en la prueba de microneutralización.

| <b>Gatos</b>                      | <b>Corte MNT 1:10</b>            |                                   |                         | <b>Corte MNT 1:20</b>            |                                   |                         |
|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
|                                   | <b>Sensibilidad<br/>(IC 95%)</b> | <b>Especificidad<br/>(IC 95%)</b> | <b>AUC<br/>(IC 95%)</b> | <b>Sensibilidad<br/>(IC 95%)</b> | <b>Especificidad<br/>(IC 95%)</b> | <b>AUC<br/>(IC 95%)</b> |
| <b>ELISA Indirecta RBD</b>        | 75%<br>(19.4%-99.4%)             | 100%<br>(85.2%-100%)              | 84.6%<br>(59.2%-100%)   | 100%<br>(15.8%-100%)             | 96%<br>(79.6%-99.9%)              | 98.3%<br>(93.5%-100%)   |
| <b>ELISA Indirecta N</b>          | 20%<br>(0.51%-71.6%)             | 100%<br>(85.2%-100%)              | 53.8%<br>(21.0%-86.7%)  | 0%<br>(0.00%-84.2%)              | 96.15%<br>(80.4%-99.9%)           | 50.0%<br>(26.3%-73.7%)  |
| <b>ELISA Indirecta S1</b>         | 60%<br>(14.6%-94.7%)             | 96%<br>(79.6%-99.9%)              | 59.0%<br>(15.3%-100%)   | 100%<br>(15.8%-100%)             | 92.86%<br>(76.5%-99.1%)           | 98.3%<br>(93.5%-100%)   |
| <b>ELISA Doble Antígeno RBD+N</b> | 80%<br>(28.4%-99.5%)             | 100%<br>(83.9%-100%)              | 88.0%<br>(64.2%-100%)   | 100%<br>(15.8%-100%)             | 91.7%<br>(73.0%-98.9%)            | 96.4%<br>(89.5%-100%)   |
| <b>ELISA Doble Antígeno RBD</b>   | 75%<br>(19.4%-99.4%)             | 100%<br>(83.9%-100%)              | 86.4%<br>(64.5%-100%)   | 100%<br>(15.8%-100%)             | 95.8%<br>(78.8%-99.9%)            | 96.4%<br>(89.5%-100%)   |
| <b>ELISA Doble Antígeno N</b>     | 33.33%<br>(0.84%-90.6%)          | 91.67%<br>(73%-98.9%)             | 67.4%<br>(36.0%-98.8%)  | 0%<br>(0%-97.5%)                 | 88.4%<br>(69.8%-97.5%)            | 66.6%<br>(31.7%-100%)   |
| <b>Neutralización Simulada</b>    | 80%<br>(28.4%-99.5%)             | 96.15%<br>(80.4%-99.9%)           | 82.3%<br>(51.1%-100%)   | 100%<br>(15.8%-100%)             | 90.62%<br>(74.9%-98.0%)           | 100%<br>(100%-100%)     |

A pesar de que la prueba de neutralización simulada tuvo una sensibilidad mucho más elevada, de manera general, las sensibilidades obtenidas en las pruebas para perros se mantuvieron bajas en comparación a las sensibilidades en las pruebas para gatos. Se han reportado valores de sensibilidad de 98.9% y especificidad de 98.8% en pruebas de neutralización simulada para la detección de anticuerpos en perros, utilizando como estándar de oro a la prueba de PRNT (Perera *et al.*, 2021). Sin embargo, en este estudio se utilizaron únicamente cuatro muestras de perros con un resultado positivo a SARS-CoV-2 por RT-PCR. Además, las muestras tenían valores elevados de PRNT, entre 1:40 y 1:160. Por otra parte, los estudios publicados hasta el momento en perros establecen un punto de corte a partir de 1:20 en las pruebas de microneutralización para clasificar a las muestras como positivas. En estos estudios se han reportado que de 16 muestras positivas a ELISA

indirecta con RBD, 10 fueron positivas a microneutralización (Zhao *et al.*, 2022). En otros estudios también se han reportado muestras positivas a microneutralización a partir de 1:20 para comparar muestras de perros y gatos (Bold *et al.*, 2022; Cardillo *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2020), o humanos (Harvala *et al.*, 2021; Rowntree *et al.*, 2021; Sapkal *et al.*, 2020). Con base en esto, se planteó recalcular la sensibilidad y especificidad de cada prueba tomando como positivas a microneutralización a las muestras a partir de un título 1:20.

Cuadro 8. Sensibilidad, especificidad y área bajo la curva (AUC) de seis pruebas de ELISA y neutralización simulada en muestras de perros para dos puntos de corte distintos en la prueba de microneutralización.

| Perros                            | Corte MNT 1:10           |                           |                        | Corte MNT 1:20           |                           |                        |
|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------|
|                                   | Sensibilidad<br>(IC 95%) | Especificidad<br>(IC 95%) | AUC<br>(IC 95%)        | Sensibilidad<br>(IC 95%) | Especificidad<br>(IC 95%) | AUC<br>(IC 95%)        |
| <b>ELISA Indirecta RBD</b>        | 33.33%<br>(11.8%-61.6%)  | 93.56%<br>(90.8%-95.7%)   | 88%<br>(83.4%-92.5%)   | 40%<br>(5.3%-85.3%)      | 93.13%<br>(90.3%-95.3%)   | 89.9%<br>(84.1%-95.8%) |
| <b>ELISA Indirecta N</b>          | 0%<br>(0%-18.5%)         | 96.9%<br>(94.7%-98.3%)    | 66.4%<br>(56.8%-76.0%) | 0%<br>(0%-45.9%)         | 96.92%<br>(94.8%-98.3%)   | 69.7%<br>(52.6%-86.8%) |
| <b>ELISA Indirecta S1</b>         | 6.67%<br>(0.17%-31.9%)   | 95.05%<br>(92.4%-97%)     | 71.2%<br>(62.6%-79.8%) | 20%<br>(0.51%-71.6%)     | 95.23%<br>(92.6%-97.1%)   | 79.6%<br>(68.8%-90.4%) |
| <b>ELISA Doble Antígeno RBD+N</b> | 27.27%<br>(6.02%-60.9%)  | 96.17%<br>(93.5%-97.9%)   | 77%<br>(68.0%-86.0%)   | 75%<br>(19.4%-99.4%)     | 91.1%<br>(93.6%-97.9%)    | 86.5%<br>(74.7%-98.3%) |
| <b>ELISA Doble Antígeno RBD</b>   | 15.38%<br>(1.9%-45.4%)   | 93.18%<br>(85.7%-97.5%)   | 59.1%<br>(43.0%-75.2%) | 50%<br>(6.8%-93.2%)      | 93.81%<br>(87.0%-97.7%)   | 79.4%<br>(59.4%-99.4%) |
| <b>ELISA Doble Antígeno N</b>     | 11.76%<br>(1.5%-36.4%)   | 99.11%<br>(95.1%-99.9%)   | 48.3%<br>(32.9%-63.7%) | 25%<br>(0.63%-80.6%)     | 98.39%<br>(94.3%-99.8%)   | 68.5%<br>(43.6%-93.4%) |
| <b>Neutralización Simulada</b>    | 65%<br>(40.8%-84.6%)     | 87.36%<br>(78.5%-93.5%)   | 89.1%<br>(82.8%-95.4%) | 85.71%<br>(42.1%-99.6%)  | 82%<br>(73.0%-88.9%)      | 90%<br>(82.3%-97.7%)   |

En el caso de los gatos, al establecer como corte de microneutralización a los títulos 1:20, las pruebas de ELISA indirecta con RBD o con S1, ELISA doble antígeno con ambos antígenos o solo con RBD y la prueba de neutralización simulada aumentaron sus valores de sensibilidad hasta el 100%, ya que en todas se detectaron como positivas las muestras con títulos 1:20 y 1:40. Aunado a esto, el AUC de estas pruebas se mantuvo entre 96% - 100%, y la especificidad con niveles sobre 90% en todos los casos, siendo las pruebas con mejores resultados aquellas con al antígeno RBD



en formato indirecto o en formato doble antígeno con uno o dos antígenos. La especificidad disminuyó en las pruebas de doble antígeno contra ambos antígenos o contra RBD debido a que su sensibilidad era la mayor al establecer el punto de corte en 1:10. En algunos estudios se han reportado valores de sensibilidad de 95.6% y especificidad de 95.5% en muestras de gatos evaluadas con ELISA indirecta y una prueba de microneutralización con corte en 1:20 (Bold *et al.*, 2022). Así también, Schulz *et al.* (2021) reportaron una sensibilidad de 90.6% y una especificidad de 99.8% de una prueba de ELISA indirecta contra RBD en muestras de gatos, evaluada mediante una prueba de PRNT con un corte en 1:20. Los porcentajes de sensibilidad y especificidad en nuestro estudio son muy similares en este estudio en comparación a los publicados, e incluso mayores. Sin embargo, es necesario corroborar estos resultados con una mayor cantidad de muestras.

