



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL  
PARA SARS-COV-2 Y ESTUDIO PRELIMINAR DE  
IDENTIFICACION DEL VIRUS EN PERROS Y GATOS DE LA  
REGIÓN METROPOLITANA**

**Felipe Fernando Berríos Oyarzún**

Proyecto de Memoria para optar al  
Título Profesional de Médico  
Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: VICTOR MANUEL NEIRA RAMIREZ  
Universidad de Chile

FINANCIAMIENTO FONDECYT 1211517

SANTIAGO, CHILE  
2022



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL  
PARA SARS-COV-2 Y ESTUDIO PRELIMINAR DE  
IDENTIFICACION DEL VIRUS EN PERROS Y GATOS DE LA  
REGIÓN METROPOLITANA**

**Felipe Fernando Berríos Oyarzún**

Proyecto de Memoria para optar al  
Título Profesional de Médico  
Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

Nota Final: .....

Profesor Guía: Víctor Neira R. ....  
Profesor Corrector: José Pizarro L. ....  
Profesor Corrector: Patricio Retamal M. ....

FINANCIAMIENTO FONDECYT 1211517

SANTIAGO, CHILE  
2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Mis más sinceros agradecimientos a los que me acompañaron en este periodo, en especial a mi familia y Belén, si no fuera por ellos, no habría llegado tan lejos. A mis compañeros de laboratorio que siempre estuvieron ahí para ayudarme y a mi profesor guía que siempre estuvo presente.

## INDICE

AGRADECIMIENTOS .....	2
RESUMEN .....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	8
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
Estandarización del PCR en tiempo real.....	12
Identificación de SARS-CoV-2 en mascotas.....	13
RESULTADOS .....	15
Estandarización del PCR en tiempo real.....	15
Identificación de SARS-CoV-2 en mascotas.....	17
DISCUSIÓN .....	21
CONCLUSIÓN.....	24
ANEXOS .....	25
Anexo 1, Certificado de bioseguridad .....	25
Anexo 2, Certificado CICUA .....	26
Anexo 3, Consentimiento Informado.....	27
BIBLIOGRAFÍA .....	30



## **RESUMEN**

La infección por SARS-CoV-2, causante de la pandemia de COVID-19 sigue activa causando millones de muertes en todo el mundo. Su origen es aún controversial, sin embargo, se reconoce como una zoonosis, es decir tiene un origen animal aún no determinado. Durante el año 2020 se detectaron casos de infección en caninos y felinos domésticos, lo que insta a la investigación en su rol como hospederos intermediarios. La presente investigación estandarizó una técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección de SARS-CoV-2, para luego, en una escala piloto, evaluar dicha técnica en muestras de mascotas de hogares con personas infectadas. La técnica fue estandarizada con controles sintéticos (plásmido) y con muestras de RNA humanas confirmadas como positivas. Posteriormente, se evaluaron 25 animales provenientes de 11 hogares, correspondiendo a 9 caninos y 16 felinos. Se detectaron 3 felinos infectados, 2 hembras y 1 macho, todos pertenecientes al mismo hogar, sin signos clínicos aparentes. No se observaron otros animales positivos. Los menores valores de Ct observados fueron 21,9 para hisopo nasal y 31,2 en las heces. Los gatos positivos fueron seguidos en el tiempo hasta hacerse negativos como grupo. Ellos presentaron el virus en un periodo entre 6 a 21 días, con un promedio de 15 días, menor que el reportado para sus dueños. Futuras investigaciones son requeridas para dilucidar la relevancia de los gatos y otras mascotas en la mantención y diseminación de SARS-CoV-2.

**Palabras clave:** SARS-CoV-2, zoonosis, felinos, RT-PCR, pandemia

## **ABSTRACT**

The SARS-CoV-2 infection, which causes the ongoing COVID-19 pandemic, is causing millions of deaths worldwide. Its origin is still controversial; however, it is recognized as a zoonosis, with an animal origin, which is not determined yet. During the year 2020, cases of infection of SARS-CoV-2 were identified in domestic canines and felines, which urges investigation into their role as intermediate hosts. The objective of this research was to standardize a real-time RT-PCR technique for the detection of SARS-CoV-2, and then, on a pilot scale, evaluate the said technique in samples of pets from households with infected people. The technique was standardized with synthetic controls (plasmid) and with human RNA samples confirmed as positive. Subsequently, animal samples from 11 households were evaluated, corresponding to 9 canines and 16 felines. Three infected felines were detected, 2 females and 1 male, all belonging to the same household. No apparent clinical signs were observed. No other positive animals were observed. The lowest Ct values observed were 21.9 for nasal swabs and 31.2 for feces. Positive cats were followed up over time to become negative as a group. They presented the virus in a period between 6 to 21 days, with an average of 15 days, less than that reported for their owners. Future research is required to elucidate the relevance of cats and other pets in the maintenance and spread of SARS-CoV-2.

**Keyword:** SARS-CoV-2, zoonosis, felines, RT-PCR, pandemic

## **INTRODUCCIÓN**

La relevancia de las enfermedades zoonóticas ha ido en aumento en los últimos años, siendo estas las responsables de aproximadamente el 75% de las nuevas enfermedades que afectan humanos (Blancou *et al.*, 2005). Recientemente, en diciembre de 2019, se detectó un nuevo coronavirus de origen animal, llamado Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (en inglés, SARS-CoV-2), que provoca el cuadro clínico COVID-19 el cual se ha distribuido mundialmente.

La enfermedad se caracteriza por presentar fiebre (> 90% de los casos), malestar, infiltrados pulmonares al efectuar radiografía de tórax, tos seca (80%), disnea (20%) y dificultad respiratoria (15%) (Cortés, 2020). Actualmente este virus se está posicionando como la mayor pandemia mundial de la última década, cobrando más de 5,5 millones vidas al 16 de Enero de 2022. El costo de esta pandemia ha alcanzado cifras alarmantes a nivel mundial, provocando el cierre fronteras y afectando la estabilidad económica y social de todos los países alrededor del mundo.

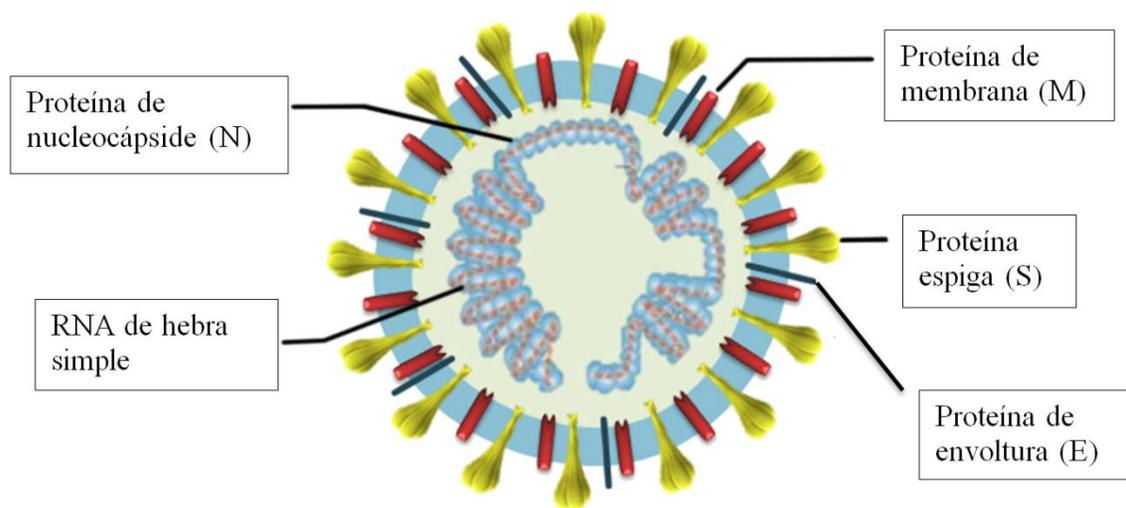
Siendo este un tema en actual investigación, y considerando que es un virus que proviene de animales, es imperiosa la necesidad de investigar el comportamiento de este en distintas especies, que podrían actuar como reservorios o vectores, dificultando el control de la enfermedad. Actualmente existen escasos reportes a nivel mundial al respecto, destacando algunas detecciones del virus en animales de compañía, cuyo estudio merece mayor atención para dilucidar si éstos forman o no parte de la cadena de diseminación de la enfermedad. Por lo tanto, esta investigación busca detectar el virus SARS-CoV-2 en animales de compañía dentro de núcleos familiares positivos a la enfermedad.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los coronavirus (CoV) son virus ARN envueltos de cadena simple, que muestran una plasticidad genética excepcional impulsada por la acumulación de mutaciones puntuales y eventos de recombinación. Esta variación genética es responsable de la aparición constante de cepas virales con mayor virulencia, diferente tropismo tisular y/o amplio rango de huéspedes (Decaro *et al.*, 2020). Los coronavirus se clasifican actualmente en cuatro géneros, *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*, que reconocen a los murciélagos, aves y roedores como reservorios naturales (Decaro *et al.*, 2020). Respecto a los *Betacoronavirus*, dos de ellos han sido de gran interés para la comunidad científica y la salud mundial en los últimos diecisiete años: los causantes de Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-1) y Síndrome Respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV) (Cortés, 2020), actualmente se suma a estos el novel SARS-CoV-2, todos causantes de enfermedad respiratoria en humanos.

A finales de diciembre 2019, un caso de neumonía no identificada fue reportado en Wuhan, provincia de Hubei, República Popular de China. Sus características clínicas fueron muy similares a las de neumonía viral. Después del análisis de muestras respiratorias, los expertos del “*Centers for Disease Control and Prevention*” (CDC) declararon que la neumonía, más tarde conocida como Nueva neumonía por coronavirus (NCP) fue causada por un coronavirus nuevo (Wang *et al.*, 2020). El nuevo coronavirus (NCov-19), ahora nombrado SARS-CoV-2, es un patógeno que causa una infección emergente que incrementa rápidamente en incidencia y rango geográfico. La OMS declara la enfermedad por infección de NCOV-19 (COVID-19) una emergencia de salud pública de preocupación internacional el 20 de enero de 2020, y posteriormente, el 11 de marzo de 2020, la declara una Pandemia Global (Mani Mishra *et al.*, 2020).

Pertenece al subgénero *Sarbecovirus* de la familia *Coronaviridae*, tanto el SARS-CoV como el SARS-CoV-2 son cepas de la misma especie viral denominada Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus. El genoma de los coronavirus es un ARN monocatenario compuesto de aproximadamente 30 kb de nucleótidos. El SARS-CoV-2 codifica al menos cuatro proteínas estructurales principales, siendo estas la proteína espiga (S), la proteína de membrana (M), la proteína de envoltura (E) y la proteína de la nucleocápside (N). La proteína S, siendo una glicoproteína tipo I, sobresale de la superficie del virus y puede contactar a la célula huésped mucho antes. La proteína S ha atraído gran atención debido a su función de unión al receptor (Astuti y Ysrafil, 2020). La especificidad de la interacción entre el virus y el receptor determina el tropismo y el rango del hospedero. Se presume que el origen del SARS-CoV-2 es el murciélago. Sin embargo, el hospedero intermedio no está claro, y algunos estudios sugieren que el pangolín estaría involucrado en la evolución del SARS-CoV-2. Aún no está claro qué mamíferos están involucrados en la evolución del SARS-CoV-2 y qué animales pueden ser infectados (Luan *et al.*, 2020).