En el caso de las pruebas con el antígeno N en muestras de gatos, al establecer un corte 1:20 para la prueba de microneutralización la sensibilidad disminuyó a 0%, ya que con esta prueba únicamente se detectó una muestra positiva con título 1:10, que resultó ser la misma que en ELISA indirecta y ELISA doble antígeno. Bold *et al.* (2022) reportaron una sensibilidad de 97.8% y una especificidad de 95.5% en una prueba de ELISA indirecta evaluando 45 muestras de gatos, y comparándola con resultados de microneutralización con títulos a partir de 1:20. Sin embargo, en este estudio se evaluaron muestras de gatos inoculados experimentalmente con SARS-CoV-2 y no de gatos con un estatus desconocido de la infección, como lo fue en nuestro estudio. Por otra parte, Barua *et al.* (2021) reportaron seis muestras de gatos positivas a una prueba de ELISA doble antígeno utilizando la proteína N, de las cuales tres fueron positivas a la prueba de microneutralización. En ese estudio las muestras provenían de gatos aparentemente sanos, al igual que las muestras evaluadas en el presente trabajo. Sin embargo, ellos analizaron 831 muestras de gatos, y aquellas positivas tuvieron títulos entre 1:32 a 1:256, mayores a los títulos observados en este estudio.

Por otra parte, se han publicado otros estudios sobre la detección de anticuerpos contra el antígeno N en gatos. En Italia se detectaron cinco gatos positivos mediante la prueba comercial ELISA doble antígeno contra N, de los cuales tres fueron positivos a microneutralización, con títulos entre 1:60 y 1:160 (Cardillo *et al.*, 2022). Sin embargo, también se han reportado cuatro muestras positivas a ELISA doble antígeno contra N comercial que fueron negativas a una prueba de neutralización simulada, mientras que las muestras positivas a una prueba de ELISA contra RBD coincidieron

con neutralización simulada. Además, ese estudio coincide con el nuestro en haber encontrado solamente una muestra positiva al antígeno N que fuera positiva a neutralización simulada (Adler *et al.*, 2022). Por otra parte, en Tailandia se reportaron cuatro muestras de gatos positivas a ELISA doble antígeno contra N comercial que fueron negativas a la prueba de neutralización simulada (Udom *et al.*, 2021). Estos estudios coinciden con nuestros resultados e indican una menor sensibilidad de las pruebas de ELISA contra el antígeno N para detectar anticuerpos en gatos.

Al establecer el título 1:20 como corte de la prueba de microneutralización las sensibilidades de todas las pruebas en perros aumentaron, a excepción de la prueba de ELISA indirecta con el antígeno N (Cuarta y quinta columna del cuadro 8). En este caso, los mejores resultados fueron los de la prueba de neutralización simulada en cuanto a la sensibilidad, aunque su especificidad fue más baja, tuvo el mayor AUC (90%). En humanos, se han reportado pruebas de neutralización simulada con sensibilidad baja para detectar anticuerpos neutralizantes de títulos bajos, y esta va aumentando conforme aumentan los títulos de microneutralización (Embregts *et al.*, 2021). Esto también fue observado al modificar el punto de corte de microneutralización a 1:20, donde la sensibilidad de la prueba de neutralización simulada aumentó. Por otra parte, la prueba de ELISA doble antígeno contra ambos antígenos tuvo una buena combinación de sensibilidad (75%) y especificidad (91.1%) en comparación al resto, así como un AUC de 86.5%, lo que indica que esta es una buena prueba para detectar anticuerpos en perros contra SARS-CoV-2 con títulos mayores a 1:20. A pesar de que las pruebas de ELISA indirecta contra S1 o RBD tuvieron mayor especificidad, su sensibilidad fue baja, al igual que las pruebas de ELISA doble antígeno contra RBD o contra N. Sin embargo, la prueba de ELISA indirecta contra RBD tuvo un AUC elevado (89.9%) al cambiar el corte a 1:20 en microneutralización. (Cuadro 8).

Se han publicado estudios donde se evalúan anticuerpos en muestras de perros. Con una prueba de ELISA indirecta contra RBD se encontraron 16 muestras positivas, de las cuales 10 fueron positivas a microneutralización (Zhao *et al.*, 2022). Aunque no se reportan los valores de sensibilidad y especificidad en esta prueba, los resultados indican una buena sensibilidad al detectar las muestras positivas por microneutralización. Sin embargo, no se evaluó la totalidad de las muestras por microneutralización como en nuestro estudio, lo que podría proveer más información sobre la funcionalidad de la prueba. En un estudio realizado en Croacia se determinaron 13 muestras de perros positivas mediante una prueba de ELISA indirecta contra los antígenos S y N de SARS-CoV-2, y de estas únicamente dos fueron positivas a la prueba de microneutralización

(Stevanovic *et al.*, 2021b). Esto es similar a los resultados obtenidos en el presente estudio con la prueba ELISA de doble antígeno utilizando ambos antígenos, donde hubo 16 muestras positivas mediante ELISA y solamente tres resultaron positivas a microneutralización.

En perros, al igual que en gatos, los resultados de las pruebas de ELISA que utilizaban al antígeno N estuvieron entre las pruebas con sensibilidad más baja. En Italia se reportó a un perro positivo a la prueba de ELISA doble antígeno contra N, sin embargo fue negativo a la prueba de microneutralización (Cardillo *et al.*, 2022). Además, se han reportado cinco muestras de perros positivas y cinco sospechosas utilizando la prueba de ELISA doble antígeno contra la proteína N, pero todas fueron negativas a la prueba de microneutralización (Barua *et al.*, 2021). Aunado a esto, Jairak *et al.* (2022) encontraron cinco muestras de perros positivas a ELISA doble antígeno pero todas fueron negativas a una prueba de neutralización simulada. Así también, se han reportado 35 muestras de perros positivas por la prueba de ELISA doble antígeno contra la proteína N, de las cuales ninguna fue positiva a una prueba de neutralización simulada (Udom *et al.*, 2021). Estos estudios coinciden con los resultados observados en nuestro estudio para el antígeno N, donde no se detectan como positivas a las muestras positivas a microneutralización.

Entre los resultados, hubo muestras positivas con las pruebas de ELISA que utilizaban el antígeno N y que no coincidían en ser positivas a las pruebas de microneutralización, tanto en perros como en gatos. Se han reportado posibles reacciones cruzadas de la proteína N y S2 con otros coronavirus en muestras serológicas de gatos y perros, más no con el dominio RBD y la proteína S1 (Kim *et al.*, 2020). Para evaluar las posibles reacciones cruzadas, se alinearon las secuencias aminoacídicas de la proteína N de SARS-CoV-2 con las de coronavirus caninos y felinos (Figura 23). Todas las secuencias fueron obtenidas de NCBI. Al alinear la proteína N de SARS-CoV-2 con la secuencia de la proteína N de coronavirus canino hubo una similitud de 42.13%, mientras que al compararse con la proteína N del coronavirus respiratorio canino hubo una similitud de 48.26%. Por otra parte, al alinear la proteína N de SARS-CoV-2 con la secuencia de la proteína N de coronavirus felino la similitud fue de 41.06%. Por otra parte, al alinear la secuencia de la proteína N de SARS-CoV-2 con la secuencia de la proteína N de FIPV hubo una similitud de 41.06%.

La reacción cruzada es el fenómeno que se observa cuando un anticuerpo se une con diversos epítomos que pertenecen a distintos antígenos (Webster *et al.*, 1994). Las posibles reacciones cruzadas dependen de diversos factores como la estructura, secuencia y propiedades fisicoquímicas del antígeno y anticuerpo, que en conjunto puedan generar una alta afinidad de unión. Determinar

la identidad y similitud entre las secuencias aminoacídicas de distintas proteínas es el paso inicial para definir posibles reacciones cruzadas con un mismo anticuerpo. La identidad de secuencias se refiere a cuando dos aminoácidos de distintas secuencias son los mismos, mientras que la similitud es cuando dos aminoácidos de distintas secuencias comparten propiedades fisicoquímicas que los hacen similares (Bloml f *et al.*, 2022). Las proteínas requieren de un porcentaje entre 20% a 30% de identidad para considerarse homólogas, es decir, con una estructura similar y que provienen de un ancestro común (Pearson, 2013). Sin embargo, los epítopos reconocidos por anticuerpos están conformados por aproximadamente cinco a quince residuos de aminoácidos y, en general, de estos solamente 2 a 3 son claves para establecer la afinidad en la unión del complejo antígeno-anticuerpo (Bosshard, 1995). Por lo tanto, la afinidad de distintos epítopos a un mismo anticuerpo se puede establecer con una similitud o identidad en algunas coincidencias de aminoácidos clave en la unión. Los porcentajes de similitud en los alineamientos de los coronavirus felinos y caninos fueron muy similares, mientras que para el coronavirus respiratorio canino fueron mayores. Esto podría explicarse porque los coronavirus canino (CCoV) y felino (FCoV) pertenecen al género *Alphacoronavirus*, mientras que el coronavirus respiratorio canino pertenece al género de los *Betacoronavirus*, el mismo género que SARS-CoV-2, mientras que el FIPV es una variante del FCoV. En los resultados de las pruebas de ELISA hubo más muestras con resultados positivos pero negativos a microneutralización en el caso de perros, al igual que mayor cantidad de muestras sospechosas, y a pesar de que no se evaluaron estas muestras para determinar reacciones cruzadas, esta posibilidad no se puede descartar. También es importante considerar que la población evaluada de perros fue mucho mayor que la de gatos, lo que da paso a la posibilidad de que se encuentren muestras de perros con anticuerpos contra otros coronavirus.