**Figura 1:** Estructura de SARS-CoV-2 (Adaptada de Astuti y Ysrafil, 2020).

La aparición de tres coronavirus altamente patógenos de origen zoonótico en menos de dos décadas destaca el papel de los animales en la generación de coronavirus con mayor virulencia que pueden adaptarse a los humanos, causando epidemias (y eventualmente

pandemias) con alto impacto en salud humana. De hecho, las infecciones por CoV de interés veterinario se conocen desde hace casi un siglo, por lo que los CoV animales son paradigmáticos de cómo evoluciona esta gran familia de virus, generando cepas con diferentes propiedades biológicas (Decaro & Lorusso, 2020). Las características epidemiológicas, biológicas y virológicas de los coronavirus, particularmente su demostrada habilidad para fácilmente cruzar barreras entre especies sugiere que la contaminación de las mascotas desde dueños infectados no solo es posible, sino esperable, dado las numerosas oportunidades de contagio en una pandemia (Leroy *et al.*, 2020).

En la actualidad existen pocos reportes, aunque en aumento, sobre la detección y comportamiento de SARS-CoV-2 en distintos animales. Un reporte importante es el que indica Jianzhong *et al.*, (2020), quienes, al inocular intranasalmente distintas especies, reportan que los hurones y los gatos son altamente susceptibles, perros tienen susceptibilidad baja y cerdos, gallinas y patos no son susceptibles al virus. Por otro lado, casos clínicos de animales naturalmente infectados con SARS-CoV-2 han sido reportados desde distintos países alrededor del mundo. Según la “*American Veterinary Medical Association*” (AVMA), desde el año 2020, se han recibido múltiples reportes de animales naturalmente infectados, en los cuales se incluye diversas especies destacándose las que están en estrecho contacto con humanos. Dentro de estos, los felinos representan el mayor número de casos, estando en 126 de los 210 casos reportados a la AVMA hasta la fecha. Estos reportes no se limitan solo a animales de compañía pues se ha detectado el virus en felinos silvestres en confinamiento.

En nuestro país, según los últimos datos publicados por el Ministerio de Salud a través del Reporte Diario el día 16 de Enero de 2022, tenemos > 1.8 millones de casos de enfermos totales por SARS-CoV-2, causando más de 39 mil muertes (MINSAL, 2022).

Tras lo expuesto, este trabajo tiene por objetivo implementar una técnica de PCR en tiempo real para la detección de virus SARS-CoV-2 en mascotas y posteriormente realizar una prueba piloto de detección del virus en mascotas de hogares que presentan al menos un humano positivo al virus dentro de su círculo familiar.

## **OBJETIVO GENERAL**

Implementar una técnica de PCR en tiempo real para la identificación de virus SARS-CoV-2 y determinar su presencia en mascotas provenientes de familias positivas a SARS-CoV-2 en una escala piloto.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Implementar la técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección del virus SARS-CoV-2
2. Determinar la presencia del virus en perros y gatos provenientes de familias con al menos una persona confirmada positiva a SARS-CoV-2.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Todo el personal durante las actividades de muestreo utilizó equipo de protección personal. El trabajo de laboratorio se realizó en un gabinete de clase BSL2. Todos los procedimientos se hicieron de acuerdo con el Comité Institucional de Bioseguridad (Anexo 1). Los experimentos y el muestreo se fueron hechos con los materiales adecuados, siguiendo las recomendaciones generales para el bienestar animal proporcionadas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile (Anexo 2).

### **Estandarización del PCR en tiempo real**

Para lograr la implementación del PCR en tiempo real, se utilizó el método descrito por Chu *et al.* 2020, que consiste en un PCR con sonda Taqman para la identificación de una porción del gen ORF1b, altamente conservado en los *Sarbecovirus*, y, por lo tanto, presente en el virus SARS-CoV-2. Comúnmente este protocolo es conocido como HKU-ORF1b de Hong Kong. Las secuencias para los partidores y la sonda que fueron utilizadas para la detección del gen ORF1b corresponden a: 5'-TGGGGYTTTACRGGTAACCT-3' (Forward; Y = C/T, R = A/G), 5'-AACRCGCTTAACAAAGCACTC-3' (Reverse; R = A/G) y 5'-TAGTTGTGATGCWATCATGACTAG-3' (Sonda; W = A/T). Se siguieron las condiciones descritas en el protocolo usando el kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (ThermoFisher Scientific ®) en un termociclador Biorad CFX96.

El RNA fue sometido al PCR en tiempo real, utilizando un MasterMix con las recomendaciones del kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR, en un volumen total de 25 uL para cada muestra. El protocolo del termociclador utilizado se indica en la tabla 1.

**Tabla 1:** Protocolo de termociclado para RT-PCR de SARS-CoV-2.

Pasos/ Ciclos/ Objetivo	Temperatura	Tiempo
Paso 1, 1 ciclo, paso RT	45°C	10 minutos
Paso 2, 1 ciclo, Inactivación RT/ desnaturalización inicial	95°C	10 minutos
Paso 3, amplificación 40 ciclos, desnaturalización	95°C	15 segundos
Paso 3, reconocimiento, alineamiento, 40 ciclos	60°C	45 segundos

Con el fin de implementar la técnica de RT-PCR en tiempo real, se diluyó el plásmido ORFb1 en base 10 con agua libre de nucleasas. Además, se incluyó un control de RNA positivo a SARS-CoV-2 de un paciente humano confirmado. Ambos controles fueron amablemente facilitados por el Dr. Rafael Medina, académico de la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC).

Una vez evidenciada la detección de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en tiempo real usando los diferentes controles, se procedió a detectar el virus en mascotas provenientes de familias positivas a SARS-CoV-2 en una escala piloto.

### **Identificación de SARS-CoV-2 en mascotas**

Se realizó un estudio preliminar de detección del virus desde mascotas en contacto con humanos positivos a SARS-CoV-2. El requisito para considerar el hogar como parte de este estudio fue que el grupo familiar esté compuesto por al menos un médico veterinario encargado de tomar muestras a sus mascotas, puesto que la toma de muestras fue realizada durante la cuarentena. Los médicos veterinarios fueron reclutados a través de la difusión de este proyecto en Clínicas Veterinarias, además de contactos personales. El Laboratorio de Virología Animal proveyó los materiales de toma de muestra necesarios, además de los Elementos de Protección Personal (EPP), y gestionó el retiro de estas muestras, que fueron trasladadas hasta el laboratorio de Virología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias

y Pecuarias de la Universidad de Chile, cumpliendo el protocolo de bioseguridad propuesto por la Pan American Health Organization (PAHO, 2020).