|                         |                                                                                  |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Consenso                | -----MAXQGQR-----VtWGDExsKRRGRSnsRGRK-----NnNIPLsxFNPITLexGSKFWNx                |
| SARS-CoV-2 (1>419)      | -MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNGERSGARSQRRPQ-----GLPNNTASWFTALTQHGK-EDLKF         |
| Canine CoV (1>382)      | -----MASQGQR-----VSWGDESTKKRGRSnsRGRK-----NNTIPLSFFNPITLQQGSKFWNL                |
| Canine Resp CoV (1>448) | MSFTPGKQSSSRASSGNRSNGILKWADQSDQSRNVQTRGRRAQPKQTATSQQPSGGNVVPPYYSWFSGITQFQKGKEFEF |
| FIPV (1>377)            | -----MATQGQR-----VNWGDEPSKRRGRSnsRGRK-----NNNIPLSFYNPITLESgSKFWNV                |
| Feline CoV (1>377)      | -----MATQGQR-----VTWGDEPSKRRGRSnsRGRK-----NSNIPFSYFNPVTLESgSKFWNV                |
| Consenso                | CPRDFVPKGIGN-kDQQIGYWNrQer--xRIVKQQRKELPERWFFYYLGTGPHADAKFKDKIDGVFWVARDGAMN--KPT |
| SARS-CoV-2 (1>419)      | PRGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRRATRR-IRGGDGKMKDLSPRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGIWVATEGALNTPKDH |
| Canine CoV (1>382)      | CPRDFVPKGIGN-KDQQIGYWNrQSR--YRMVKGQRKELPERWFFYYLGTGPHADAKFKDRIDGVWVAKDGMN--KPT   |
| Canine Resp CoV (1>448) | AEGQGVPIAPGVPAEAKGYWYRHNRRSFKTAGDNQRLPRWYFYLLGTGPHAKDQYGTIDIGVFWVASNQADVNTPAD    |
| FIPV (1>377)            | CPRDFVPKGIGN-KDQQIGYWNrQER--FRIVKQQRKELPERWFFYYLGTGPHADAKFKDKIDGVFWVARDGAMN--KPT |
| Feline CoV (1>377)      | CPRDFVPKGIGN-RDQQIGYWNrQER--YRIVKQQRKELPERWFFYYLGTGPHADAKFKDKIDGVFWVARDGAMN--KPT |
| Consenso                | TLGxRGxNNESKPLKFDG-KxPPQFQLEVN-RSRxNSRSRSQSRsvSRNRSQSRGRQQSNNQ-xTNVExtivAvLqKLGv |
| SARS-CoV-2 (1>419)      | IGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSSRNssRNSTPGSSRGTSPPARMAGNGGDAALALLLLD  |
| Canine CoV (1>382)      | TLGNRGANNESKALKFDG-KVPGEFQLEVN-QSRDnsRSRSQSRsvSRNRSQSRGRQQSNNKKDDNVEQAVLAALKKLGV |
| Canine Resp CoV (1>448) | ILDRDPSSDEAIPTRFPPGTVLPGYYIEG-SGRSAPDSRSTSRASSRAFSAG-SRSRANSNRTPTSGVTPDMADQIAS   |
| FIPV (1>377)            | TLGTRGTNNESKPLKFDG-KIPPQFQLEVN-RSRNNSRSGSQSRsvSRNRSQSRGRQQSNNQ-NTNVEDTIVAVLQKLGV |
| Feline CoV (1>377)      | TLGTRGTNNESKPLKFDG-KIPPQFQLEVN-RSRNNSRSGSQSRsvSRNRSQSRGRQQSNNQ-NTNVEDTIVAVLQKLGV |
| Consenso                | ten---qRSRSK-SxxRgeSntKdTPKNANKHTWKRTAGK-GDVTxFYGARxxS---ANFGSDSLVANGNAakxYPQIA  |
| SARS-CoV-2 (1>419)      | RLNQLESKMSGKGGQQGQTVTKKSAEASKKPRQKRTATKAYNVTAQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIA  |
| Canine CoV (1>382)      | DTEKQQQRSRK-SKERSNSKTRDTPKNENKHTWKRTAGK-GDVTKFYGARSSS---ANFGSDSLVANGNAKYYYPQIA   |
| Canine Resp CoV (1>448) | LVLAKLGKDATK-PQQVTKQTAKEIRQKILNPKRQKRSQKQCTVQQCFGKRGPN---QNFGGGEMLKLGTSDPQFPILA  |
| FIPV (1>377)            | TEN---RRSRK-SRDRGESNFKDNTPKNANKHTWKRTAGK-GDVTNfyGARIA---ANFGSDSLVANGNAakfYPQIA   |
| Feline CoV (1>377)      | TEK---QRSRSK-SRDRVESNSRDTTPKNANKHTWKRTAGK-GDVTNfyGARSAS---ANFGSDSLVANGNAakCYPQIA |
| Consenso                | ECVPSVSSxxFGSxwsAEEAGDQ-----vkVTLThTYyLPKDDxKTSQFLQQIDAYKRPSQVAK                 |
| SARS-CoV-2 (1>419)      | QFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSG-----TWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFP                 |
| Canine CoV (1>382)      | ECVPSVSSILFGSYMTAKEDGDQ-----IEVTFTHKYHLPKDDPKTGQFLQQINAYARPSEVAK                 |
| Canine Resp CoV (1>448) | ELAPTAGAFFFGSRLELAKVQNLGSLNDEPQKDVYELRYNGAIRFDSTLSGFDITMKVLNDNLNAYQQQDGMNMMSPKPQ |
| FIPV (1>377)            | ECVPSVSSMIFGSQWSAEEAGDQ-----VKVTLThTYyLPKDDAKTSQFLEQIDAYKRPSQVAK                 |
| Feline CoV (1>377)      | ECVPSVSSMLFGSQWSAEEAGDQ-----VKVTLThTYyLPKDDAKTSQFLEQIDAYKRPSQVAK                 |
| Consensus               | dQRQRKxRSKSADkkseEls-vtLxExYTDVFDOTQVEmIDEVTN-----                               |
| SARS-CoV-2 (1>419)      | PTEPKKDKKKKADETQALPQRQKQQTVTLPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA                            |
| Canine CoV (1>382)      | EQQRKARSKSAERVEQEVVPDALTENYTDVFDOTQVEIIDEVTN                                     |
| Canine Resp CoV (1>448) | RQRGHKNGQGENDNISVAAPKSRVQQNSRELTAEISLLKKKDKPYTEDTSEI                             |
| FIPV (1>377)            | DQRQRKRSKSADKKSEELS-VTLVEAYTDVFDOTQVEmIDEVTN                                     |
| Feline CoV (1>377)      | DQRQRKPRSRsADKKPEELS-VTLVEAYTDVFDOTQVEmIDEVTN                                    |

Figura 23. Alineamiento múltiple de la proteína N de SARS-CoV-2 con las proteínas N de coronavirus caninos (coronavirus canino y coronavirus respiratorio canino) y de coronavirus felinos (coronavirus felino y FIPV).

En algunos estudios se han encontrado posibles reacciones cruzadas en muestras de gatos. En uno de estos, 7 de 13 muestras positivas a FIPV fueron positivas a la prueba de ELISA indirecta contra el antígeno N, pero ninguna fue positiva a ELISA indirecta contra RBD de SARS-CoV-2 (Bold *et al.*, 2022). En otro estudio, dos de 103 muestras de gatos positivas a FCoV fueron positivas a ELISA doble antígeno contra N y seis positivas a ELISA indirecta contra RBD (Adler *et al.*, 2022). Aunado a esto, Dileepan *et al.* (2021) reportaron 19 muestras de gatos positivas a ELISA indirecta

contra N, de las cuales 15 fueron positivas a FCoV. Otros estudios no han encontrado reacciones cruzadas en muestras de gatos contra FIPV utilizando la prueba de ELISA contra RBD de SARS-CoV-2 (Schulz *et al.*, 2021). Por otra parte, existe menos evidencia reportada para evaluar reacciones cruzadas en el caso de los perros. Sin embargo, si se han reportado muestras positivas a ELISA indirecta con la proteína N o la proteína S2, que resultaron positivas a coronavirus canino (Kim *et al.*, 2020). Con base en esta evidencia, no se pueden descartar reacciones cruzadas en las pruebas de ELISA con el antígeno N.