Un total de 25 animales formaron parte de este estudio, con los correspondientes consentimientos informados firmados por los dueños o tutores de las mascotas, autorizando la toma de muestra y su uso en este estudio (Anexo 3). Las muestras obtenidas fueron hisopos nasales y/o heces frescas de cada mascota. Las muestras fueron refrigeradas y transportadas al Laboratorio de Virología Animal hasta su procesamiento.

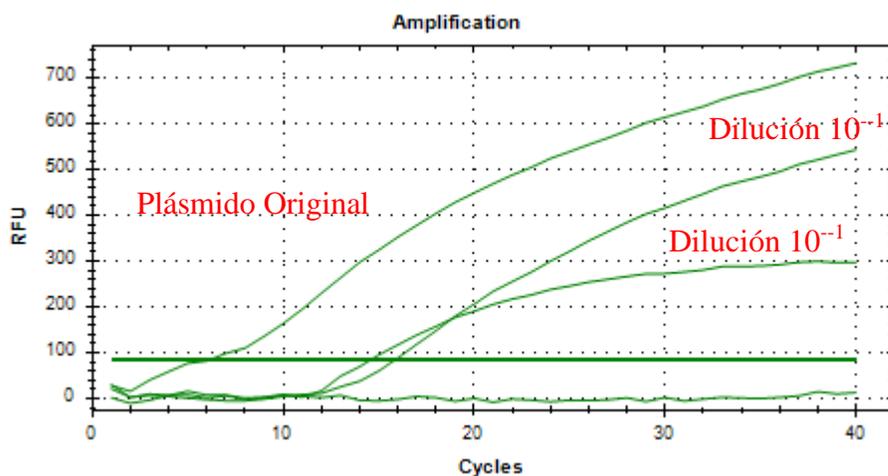
Brevemente, las muestras se sometieron a extracción de RNA utilizando una Solución de Chomczynski con Fenol (Winkler LTDA.) según las instrucciones del fabricante. Se utilizó una alícuota de 250uL para cada una de las muestras y se mezcló con 750 uL de Chomczynski en tubos Eppendorf; agregando un control de extracción (agua libre de nucleasas 250 uL en 750 uL de Chomczynski) en cada extracción realizada, como control negativo. El RNA se purifica en tres pasos: un paso de lisis celular y homogenización con la Solución de Chomczynski con Fenol; adición de Cloroformo, el cual produce la formación de dos fases, una acuosa, que contiene el RNA, y una orgánica, que contiene el DNA y las proteínas; y un último paso de precipitación con Alcohol iso-Propílico (Winkler LTDA, 1985).

El producto final, que corresponde a RNA de la muestra, fue diluido en 50 uL de agua libre de nucleasas en un microtubo, para luego proceder con el protocolo de PCR previamente estandarizado. Las muestras se consideraron positivas si presentaban un Ct menor a 40.

## RESULTADOS

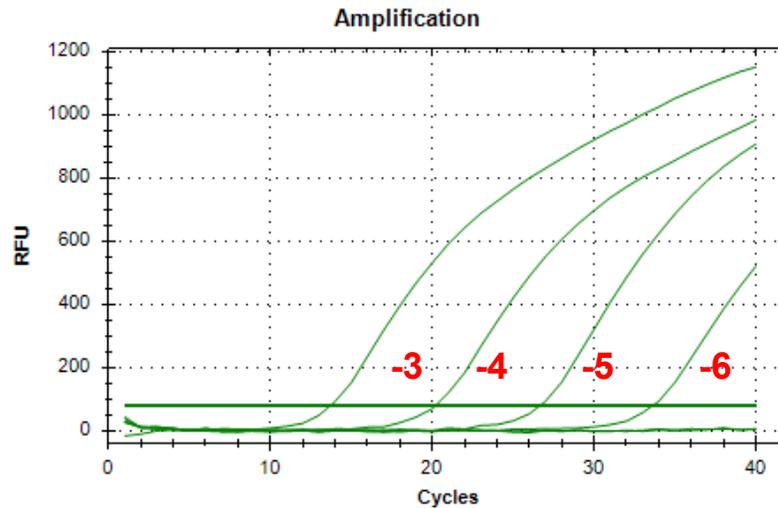
### Estandarización del PCR en tiempo real

En primer lugar, se realizó un ensayo de RT-PCR en tiempo real usando el plásmido ORFb1 original y la primera dilución ( $10^{-1}$ ) por duplicado. Las curvas de amplificación de esta reacción reportaron valores de Ct 5, Ct 14,5 y Ct 15 para el plásmido concretado y las dos diluciones, respectivamente (Figura 2). Estos resultados confirmaron la correcta identificación de la técnica, aunque los valores de Ct fueron muy altos. Por lo cual fue necesario realizar diluciones seriadas.



**Figura 2:** Curvas de amplificación de plásmido gen ORFb1 para SARS-CoV-2 y su dilución ( $10^{-1}$ ) por duplicado.

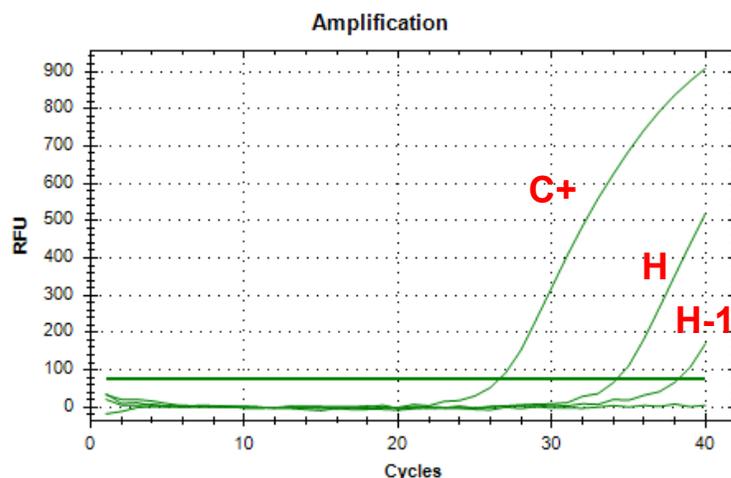
La segunda reacción de RT-PCR en tiempo real usando diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  del plásmido, reportó valores de Ct de 13,6; 20,1; 26,5 y 33,5 (Figura 3).



**Figura 3:** Curvas de amplificación de diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  del plásmido gen ORFb1 para SARS-CoV-2.

Luego se realizó una reacción de RT-PCR en tiempo real usando la dilución  $10^{-5}$  del plásmido y la muestra de control humano más una dilución  $10^{-1}$  de esta misma muestra. La dilución  $10^{-5}$  con un Ct de 26,5 fue seleccionada debido a que una muestra con un Ct más alto tiene riesgo de dar un resultado negativo y, por otro lado, un Ct más bajo aumenta el riesgo de contaminar las muestras adyacentes ante la manipulación de los microtubos usados en el termociclador.

Esta reacción reportó un Ct 26,5 para el control positivo ( $10^{-5}$  del plásmido), Ct 34,5 para la muestra de humano y Ct 38,3 para su dilución  $10^{-1}$ (Figura 4), lo que permite considerar la implementación del protocolo como exitosa.



**Figura 4:** Curvas de amplificación protocolo RT-PCR SARS-CoV-2 en muestra humano (H), muestra humana dilución  $10^{-1}$  (H-1) y control positivo (C+) y negativo.

#### Identificación de SARS-CoV-2 en mascotas

En total se logró obtener muestras de 11 hogares incluyendo 25 diferentes animales. En detalle, se muestrearon 16 gatos y 9 perros, obteniéndose 189 muestras totales. El detalle de los hogares muestreados y los resultados generales se encuentra en la tabla 2.

Como se puede apreciar en la tabla 2, solo en uno de los hogares se obtuvieron animales positivos, esto corresponde al 9,1% de los hogares muestreados. Además, de los 25 animales muestreados en este estudio preliminar, solo 1 (correspondientes al hogar 1) resultó positivo al RT-PCR en tiempo real en la primera detección. El gato positivo correspondía a un macho, el cual convivía con dos hembras que en una primera detección resultaron negativas; sin embargo, debido a la sospecha se muestrearon en una siguiente ocasión en la cual resultaron positivas.

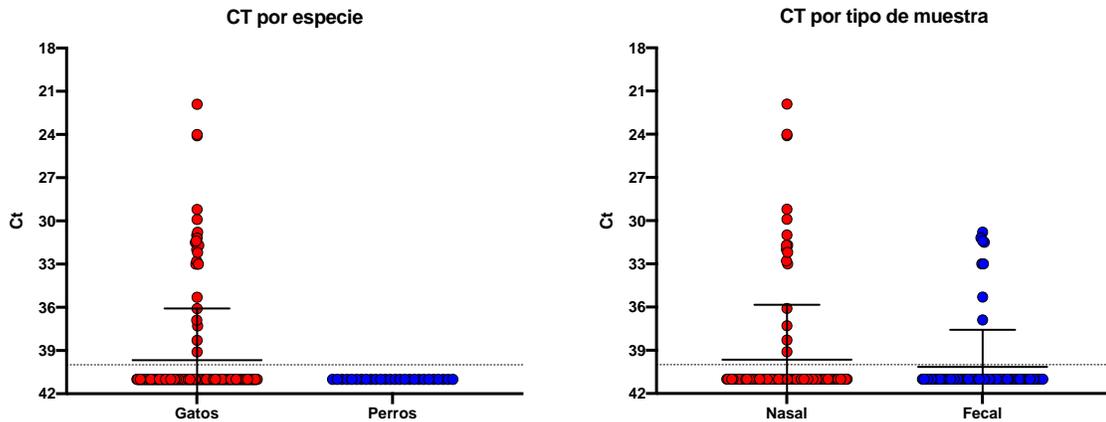
Finalmente, los tres gatos fueron positivos siendo el 12% del total de los animales muestreados. Los tres animales positivos eran todos gatos, en detalle, un macho (gato 1) y dos hembras (gato 2 y 3). Se tomó la decisión de realizar un seguimiento de los casos positivos, tomando muestras seriadas de hisopos nasales y heces cada 2 días durante 40 días, sumando un total de 82 muestras (50 tómulas nasales y 32 muestras de heces). Todos los resultados del estudio se encuentran en anexo 4.

**Tabla 2.** Resultado de RT-PCR SARS-CoV-2 al total de muestras analizadas.

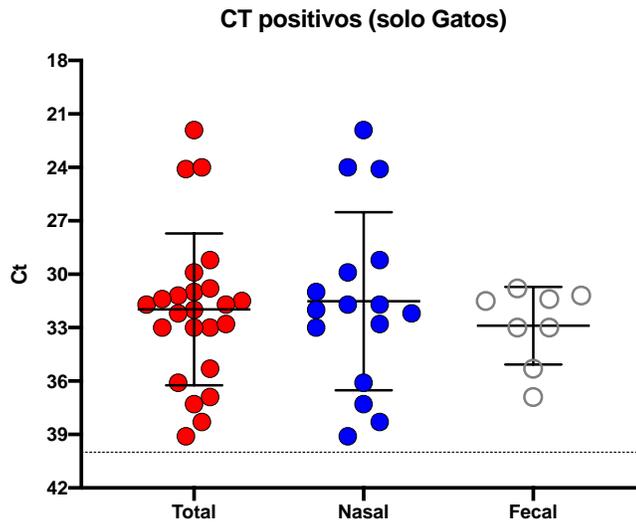
Hogar	Animal	RT-PCR
Hogar 1	Gato 1	Positivo
	Gato 2	Positivo
	Gato 3	Positivo
Hogar 2	Gato 4	Negativo
	Gato 5	Negativo
	Gato 6	Negativo
	Perro 1	Negativo
	Perro 2	Negativo
Hogar 3	Gato 7	Negativo
	Perro 3	Negativo
	Perro 4	Negativo
Hogar 4	Perro 5	Negativo
Hogar 5	Perro 6	Negativo
Hogar 6	Gato 8	Negativo
	Gato 9	Negativo
Hogar 7	Gato 10	Negativo
Hogar 8	Gato 11	Negativo
	Gato 12	Negativo
	Gato 13	Negativo
Hogar 9	Gato 14	Negativo
	Gato 15	Negativo
Hogar 10	Perro 7	Negativo
Hogar 11	Gato 16	Negativo
	Perro 8	Negativo
	Perro 9	Negativo