Las correlaciones de las pruebas de ELISA con la prueba de microneutralización reflejan la relación que existe entre ambas pruebas, así como la relación entre los anticuerpos neutralizantes detectados en la prueba de microneutralización con los anticuerpos detectados por la prueba de ELISA. Un coeficiente de correlación positivo indica que, al aumentar los valores de unidades arbitrarias en la prueba de ELISA o el porcentaje en la prueba de neutralización simulada, aumentan también los títulos de microneutralización. En gatos, los coeficientes de correlación fueron mayores en las pruebas de ELISA doble antígeno en comparación a las pruebas de ELISA indirecta (Cuadro 9). Entre las pruebas con los coeficientes más altos estuvieron ELISA indirecta y doble antígeno con la proteína RBD, así como la prueba de neutralización simulada. Sin embargo, la prueba con el coeficiente de correlación más elevado fue ELISA doble antígeno con ambos antígenos. En perros, la prueba de neutralización simulada tuvo el coeficiente más elevado, y seguida de esta fue la prueba de ELISA indirecta contra RBD (Cuadro 9). La prueba de doble antígeno con ambos antígenos tuvo un coeficiente de correlación bajo, pero fue el mejor dentro de las pruebas con este mismo formato.

En algunos estudios se han reportado los coeficientes de correlación entre pruebas de ELISA y pruebas de microneutralización. Se ha obtenido un coeficiente de correlación de 0.7924 para la prueba de ELISA indirecta contra RBD y microneutralización en muestras de gatos, mientras que el coeficiente de correlación para la prueba de ELISA indirecta contra N fue de 0.0041 (Bold *et al.*, 2022). Esto es similar a los resultados de gatos, donde las pruebas que utilizaban al antígeno RBD tuvieron una mayor correlación en comparación a las que utilizaban al antígeno N. En perros se han reportado coeficientes de correlación de 0.51 en una prueba de ELISA indirecta contra RBD y una prueba de microneutralización, con base en los resultados de 1069 muestras remanentes de veterinarias (Stevanovic *et al.*, 2021a). Esta correlación es positiva y similar a la correlación obtenida por ELISA indirecta contra RBD en nuestro estudio, que fue cercana a 0.3. Una de las

razones por las que este coeficiente fue menor es que el tamaño de muestra (n=1069) es mucho mayor a la evaluada por nuestro estudio (n=453).

Cuadro 9. Coeficientes de correlación entre las diversas pruebas desarrolladas para detectar anticuerpos contra SARS-CoV-2 en perros y gatos con la prueba de microneutralización.

| Prueba                            | Correlación con MNT |            |
|-----------------------------------|---------------------|------------|
|                                   | Perros              | Gatos      |
| <b>ELISA Indirecta RBD</b>        | r= 0.2723           | r= 0.4552  |
| <b>ELISA Indirecta N</b>          | r= 0.1161           | r= -0.0291 |
| <b>ELISA Indirecta S1</b>         | r= 0.1521           | r= 0.3399  |
| <b>ELISA Doble Antígeno RBD+N</b> | r= 0.1967           | r= 0.5013  |
| <b>ELISA Doble Antígeno RBD</b>   | r= 0.0197           | r= 0.4815  |
| <b>ELISA Doble Antígeno N</b>     | r= 0.0340           | r= 0.2148  |
| <b>Neutralización Simulada</b>    | r= 0.5308           | r= 0.4409  |

Además de las posibles reacciones cruzadas, una posible explicación de las bajas correlaciones obtenidas en las muestras de perros en comparación a las muestras de gatos es la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes. En perros, hubo diversas muestras positivas a varias pruebas de ELISA, pero negativas a microneutralización. Entre las explicaciones para esto se encuentran los anticuerpos de unión sin función neutralizante. Por otra parte, en gatos, la mayoría de las muestras positivas a anticuerpos neutralizantes también fueron positivas a anticuerpos de unión contra SARS-CoV-2 detectados por ELISA. En Croacia, al evaluar remanentes de suero de perros obtenidos de una veterinaria se encontraron 149 muestras positivas a ELISA indirecta contra RBD, de las cuales únicamente 23 tuvieron anticuerpos neutralizantes (15.43%) (Stevanovic *et al.*, 2021a). Este resultado es similar a nuestro estudio, ya que dentro de las 32 muestras positivas de perros a ELISA indirecta contra RBD solamente cinco muestras fueron positivas a anticuerpos neutralizantes (15.62%). Por lo tanto, muchas de las muestras positivas a anticuerpos en perros pueden tener anticuerpos sin función neutralizante.

Generalmente, los cuadros clínicos de perros infectados por SARS-CoV-2 suelen ser más leves que

en gatos o incluso asintomáticos. Esto podría influir en que no se produzcan anticuerpos neutralizantes en ciertos perros infectados por SARS-CoV-2 (Hobbs y Reid, 2021). Esto también se ha observado en humanos, donde generalmente en las enfermedades más severas se produce una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes en comparación a enfermedades leves (Kellam y Barclay, 2020). Aunado a esto, las muestras recolectadas en nuestro estudio fueron tomadas en diversos momentos a perros con un estatus desconocido de la infección. En humanos se ha reportado que no siempre se detectan anticuerpos neutralizantes en etapas tempranas de la infección y que algunos individuos infectados pueden producir un nivel moderado de anticuerpos de unión, pero no neutralizantes (Lerdsamran *et al.*, 2021). Con base en esto, las infecciones asintomáticas o leves en perros podrían generar una producción de anticuerpos sin actividad neutralizante que no son detectadas a través de las pruebas de microneutralización, al tratarse únicamente de anticuerpos de unión. Además, el muestreo de perros con un estatus desconocido de la infección puede influir en que no se detecten los anticuerpos en las etapas de infección en que se producen.

Se obtuvieron los valores de frecuencia para las poblaciones de gatos (Cuadro 10) y perros (Cuadro 11) del estado de Sonora. La frecuencia obtenida con la prueba de neutralización simulada en gatos fue igual a la obtenida por microneutralización (16.13%), y con la prueba de ELISA doble antígeno con ambos antígenos se observó una frecuencia similar (13.33%), así como con la prueba de ELISA indirecta contra S1 (12.9%). Sin embargo, se compararon las frecuencias totales con las frecuencias de las pruebas, tomando en cuenta únicamente las muestras que coincidieron con microneutralización; y la frecuencia obtenida con la prueba de ELISA doble antígeno contra ambos antígenos fue la más similar a la obtenida por microneutralización. Así también, la prueba de neutralización simulada tuvo resultados muy similares a microneutralización, y coincidió con la prueba de ELISA doble antígeno contra ambos antígenos en tener más coincidencias.

En el caso de los perros, la prueba que indicó la frecuencia más similar con la prueba de microneutralización (4.46%) fue ELISA indirecta contra S1 (4.41%), seguida de doble antígeno contra ambos antígenos (3.62%). Sin embargo, estos valores cambiaron al obtener la frecuencia con las muestras que coinciden con microneutralización. La que mostró un valor más similar fue la prueba de ELISA indirecta contra RBD (1.1%), y aunque la prueba de neutralización simulada tuvo la mayor cantidad de coincidencias con microneutralización, la frecuencia observada fue mucho mayor (12.15%). Esto sucedió en la prueba de neutralización simulada debido a que se evaluaron menos muestras en el total, y estas incluían a las muestras positivas a



microneutralización. Por lo tanto, es recomendable evaluar una mayor cantidad de muestras o una cantidad similar con la prueba de microneutralización para confirmar estos resultados.

Cuadro 10. Frecuencias por prueba para detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2 en muestras de gatos del estado de Sonora.

| <b>Prueba</b>                     | <b>n</b> | <b>Muestras positivas</b> | <b>Frecuencia (%)</b> | <b>*Coincidencias</b> | <b>Frecuencia (%)</b> |
|-----------------------------------|----------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Microneutralización</b>        | 31       | 5                         | 16.13%                | 5                     | 16.13%                |
| <b>ELISA RBD Indirecta</b>        | 31       | 3                         | 9.67%                 | 3                     | 9.67%                 |
| <b>ELISA N Indirecta</b>          | 31       | 1                         | 3.22%                 | 1                     | 3.22%                 |
| <b>ELISA S1 Indirecta</b>         | 31       | 4                         | 12.9%                 | 3                     | 9.67%                 |
| <b>ELISA Doble Antígeno RBD+N</b> | 30       | 4                         | 13.33%                | 4                     | 13.33%                |
| <b>ELISA Doble Antígeno RBD</b>   | 30       | 3                         | 10%                   | 3                     | 10%                   |
| <b>ELISA Doble Antígeno N</b>     | 31       | 3                         | 9.67%                 | 1                     | 3.22%                 |
| <b>Neutralización Simulada</b>    | 31       | 5                         | 16.13%                | 4                     | 12.9%                 |

\*Coincidencias: Muestras que fueron positivas a la prueba de ELISA que se presenta en la columna 1 y a la prueba de MNT.