Sumando todas las muestras, 24 de ellas fueron positivas, que correspondió a un 13%. La figura 5 muestra los valores de Ct de todos los RT-PCR en tiempo real realizados, con el fin de evidenciar la distribución de Ct de acuerdo con la especie muestreada y el tipo de muestra. La figura 6 grafica solo los resultados positivos. Sin considerar las muestras negativas, el promedio de Ct de las muestras de gatos fue de 31,9. Por otra parte, los promedios de las muestras positivas de hisopos nasales fue 31,5 y para las heces fue 32,8.

El menor Ct encontrado fue de 21,9 obtenida desde un hisopo nasal, mientras que, en las heces, el menor Ct encontrado fue de 31,2.



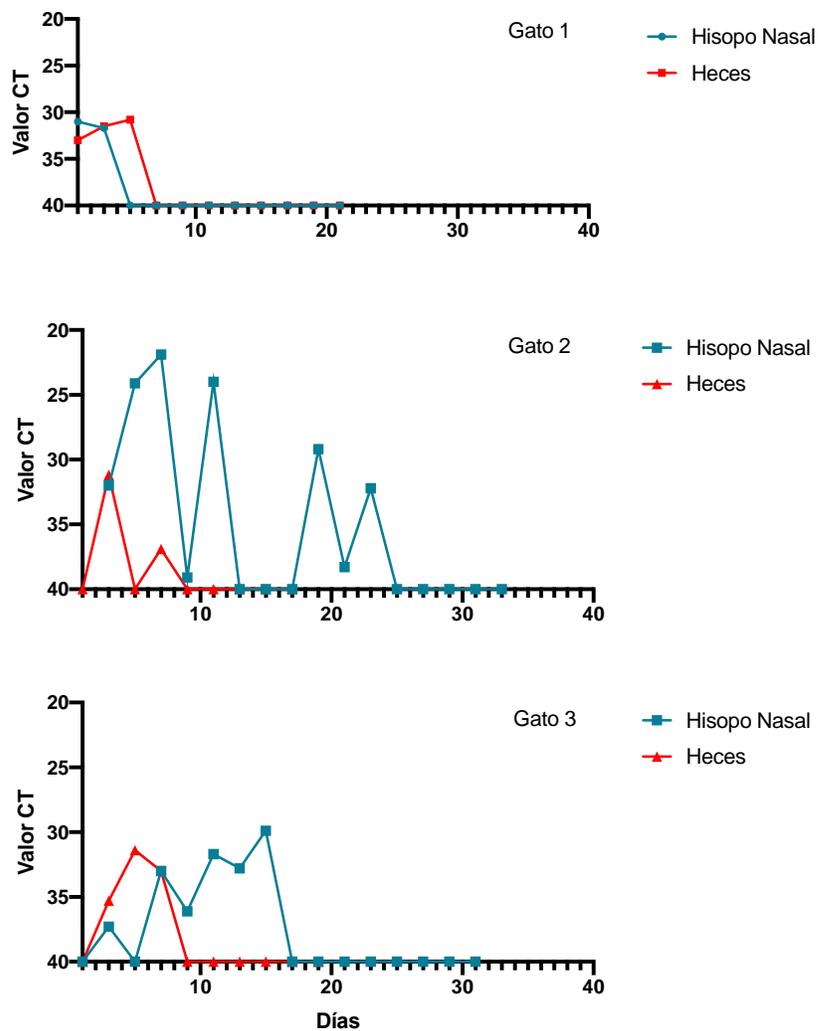
**Figura 5.** Distribución de resultados de RT-PCR SARS-CoV-2, separados en Ct por especie y por tipo de muestra (se incluye promedio y desviación estándar de cada grupo evaluado).



**Figura 6.** Distribución de resultados de RT-PCR SARS-CoV-2 incluyendo solo muestras positivas, proveniente de 3 gatos (se incluye promedio y desviación estándar de cada grupo evaluado).

Posteriormente, se analizaron los tres casos positivos individualmente considerando el seguimiento de cada caso, lo que se puede observar en la figura 6. Los tres animales tuvieron resultados positivos para ambos tipos de muestra, con al menos dos muestras positivas de cada una. El gato 1 se mantuvo positivo durante 6 días. Posterior a esto, todas las muestras tomadas resultaron negativas, el seguimiento con toma de muestras fue de 21 días para este individuo. Para el gato 2 se obtuvieron muestras positivas durante 24 días, mientras que su

seguimiento fue de 33 días. Para el gato 3, se encontraron muestras positivas durante 17 días, con un seguimiento de 31 días.



**Figura 6.** Resultado de Ct en el seguimiento de Gatos positivos a SARS-CoV-2.

## DISCUSIÓN

La presente memoria tuvo como objetivo implementar una técnica de PCR en tiempo real para la identificación de virus SARS-CoV-2 y mediante un estudio piloto determinar su presencia en mascotas provenientes de familias positivas.

Los resultados indican la detección efectiva del virus, la cual fue estandarizada usando controles sintéticos (plásmido), así como una muestra de RNA de un paciente humano confirmado y secuenciado. Posteriormente, se analizaron 189 muestras provenientes de 25 animales, 16 gatos y 9 perros.

Respecto a la estandarización de la prueba de RT-PCR en tiempo real, se debe mencionar que existen numerosos protocolos para la detección de SARS-CoV-2 a nivel mundial considerando distintos métodos. Entre ellos, los más utilizados son mediante el método SYBR-Green y mediante sondas fluorescentes del método Taqman. En este estudio estandarizamos con éxito el protocolo HKU-ORF1b Hong Kong para la detección de SARS-CoV-2. Cabe destacar que este es uno de los métodos publicados por la organización mundial de la salud para detectar el virus.

Estudios previos han demostrado que el método Taqman sigue siendo más sensible y específico que SYBR-Green. Pereira-Gomez *et al*, 2021, indica que para cualquier real time PCR el método Taqman en comparación a SYBR-Green es levemente más sensible y no presenta el riesgo de presentar falsos positivos debido a la fluorescencia inespecífica ni la necesidad de minimizar este mismo riesgo mediante el análisis de la curva de fusión. Es, por tanto, a pesar de presentar un costo mayor, una técnica más confiable que su rival.

A fines del 2020, Jung y colaboradores realizaron un estudio para determinar la eficacia de varios set de primers y sondas usadas a nivel mundial publicadas por la WHO, entre las cuales se incluyen los usados en esta memoria. Ellos concluyeron que no existe reacción cruzada entre SARS-CoV-2 y otros coronavirus previamente mencionados. Por otra parte, Khan y Cheung, 2020 evaluaron 27 protocolos de PCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2 usando cerca de 17 mil secuencias del virus y demostraron que la técnica estandarizada, si bien presentó *mismatches* en cerca del 0.2% de las secuencias, y según declara el autor la

técnica es capaz de detectar todos esos aislados. De todas formas, las técnicas de PCR siempre deben estar en constante evaluación.

La técnica montada fue capaz de detectar efectivamente SARS-CoV-2 en animales de un hogar positivo lo cual cumple con el objetivo del estudio. Además, mediante el seguimiento de los 3 animales positivos fue posible detectar constantemente el virus tanto en muestras nasales como en fecales.

A nivel mundial, existen varios reportes de infección por este virus en distintos animales. Al detectar como positivos sólo gatos en esta investigación, la discusión será realizada respecto a esta especie.

Estudios experimentales han reportado susceptibilidad a infección por SARS-CoV-2 en distintos animales, indicando que este virus puede replicar eficientemente en gatos y que los gatos jóvenes son más vulnerables que los viejos. Además, los perros son menos susceptibles al virus en comparación a los gatos (Gaudreault *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2020), lo cual discrepa de lo dicho por Ma y Gong, 2021, mediante un estudio de homología de modelos de la Enzima Convertidora de Angiotensina 2 (ACE2), receptor de la glicoproteína spike (S), donde reportan que existen diferencias entre la interfaz de residuos de S-ACE2. Estas diferencias podrían resultar en variaciones en la afinidad de la proteína S de SARS-CoV-2, indicando que la afinidad por ACE2 de los gatos menor que para los perros. Esta discrepancia se debe, probablemente, a que la afinidad por la ACE2 no es el único factor a tener en cuenta para la infección viral.

Michelitsch *et al* 2021, en un estudio de seroprevalencia reportaron un 0.65% de positividad en muestras felinas en un estudio en Alemania en septiembre de 2020, y un alza en la prevalencia a 1.36% en febrero 2021 indica una transmisión continua entre especie que ocurre entre los dueños infectados y sus gatos.

Más recientemente, Fuentealba y colaboradores, en 2021 llevaron a cabo un estudio de infección natural en el cual fueron evaluados 18 gatos y 20 perros durante el periodo de cuarentena de sus dueños que habían sido diagnosticados positivos a SARS-CoV-2 en Argentina. Los resultados reportados indican 1 gato hembra de 1,5 años positivo al PCR, quien fue muestreado el día 05-septiembre-2020, mientras que sus dueños fueron

diagnosticados los días 25 y 28 de agosto de 2020 al día 11-09-2020, el animal se reporta negativo al PCR. Los resultados indicados se alinean con lo obtenido en este estudio, coinciden en un nivel de positividad bajo, pero presente, viéndose afectado un felino joven y ningún canino de los evaluados.

Se ha reportado que las infecciones naturales en felinos domésticos se presentan de manera asintomática (Barrs *et al.*, 2020). Similarmente, estudios experimentales han demostrado que los gatos inoculados se mantienen sin signos clínicos (Gaudreault *et al.*, 2020); sin embargo, algunos casos se han descrito de felinos domésticos sintomáticos a SARS-CoV-2, uno de ellos en Bélgica, de un felino hembra de 15 años con síndrome respiratorio agudo, quien se recuperó completamente en 2 semanas y cuyo dueño fue diagnosticado positivo a COVID-19 (Garigliany *et al* 2020); otro caso reportado es el caso de un felino domestico con dificultad respiratoria severa y trombocitopenia que vivía con una familia donde varios miembros sufrieron de COVID-19. Se concluyó que el animal padecía de una infección por SARS-CoV-2 subclínica concomitante con una cardiomiopatía no relacionada que terminó en eutanasia (Segalés *et al*, 2020), y por último Natale *et al*, 2021 describe el caso de un gato de interior (*indoor*) con síntomas respiratorios y síndrome gastrointestinal posterior al diagnóstico de COVID-19 de sus dueños. Se tomaron radiografías del tórax, indicando una bronconeumonía y test sanguíneos indicativos de un proceso inflamatorio leve. Se analizaron muestras de tórculas nasales y orofaríngeas, dando un resultado positivo a RT-qPCR para SARS-CoV-2 14 días posterior a la infección de sus dueños. Es entonces imperante promover la investigación con el fin de dilucidar si los gatos infectados asintomáticos pueden actuar como hospederos intermediarios silenciosos de SARS-CoV-2 (Fuentealba, 2021), y definir los factores que derivan en gatos domésticos sintomáticos a este virus, tales como comorbilidades, sexo y edad para establecer el real riesgo e implicancia que suponen los felinos domésticos en el contexto de esta pandemia.