Los resultados de las frecuencias que se compararon fueron los obtenidos mediante la prueba de microneutralización. El resultado de frecuencia en gatos (16.12%) es similar al que se obtuvo en Wuhan, donde se evaluaron anticuerpos en muestras de gatos con la prueba ELISA Indirecta utilizando el antígeno RBD, y reportaron un 14.7% de seropositividad (Zhang et al., 2020). Por otra parte, Fuentealba et al. (2021) reportaron dos muestras positivas mediante una prueba de ELISA contra la proteína S de 18 gatos (11.1%), lo cual también es similar al resultado del presente estudio. Con base a lo anterior y de manera general, la frecuencia de gatos seropositivos a SARS-CoV-2 obtenida en el presente trabajo concuerda con algunos estudios publicados hasta el momento.

Cuadro 11. Frecuencias por prueba para detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2 en muestras de perros del estado de Sonora.

| Prueba                            | n   | Muestras positivas | Frecuencia (%) | *Coincidencias | Frecuencia (%) |
|-----------------------------------|-----|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Microneutralización</b>        | 448 | 20                 | 4.46%          | 20             | 4.46%          |
| <b>ELISA RBD Indirecta</b>        | 453 | 32                 | 7.06%          | 5              | 1.10%          |
| <b>ELISA N Indirecta</b>          | 453 | 13                 | 2.86%          | 0              | 0%             |
| <b>ELISA S1 Indirecta</b>         | 453 | 20                 | 4.41%          | 1              | 0.22%          |
| <b>ELISA Doble Antígeno RBD+N</b> | 441 | 16                 | 3.62%          | 3              | 0.68%          |
| <b>ELISA Doble Antígeno RBD</b>   | 118 | 8                  | 6.78%          | 2              | 1.69%          |
| <b>ELISA Doble Antígeno N</b>     | 142 | 3                  | 2.11%          | 2              | 1.40%          |
| <b>Neutralización Simulada</b>    | 107 | 24                 | 7.47%          | 13             | 12.15%         |

\*Coincidencias: Muestras que fueron positivas a la prueba de ELISA que se presenta en la columna 1 y a la prueba de MNT.

Por otra parte, en Italia, Cardillo y colaboradores (2021) obtuvieron una seropositividad de 1.7% en gatos, que es mucho menor a la observada en el presente estudio. Sin embargo, en ese estudio únicamente se evaluaron anticuerpos contra el antígeno N mediante una prueba ELISA de doble antígeno, mientras que, en el presente estudio se tomaron en cuenta resultados de la prueba de microneutralización. Esto pudo influir en obtener un porcentaje más bajo, al no evaluar anticuerpos neutralizantes o contra la proteína RBD. Por otra parte, en estudios de Brasil y Texas han reportado anticuerpos neutralizantes en gatos con seroprevalencias más altas de 20% y 43.8%, respectivamente. Sin embargo, estos estudios eran de tipo longitudinal con seguimiento de las mascotas, lo que hace más probable encontrar muestras positivas en comparación al presente estudio, donde no se realizó un seguimiento. Aunado a estos, Fritz y colaboradores (2020) obtuvieron una seroprevalencia más alta (23.5%) mediante un inmunoensayo de microesferas y una prueba de neutralización. Sin embargo, las muestras del estudio mencionado previamente pertenecían a gatos en hogares con humanos infectados por SARS-CoV-2, es decir, tenían una población expuesta a diferencia de nuestro estudio.

La frecuencia de perros positivos a SARS-CoV-2 fue de 4.46%, y este resultado es similar al estudio de Calvet y colaboradores (2021), donde se reporta 3.4% de perros con anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 mediante la prueba de PRNT. Por otra parte, Cardillo y colaboradores (2021) reportaron un porcentaje más bajo de seropositividad en perros (0.55%), pero

se debe considerar que su tamaño de muestra ( $n=182$ ) fue mucho menor al nuestro ( $n=448$ ) y solo se evaluaron anticuerpos contra la proteína N, lo que podría influir en la diferencia de resultados. En otros estudios se han encontrado valores de seropositividad en perros más elevados a los obtenidos. Hamer y colaboradores (2021) encontraron un 11.9% de seropositividad, mientras que Calvet y colaboradores (2021) observaron un 28% de muestras positivas. Sin embargo, este último estudio fue de tipo longitudinal. Así también, Fritz y colaboradores (2020) encontraron una seropositividad del 15.4% en una población de perros expuesta. Este valor es mayor que el obtenido en el presente estudio, y esto podría explicarse debido a que las muestras evaluadas fueron de perros con estatus desconocido de exposición al virus.

Hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias observadas de perros y gatos ( $p < 0.05$ ). Al analizar los valores, se puede observar que los gatos tienen una frecuencia más alta. En la mayoría de los estudios donde han evaluado a estas dos poblaciones animales encontraron valores de seropositividad mayores en gatos que en perros, como se puede observar en el cuadro 2. Existen posibles explicaciones por las cuales los perros suelen ser menos susceptibles a la infección que los gatos, una de ellas es que el receptor ACE-2 en perros difiere con el de los gatos en un residuo, que parece ser clave para la interacción e infección viral (Mathavarajah y Dellaire, 2020). Por otra parte, los perros usualmente no expresan el receptor ACE-2 en conjunto con TMPRSS2 en su tracto respiratorio superior, los cuales son importantes para la internalización de SARS-CoV-2 en las células blanco (Hedman *et al.*, 2021). Por ende, los gatos suelen infectarse más frecuentemente y de manera más productiva que los perros.

## 7. CONCLUSIONES

En gatos, la prueba de ELISA doble antígeno utilizando ambas proteínas (proteína N y proteína RBD) tuvo el valor AUC más alto (88%) y los mejores valores de sensibilidad (80%) y especificidad (100%) en comparación al resto. En el caso de los perros, la prueba de neutralización simulada tuvo un AUC de 89.1% y la sensibilidad más elevada (65%). Por lo tanto, la prueba de ELISA doble antígeno contra ambos antígenos tuvo el mejor desempeño para detectar anticuerpos contra SARS-CoV-2 en muestras de gatos. Además, tuvo un buen desempeño para detectar anticuerpos contra SARS-CoV-2 en muestras de perros.

Las correlaciones indicaron que la mayoría de las muestras de gatos con valores altos a ELISA también tienen títulos altos a microneutralización, lo cual no sucedió en muestras de perros, probablemente por una menor producción de anticuerpos neutralizantes en esta especie. Además, es posible que existan reacciones cruzadas con FIPV o el coronavirus respiratorio canino al evaluar anticuerpos contra la proteína N de SARS-CoV-2. Por otra parte, la frecuencia de anticuerpos contra SARS-CoV-2 es mayor en gatos que en perros, lo cual podría explicarse por factores biológicos relacionados al receptor ACE-2 expresado en los caninos. Además, los resultados de seroprevalencia que se obtuvieron de estas muestras evaluadas en el estado de Sonora son similares a los reportados en otros países.

## **8. RECOMENDACIONES**

La evaluación de anticuerpos contra coronavirus caninos en las muestras de perros, así como contra coronavirus felinos en las muestras de gatos permitiría evaluar las posibles reacciones cruzadas. Con base a esto, se podrían realizar cambios en los antígenos utilizados para evitar que sucedan estos falsos positivos. Así también, se recomienda evaluar las pruebas de gatos en una mayor cantidad de muestras para observar si los resultados de sensibilidad y especificidad se mantienen.

## 9. REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. y Pillai, S. 2014. Cellular and molecular immunology. Elsevier Health Sciences. Sexta edición. San Francisco. 566 pp.
- Adler, J. M., Weber, C., Wernike, K., Michelitsch, A., Friedrich, K., Trimpert, J., Beer, M., Kohn, B., Osterrieder, K. y Müller, E. 2022. Prevalence of anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibodies in cats in Germany and other European countries in the early phase of the coronavirus disease-19 pandemic. *Zoonoses and Public Health*. 69(5): 439-450.
- Al-Malki, E. S. 2020. Toxoplasmosis: risk assessment in humans, animals, birds, and soils at various stages of the life cycle and socio-economic status effect on protozoan parasite eradication. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 28(1): 962-969.
- Al-Salihi, K. A. y Khalaf, J. M. 2021. The emerging SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2: An insight into the viruses zoonotic aspects. *Veterinary World*. 14(1): 190-199.
- Al Adem, K., Shanti, A., Stefanini, C. y Lee, S. 2020. Inhibition of SARS-CoV-2 Entry into Host Cells Using Small Molecules. *Pharmaceutics*. 13(12): 447-480.
- Alexander Thomas, S. 2016. Human Immunodeficiency Virus Diagnostic Testing: 30 Years of Evolution. *Clinical and Vaccine Immunology*. 23(4): 249-253.
- Alhajj, M. y Farhana, A. (2021). Enzyme linked immunosorbent assay. Treasure Island: National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>.
- Amanat, F., White, K. M., Miorin, L., Strohmeier, S., McMahon, M., Meade, P., Liu, W. C., Albrecht, R. A., Simon, V. y Martinez-Sobrido, L. 2020. An in vitro microneutralization assay for SARS-CoV-2 serology and drug screening. *Current protocols in microbiology*. 58(1): 108-122.
- Barik, S., Mohanty, K., Bisht, D., Joshi, B., Jena, S. y Tripathy, S. 2018. An overview of enzyme immunoassay: The test generation assay in HIV/AIDS testing. *Journal of AIDS and clinical research*. 9(3): 762-766.
- Barua, S., Hoque, M., Adekanmbi, F., Kelly, P., Jenkins-Moore, M., Torchetti, M. K., Chenoweth, K., Wood, T. y Wang, C. 2021. Antibodies to SARS-CoV-2 in dogs and cats, USA. *Emerging Microbes & Infections*. 10(1): 1669-1674.
- Bhat, A. H. 2021. Bacterial zoonoses transmitted by household pets and as reservoirs of antimicrobial resistant bacteria. *Microbial Pathogenesis*. 155: 48-91.
- Blomlöf, A., Unge, A., Byström, P., Lindberg, E. y Fries, T. (2022). *Immunological Cross-Reactivity: Construction of a Workflow That Enables Cross-Reactivity Predictions*. (Tesis de pregrado). Uppsala Universitet, Suecia.
- Bold, D., Roman-Sosa, G., Gaudreault, N. N., Zayat, B., Pogranichniy, R. M. y Richt, J. A. 2022. Development of an Indirect ELISA for the Detection of SARS-CoV-2 Antibodies in Cats. *Front Vet Sci*. 9: 864-884.

- Bonilla-Aldana, D. K., Holguin-Rivera, Y., Perez-Vargas, S., Trejos-Mendoza, A. E., Balbin-Ramon, G. J., Dhama, K., Barato, P., Lujan-Vega, C. y Rodriguez-Morales, A. 2020. Importance of the One Health approach to study the SARS-CoV-2 in Latin America. *One Health*. 10: 100-147.
- Bosco-Lauth, A. M., Hartwig, A. E., Porter, S. M., Gordy, P. W., Nehring, M., Byas, A. D., VandeWoude, S., Ragan, I. K., Maison, R. M. y Bowen, R. A. 2020. Experimental infection of domestic dogs and cats with SARS-CoV-2: Pathogenesis, transmission, and response to reexposure in cats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 117(42): 26382-26388.
- Bosshard, H. R. 1995. Epitope Mapping with Peptides. Academic Press. San Diego. 419-454 pp.
- Burgess, S. y Sievertsen, H. H. (2020). Schools, skills, and learning: The impact of COVID-19 on education. Reino Unido: Voxeu. Recuperado de <https://voxeu.org/article/impact-covid-19-education>.
- Calvet, G. A., Pereira, S. A., Ogrzewalska, M., Pauvolid-Corrêa, A., Resende, P. C., Tassinari, W. d. S., Costa, A. d. P., Keidel, L. O., da Rocha, A. S. B. y da Silva, M. F. B. 2021. Investigation of SARS-CoV-2 infection in dogs and cats of humans diagnosed with COVID-19 in Rio de Janeiro, Brazil. *PLOS ONE*. 16(4): 50-58.
- Cardillo, L., de Martinis, C., Brandi, S., Levante, M., Cozzolino, L., Spadari, L., Boccia, F., Carbone, C., Pompameo, M. y Fusco, G. 2022. SARS-CoV-2 Serological and Biomolecular Analyses among Companion Animals in Campania Region (2020–2021). *Microorganisms*. 10(2): 20-26.
- Cinquanta, L., Fontana, D. E. y Bizzaro, N. 2017. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Autoimmunity Highlights*. 8(1): 1-8.
- Cullen, W., Gulati, G. y Kelly, B. 2020. Mental health in the Covid-19 pandemic. *QJM: An International Journal of Medicine*. 113(5): 311-312.
- Day, M. J., Breitschwerdt, E., Cleaveland, S., Karkare, U., Khanna, C., Kirpensteijn, J., Kuiken, T., Lappin, M. R., McQuiston, J. y Mumford, E. 2012. Surveillance of zoonotic infectious disease transmitted by small companion animals. *Emerging Infectious Diseases*. 18(12): 26-64.
- Deng, L.-J., Xu, Y. y Huang, J. 2008. Developing a double-antigen sandwich ELISA for effective detection of human hepatitis B core antibody. *Comparative immunology, microbiology infectious diseases*. 31(6): 515-526.
- DGE, D. G. d. E. (2021). COVID-19 México. Información General. México: Datos COVID-19. Recuperado de <https://datos.covid-19.conacyt.mx/>.
- Dhama, K., Patel, S. K., Sharun, K., Pathak, M., Tiwari, R., Yatoo, M. I., Malik, Y. S., Sah, R., Rabaan, A. A. y Panwar, P. K. 2020. SARS-CoV-2 jumping the species barrier: Zoonotic lessons from SARS, MERS and recent advances to combat this pandemic virus. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 37: 18-30.
- Dileepan, M., Di, D., Huang, Q., Ahmed, S., Heinrich, D., Ly, H. y Liang, Y. 2021. Seroprevalence of SARS-CoV-2 (COVID-19) exposure in pet cats and dogs in Minnesota, USA. *Virulence*. 12(1): 1597-1609.

- do Vale, B., Lopes, A. P., Fontes, M. d. C., Silvestre, M., Cardoso, L. y Coelho, A. C. 2021. Bats, pangolins, minks and other animals - villains or victims of SARS-CoV-2? *Veterinary Research Communications*. 45(1): 1-19.
- Duffy, S. 2018. Why are RNA virus mutation rates so damn high? *Plos Biology*. 16(8): 3000003.
- Eftekhari, A., Alipour, M., Chodari, L., Maleki Dizaj, S., Ardalan, M. R., Samiei, M., Sharifi, S., Zununi Vahed, S., Huseynova, I. y Khalilov, R. 2021. A Comprehensive Review of Detection Methods for SARS-CoV-2. *Microorganisms*. 9(2): 232.
- Embregts, C. W., Verstrepen, B., Langermans, J. A., Böszörményi, K. P., Sikkema, R. S., de Vries, R. D., Hoffmann, D., Wernike, K., Smit, L. A. y Zhao, S. J. O. H. 2021. Evaluation of a multi-species SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test. 13: 03-13.
- Espejo, A. P., Akgun, Y., Al Mana, A. F., Tjendra, Y., Millan, N. C., Gomez-Fernandez, C. y Cray, C. 2020. Review of current advances in serologic testing for COVID-19. *American journal of clinical pathology*. 154(3): 293-304.
- Fritz, M., Rosolen, B., Krafft, E., Becquart, P., Elguero, E., Vratskikh, O., Denolly, S., Boson, B., Vanhomwegen, J., Gouilh, M. A., Kodjo, A., Chirouze, C., Rosolen, S. G., Legros, V. y Leroy, E. M. 2020. High prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in pets from COVID-19+ households. *One Health*. 11: 19-22.
- Fuentealba, N. A., Moré, G., Bravi, M. E., Unzaga, J. M., De Felice, L., Salina, M., Viegas, M., Jodar, M. S. N., Valinotto, L. E. y Rivero, F. D. 2021. First detection and molecular analysis of SARS-CoV-2 from a naturally infected cat from Argentina. *Veterinary Microbiology*. 260: 109179.
- Garigliany, M., Van Laere, A.-S., Clercx, C., Giet, D., Escriou, N., Huon, C., van der Werf, S., Eloit, M. y Desmecht, D. 2020. Early Release-SARS-CoV-2 Natural Transmission from Human to Cat, Belgium, March 2020. *Emerging Infectious Diseases*. 26(12): 3069-3071.
- Goldman, E. 2020. Exaggerated risk of transmission of COVID-19 by fomites. *The Lancet Infectious Diseases*. 20(8): 892-893.
- Gómez, D. (2018). *Proposiciones*. México: Gaceta del senado. Recuperado de [https://www.senado.gob.mx/64/gaceta\\_del\\_senado/documento/86584](https://www.senado.gob.mx/64/gaceta_del_senado/documento/86584).
- Grigoryan, L. y Pulendran, B. 2020. The immunology of SARS-CoV-2 infections and vaccines. *Seminars in Immunology*. 50: 101-422.
- Hamer, S. A., Pauvolid-Corrêa, A., Zecca, I. B., Davila, E., Auckland, L. D., Roundy, C. M., Tang, W., Torchetti, M. K., Killian, M. L. y Jenkins-Moore, M. 2021. SARS-CoV-2 infections and viral isolations among serially tested cats and dogs in households with infected owners in Texas, USA. *Viruses*. 13(5): 938.
- Harvala, H., Robb, M. L., Watkins, N., Ijaz, S., Dicks, S., Patel, M., Supasa, P., Wanwisa, D., Liu, C. y Mongkolsapaya, J. 2021. Convalescent plasma therapy for the treatment of patients with COVID-19: assessment of methods available for antibody detection and their correlation with neutralising antibody levels. *Transfusion Medicine*. 31(3): 167-175.
- Hasan, T. y Nishikawa, Y. 2022. Advances in vaccine development and the immune response against toxoplasmosis in sheep and goats. *Front Vet Sci*. 9: 1-13.
- Hedman, H. D., Krawczyk, E., Helmy, Y. A., Zhang, L. y Varga, C. 2021. Host diversity and



- potential transmission pathways of SARS-CoV-2 at the human-animal interface. *Pathogens*. 10(2): 1-28.
- Hernández, M., Abad, D., Eiros, J. M. y Rodríguez-Lázaro, D. 2020. Are Animals a Neglected Transmission Route of SARS-CoV-2? *Pathogens*. 9(6): 480.
- Hobbs, E. C. y Reid, T. J. 2021. Animals and SARS-CoV-2: Species susceptibility and viral transmission in experimental and natural conditions, and the potential implications for community transmission. *Transboundary and Emerging Diseases*. 68(4): 1850-1867.
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P. y Shi, Z.-L. 2020. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*. 19: 1-14.
- INEGI, I. N. d. G. y. E. (2014). México - Encuesta Nacional sobre Uso del Tiempo 2014. México: INEGI Catálogo. Recuperado de <https://www.inegi.org.mx/rnm/index.php/catalog/276/datafile/F2/V1666>.
- Jairak, W., Charoenkul, K., Chamsai, E., Udom, K., Chaiyawong, S., Hangsawek, A., Waenkaew, S., Mungaomklang, A., Tangwangvivat, R. y Amonsin, A. 2022. Survey of SARS-CoV-2 in dogs and cats in high-risk areas during the second wave of COVID-19 outbreak, Thailand. *Zoonoses and Public Health*. 69(6): 737-745.
- Jalali, M., Zaborowska, J. y Jalali, M. 2017. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Academic Press. Boston. 1-18 pp.
- Karamloo, F. y König, R. 2020. SARS-CoV-2 immunogenicity at the crossroads. *Allergy*(7): 1822-1824.
- Kellam, P. y Barclay, W. 2020. The dynamics of humoral immune responses following SARS-CoV-2 infection and the potential for reinfection. *The Journal of general virology*. 101(8): 791-797.
- Kim, H., Seiler, P., Jones, J. C., Ridout, G., Camp, K. P., Fabrizio, T. P., Jeevan, T., Miller, L. A., Throm, R. E. y Ferrara, F. 2020. Antibody Responses to SARS-CoV-2 Antigens in Humans and Animals. *Vaccines*. 8(4): 684.
- Konstantinou, G. N. 2017. *Food Allergens*. SpringerLink. Primera edición. New York. 79-94 pp.
- Krishnamoorthy, S., Swain, B., Verma, R. y Gunthe, S. S. 2020. SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV viruses: an overview of origin, evolution, and genetic variations. *Virus Disease*. 31(4): 411-423.
- Kumar, V., Pruthvishree, B., Pande, T., Sinha, D., Singh, B., Dhama, K. y Malik, Y. S. 2020. SARS-CoV-2 (COVID-19): zoonotic origin and susceptibility of domestic and wild animals. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 14(1): 741-747.
- Lerdsamran, H., Mungaomklang, A., Iamsirithaworn, S., Prasertsopon, J., Prasert, K., Intalapaporn, P., Siriyakorn, N., Wiriyarat, W., Thinpan, N., Sawadpongpan, S., Sirikhetkon, S., Mongkalangoon, N., Petto, S. y Puthavathana, P. 2021. Evaluation of different platforms for the detection of anti-SARS coronavirus-2 antibodies, Thailand. *BMC Infectious Diseases*. 21(1): 1213.
- Leroy, E. M., Gouilh, M. A. y Brugère-Picoux, J. 2020. The risk of SARS-CoV-2 transmission to pets and other wild and domestic animals strongly mandates a one-health strategy to control the COVID-19 pandemic. *One Health*. 10: 1-4.

- Lin, A. V. 2015. *ELISA: Methods and Protocols*. Springer. Primera edición. New York. 51-59 pp.
- Lu, Y., Wang, J., Li, Q., Hu, H., Lu, J. y Chen, Z. 2021. Advances in Neutralization Assays for SARS-CoV-2. *Scandinavian Journal of Immunology*. 94(3): e13088.
- Mak, G. C., Cheng, P. K., Lau, S. S., Wong, K. K., Lau, C., Lam, E. T., Chan, R. C. y Tsang, D. N. 2020. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. *Journal of Clinical Virology*. 129: 104500.
- Mandrekar, J. N. 2010. Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. *Journal of Thoracic Oncology*. 5(9): 1315-1316.
- Mathavarajah, S. y Dellaire, G. 2020. Lions, tigers and kittens too: ACE2 and susceptibility to COVID-19. *Evolution, Medicine, Public Health*. 2020(1): 109-113.
- McFadden, G., Mohamed, M. R., Rahman, M. M. y Bartee, E. 2009. Cytokine determinants of viral tropism. *Nature Reviews Immunology*. 9(9): 645-655.
- McHugo, G. P., Dover, M. J. y MacHugh, D. E. 2019. Unlocking the origins and biology of domestic animals using ancient DNA and paleogenomics. *BMC Biology*. 17(1): 1-20.
- McKibbin, W. y Fernando, R. 2020. *Economics in the Time of COVID-19*. Centre for Economic Policy Research. Primera edición. Londres. 123-128 pp.
- Melgoza-González, E., Hinojosa-Trujillo, D., Resendiz, M., Mata-Haro, V., Hernández-Valenzuela, S., García-Vega, M., Bravo-Parra, M., Valenzuela, O., Velázquez, E. y Soto-Gaxiola, A. 2021. Analysis of IgG, IgA, and IgM antibodies against SARS-CoV-2 spike protein S1 in convalescent and vaccinated patients with the Pfizer-BioNTech and CanSinoBio vaccines. *Transboundary and Emerging Diseases*. 69(4): 1-12.
- Messenger, A. M., Barnes, A. N. y Gray, G. C. 2014. Reverse zoonotic disease transmission (zooanthroponosis): a systematic review of seldom-documented human biological threats to animals. *PLOS ONE*. 9(2): e89055.
- Mohit, E., Rostami, Z. y Vahidi, H. 2021. A comparative review of immunoassays for COVID-19 detection. *Expert Review of Clinical Immunology*. 17(6): 573-599.
- Monto, A. S., Cowling, B. J. y Peiris, J. S. M. 2014. *Coronaviruses*. Springer. Quinta edición. Boston. 199-223 pp.
- Murphy, K., Travers, P. y Walport, M. 2019. *Inmunobiología de Janeway*. McGraw Hill. Séptima edición. México, D.F. 379-385 pp.
- Neira, V., Brito, B., Agüero, B., Berrios, F., Valdés, V., Gutierrez, A., Ariyama, N., Espinoza, P., Retamal, P. y Holmes, E. C. 2021. A household case evidences shorter shedding of SARS-CoV-2 in naturally infected cats compared to their human owners. *Emerging Microbes Infections*. 10(1): 376-383.
- O'Neil, J. 2018. Zoonotic infections from common household pets. *The Journal for Nurse Practitioners*. 14(5): 363-370.
- OIE, O. M. d. l. S. A. (2021). Informe de Seguimiento 4. SARS-CoV-2 en animales. México. París, Francia: OIE World Animal Health Information System. Recuperado de <https://wahis.oie.int/#/report-info?reportId=34006>
- OMS, O. M. d. l. S. (2021). WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Ginebra, Suiza: World

Health Organization. Recuperado de <https://covid19.who.int/>.

- Oz, M. y Lorke, D. E. 2021. Multifunctional Angiotensin Converting Enzyme 2, the SARS-CoV-2 Entry Receptor and Critical Appraisal of its Role in Acute Lung Injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 136: 111193.
- Park, S. E. 2020. Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19). *Pediatric Infection and Vaccine*. 27(1): 1-10.
- Payne, S. 2017a. Family Coronaviridae. *Pharmaceuticals*. 13(12): 149-158.
- Payne, S. 2017b. Methods to Study Viruses. En: M. Haley (Ed.), *Viruses*. Elsevier, Inglaterra, 37-52 pp.
- Pearson, W. 2013. An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. *Curr Protoc Bioinformatics*. 27(1): 311-317.
- Perera, R. A., Ko, R., Tsang, O. T., Hui, D. S., Kwan, M. Y., Brackman, C. J., To, E. M., Yen, H.-l., Leung, K. y Cheng, S. M. 2021. Evaluation of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test for detection of antibody in human, canine, cat, and hamster sera. *Journal of clinical microbiology*. 59(2): e02504-02520.
- Poland, G. A., Ovsyannikova, I. G. y Kennedy, R. B. 2020. SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates. *The Lancet*. 396(10262): 1595-1606.
- RAE, R. A. E. (2014). *Zoonosis*. Madrid España: Diccionario de la Lengua Española. Recuperado de <https://dle.rae.es/compa%C3%B1%C3%ADa>.
- RAE, R. A. E. (2021). *Animal*. Madrid España: Diccionario de la Lengua Española. Recuperado de <https://dle.rae.es/compa%C3%B1%C3%ADa>.
- Ramadan, N. y Shaib, H. 2019. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): A review. *Germs*. 9(1): 35-42.
- Rowntree, L. C., Chua, B. Y., Nicholson, S., Koutsakos, M., Hensen, L., Douros, C., Selva, K., Mordant, F. L., Wong, C. Y. y Habel, J. R. 2021. Robust correlations across six SARS-CoV-2 serology assays detecting distinct antibody features. *Clinical and translational immunology*. 10(3): e1258.
- Sánchez-Montes, S., Ballados-González, G. G., Gamboa-Prieto, J., Cruz-Romero, A., Romero-Salas, D., Pérez-Brígido, C. D., Austria-Ruiz, M. J., Guerrero-Reyes, A., Lammoglia-Villagómez, M. A. y Camacho-Peralta, I. P. 2021. No molecular evidence of SARS-CoV-2 infection in companion animals from Veracruz, Mexico. *Transboundary and Emerging Diseases*. 69(4): 2398-2403.
- Sapkal, G., Shete-Aich, A., Jain, R., Yadav, P. D., Sarkale, P., Lakra, R., Baradkar, S., Deshpande, G. R., Mali, D., Tilekar, B. N., Majumdar, T., Kaushal, H., Gurav, Y., Gupta, N., Mohandas, S., Deshpande, K., Kaduskar, O., Salve, M., Patil, S., Gaikwad, S., Sugunan, A. P., Ashok, M., Giri, S., Shastri, J., Abraham, P. y Gangakhedkar, R. R. 2020. Development of indigenous IgG ELISA for the detection of anti-SARS-CoV-2 IgG. *Indian Journal of Medical Research*. 151(5): 444-449.
- Schmidt, P. L. 2009. Companion animals as sentinels for public health. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 39(2): 241-250.

- Schulz, C., Martina, B., Mirolo, M., Müller, E., Klein, R., Volk, H., Egberink, H., Gonzalez-Hernandez, M., Kaiser, F., von Köckritz-Blickwede, M. y Osterhaus, A. 2021. SARS-CoV-2-Specific Antibodies in Domestic Cats during First COVID-19 Wave, Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 27(12): 3115-3118.
- Scohy, A., Anantharajah, A., Bodéus, M., Kabamba-Mukadi, B., Verroken, A. y Rodriguez-Villalobos, H. 2020. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *Journal of Clinical Virology*. 129: 104455.
- Shah, K. y Maghsoudlou, P. 2016. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British journal of hospital medicine*. 77(7): 98-101.
- Sharma, A., Ahmad Farouk, I. y Lal, S. K. 2021. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses*. 13(2): 1-25.
- Shi, A. y Ren, P. 2021. SARS-CoV-2 serology testing: Progress and challenges. *Journal of Immunological Methods*. 494: 1-6.
- Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L. y Sun, Z. 2020. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*. 368(6494): 1016-1020.
- Sit, T. H. C., Brackman, C. J., Ip, S. M., Tam, K. W. S., Law, P. Y. T., To, E. M. W., Yu, V. Y. T., Sims, L. D., Tsang, D. N. C., Chu, D. K. W., Perera, R. A. P. M., Poon, L. L. M. y Peiris, M. 2020. Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature*. 586(7831): 776-778.
- Stevanovic, V., Tabain, I., Vilibic-Cavlek, T., Mauric Maljkovic, M., Benven, I., Hruskar, Z., Kovac, S., Smit, I., Miletic, G., Hadina, S., Staresina, V., Radin, L., Plichta, V., Skrlin, B., Vrbanc, Z., Brkljacic, M., Cvetnic, M., Habus, J., Martinkovic, K., Zecevic, I., Jurkic, G., Ferencak, I., Stritof, Z., Perharic, M., Bucic, L. y Barbic, L. 2021a. The Emergence of SARS-CoV-2 within the Dog Population in Croatia: Host Factors and Clinical Outcome. *Viruses*. 13(8): 1-13.
- Stevanovic, V., Vilibic-Cavlek, T., Tabain, I., Benven, I., Kovac, S., Hruskar, Z., Mauric, M., Milasincic, L., Antolasic, L., Skrinjaric, A., Staresina, V. y Barbic, L. 2021b. Seroprevalence of SARS-CoV-2 infection among pet animals in Croatia and potential public health impact. *Transboundary and Emerging Diseases*. 68(4): 1767-1773.
- Stout, A. E., André, N. M., Jaimes, J. A., Millet, J. K. y Whittaker, G. R. 2020. Coronaviruses in cats and other companion animals: Where does SARS-CoV-2/COVID-19 fit? *Veterinary Microbiology*. 247: 1-6.
- Temmam, S., Barbarino, A., Maso, D., Behillil, S., Enouf, V., Huon, C., Jaraud, A., Chevallier, L., Backovic, M., Pérot, P., Verwaerde, P., Tired, L., van der Werf, S. y Eloit, M. 2020. Absence of SARS-CoV-2 infection in cats and dogs in close contact with a cluster of COVID-19 patients in a veterinary campus. *One Health*. 10: 1-4.
- Terato, K., Do, C. T., Cutler, D., Waritani, T. y Shionoya, H. 2014. Preventing intense false positive and negative reactions attributed to the principle of ELISA to re-investigate antibody studies in autoimmune diseases. *Journal of Immunological Methods*. 407: 15-25.
- Trevethan, R. 2017. Sensitivity, specificity, and predictive values: foundations, pliabilitys, and pitfalls in research and practice. *Frontiers in Public Health*. 5(307): 1-7.

- Trujillo, J., Sponseller, B., Lohr, C. y Nara, P. 2012. Reverse zoonosis of influenza A virus in companion animals; What it means to veterinary and human medicine. *International Journal of Infectious Diseases*. 16: 158-316.
- Udom, K., Jairak, W., Chamsai, E., Charoenkul, K., Boonyapisitsopa, S., Bunpapong, N., Techakriengkrai, N. y Amonsin, A. 2021. Serological survey of antibodies against SARS-CoV-2 in dogs and cats, Thailand. *Transboundary and Emerging Diseases*. 69(4): 2140-2147.
- Vahey, G. M., Marshall, K. E., McDonald, E., Martin, S. W., Tate, J. E., Midgley, C. M., Killerby, M. E., Kawasaki, B., Herlihy, R. K. y Alden, N. B. 2021. Symptom Profiles and Progression in Hospitalized and Nonhospitalized Patients with Coronavirus Disease, Colorado, USA, 2020. *Emerging Infectious Diseases*. 27(2): 385-395.
- Wacharapluesadee, S., Tan, C. W., Maneeorn, P., Duengkae, P., Zhu, F., Joyjinda, Y., Kaewpom, T., Chia, W. N., Ampoot, W. y Lim, B. L. 2021. Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. *Nature Communications*. 12(1): 1-9.
- Webster, D. M., Henry, A. H. y Rees, A. R. 1994. Antibody-antigen interactions. *Current Opinion in Structural Biology*. 4(1): 123-129.
- Worobey, M. 2021. Dissecting the early COVID-19 cases in Wuhan. *Science*. 374(6572): 1202-1204.
- Yu, A., Pak, A. J., He, P., Monje-Galvan, V., Casalino, L., Gaieb, Z., Dommer, A. C., Amaro, R. E. y Voth, G. A. 2021. A multiscale coarse-grained model of the SARS-CoV-2 virion. *Biophysical Journal*. 120(6): 1097-1104.
- Zeng, L., Li, D., Tong, W., Shi, T. y Ning, B. 2021. Biochemical features and mutations of key proteins in SARS-CoV-2 and their impacts on RNA therapeutics. *Biochemical Pharmacology*. 189: 1-11.
- Zhang, Q., Zhang, H., Gao, J., Huang, K., Yang, Y., Hui, X., He, X., Li, C., Gong, W., Zhang, Y., Zhao, Y., Peng, C., Gao, X., Chen, H., Zou, Z., Shi, Z.-L. y Jin, M. 2020. A serological survey of SARS-CoV-2 in cat in Wuhan. *Emerging Microbes & Infections*. 9(1): 2013-2019.
- Zhao, J., Cui, W. y Tian, B.-p. 2020. The Potential Intermediate Hosts for SARS-CoV-2. *Frontiers in microbiology*. 11: 1-11.
- Zhao, Y., Yang, Y., Gao, J., Huang, K., Hu, C., Hui, X., He, X., Li, C., Gong, W. y Lv, C. 2022. A serological survey of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in dogs in Wuhan. *Transboundary emerging diseases*. 69(2): 591-597.
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B. y Huang, C.-L. 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 579(7798): 270-273.