Este estudio reporta 3 felinos domésticos positivos a SARS-CoV-2 de forma casi simultánea a dos humanos parte del hogar, sin embargo, las limitaciones metodológicas del estudio no permiten establecer si efectivamente el caso es debido a una infección humano-animal. Más estudios son necesarios para dilucidar este importante punto. Los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de transmisión entre gatos de un mismo hogar debido a que los

animales diagnosticados en este estudio tuvieron contacto directo entre ellos, y existe un retraso de 4 días en los gatos 2 y 3 diagnosticados positivos a SARS-CoV-2 comparado al gato 1. La transmisión este virus en gatos puede ser por medio de gotas o aerosoles, consistente con lo reportado por Shi *et al.*, 2020 quienes describen experimentalmente el contagio entre gatos inoculados y susceptibles. Los resultados obtenidos también indican positividad a SARS-CoV-2 en muestras de tórulas nasales entre el día 5 y 17, y en muestras de heces entre los días 4 y 10 para los tres gatos, en acuerdo a lo reportado por otros autores para infecciones naturales en esta misma especie, que indican que el RNA viral puede persistir por aproximadamente 10-11 días en tórulas nasales (Barrs *et al.*, 2020; Garigliany *et al.*, 2020; Sailleau *et al.*, 2020). Esta información sirve para apoyar la idea de evitar el contacto cercano con animales de compañía cuando existe la sospecha de infección por SARS-CoV-2 en algún miembro de la familia.

Considerando los datos obtenidos y las limitaciones de este estudio, se destaca la necesidad de abordar la relación SARS-CoV-2 humano – animal en estudios posteriores de manera sistemática y ampliada, considerando otras metodologías como estudios serológicos y de secuenciación, con el fin de colaborar en la comprensión y contención de la actual pandemia.

## **CONCLUSIÓN**

La estandarización del protocolo presentado es una herramienta importante para el apoyo desde las ciencias veterinarias a la pandemia humana actual. En este estudio fue posible confirmar la infección de SARS-CoV-2 en gatos domésticos de un hogar, lo cual coincide con los reportes esporádicos de infecciones desde humanos a animales, cuyo número se encuentra en aumento. Este estudio preliminar muestra la pertinencia de abordar de manera más generalizada y profunda el estudio del impacto de SARS-CoV-2 en los animales domésticos y el rol que tienen o tendrán éstos en el futuro de la enfermedad, destacando la importancia del enfoque “una salud” para el manejo y entendimiento y contención de la actual pandemia.

## ANEXOS

### Anexo 1, Certificado de bioseguridad



#### CERTIFICADO N° 161

Santiago, 19 de mayo 2020.-

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado la memoria de título "Los animales de compañía serán parte de la cadena de transmisión de SARS-CoV2 (COVID-19)?", del estudiante Sr. Felipe Fernando Berrios Oyarzún, cuyo profesor guía es el Dr. Víctor Neira Ramirez, académico del Departamento de Medicina Preventiva Animal, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

La evaluación del citado proyecto permite acreditar que las normas de bioseguridad que se encuentran descritas en el mismo y en el formulario de solicitud de certificados de bioseguridad de FAVET, son las adecuadas según las especificaciones contenidas en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)" y en el "Manual de Bioseguridad de Conicyt" (versión 2008), que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.

Dra. Lisette Lapierré A

Coordinadora (s)  
Comité de Bioseguridad  
FAVET – Universidad de Chile

## Anexo 2, Certificado CICUA



Santiago, 27 de mayo de 2020

Certificado N°: 20370-VET-UCH

### CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo 04-2020, del Proyecto de Investigación titulado: “**Los animales de compañía serán parte de la cadena de transmisión de SARS-CoV2 (COVID-19)?**”, del Investigador Responsable **Felipe Berrios**, Tesista de Pregrado, Laboratorio de Virología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile y como Académico Patrocinante **Victor Manuel Neira Ramírez**, Profesor Asistente, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales. Así mismo, la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

Los Investigadores se han comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de un total de **300 gatos**, *Felis catus* y **300 perros**, *Canis lupus familiaris*, los cuales serán obtenidos de propietarios que acuden a clínicas veterinarias de la Región Metropolitana, desde mayo de 2020 a mayo de 2021, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual está vinculado a **Tesis de Pregrado: Financiamiento Laboratorio de Virología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.**

*El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.*

Ronald Vargas Casanova  
Director  
CICUA – VID  
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla  
Presidente  
CICUA - VID  
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)  
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile  
<http://www.uchile.cl/portal/investigacion/152120/comite-institucional-de-cuidado-y-uso-de-animales-cicua>  
email: coordinador.cicua@uchile.cl

### Anexo 3, Consentimiento Informado



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

### **Título del proyecto: “Serán los animales de compañía parte de la cadena de Transmisión de COVID-19?”**

**Invitación a participar:** Le estamos invitando a participar como propietario/a de un gato o perro, que convive con dueños que han sufrido de COVID-19 o están en cuarentena por haber estado en contacto con alguien positivo o simplemente quiere participar como control dentro del estudio.

**Objetivos:** Esta investigación tiene por objetivo detectar la infección por el virus causante de COVID-19 en su mascota, a través de la toma de muestra de heces, sangre y torulado faríngeo.

**Procedimientos:** Si acepta participar, se colectará una muestra de heces de su mascota, ya sea directamente desde el recto o bien del ambiente, en caso de que haya realizado una deposición durante su permanencia en la Clínica Veterinaria. En caso de que esté con signología (enfermo), se le tomará una muestra de sangre y torulado de faringe.

**Beneficios:** Usted no recibirá ningún beneficio por la participación en este proyecto, pero estará haciendo un libre y generoso aporte para la investigación, que puede contribuir al conocimiento para mejorar la prevención y control de la transmisión viral.

**Compensación:** Usted no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio, aunque tampoco incurrirá en gasto alguno ya que el procedimiento de muestreo y diagnóstico será totalmente financiado por la Universidad de Chile.

**Riesgos para el animal:** El animal no sufrirá riesgo alguno, ya que la muestra será colectada por un Médico Veterinario capacitado para tal evento.

**Riesgo para la persona:** La participación en este estudio no implica riesgo alguno para la persona.

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Debido a que esta enfermedad constituye una zoonosis, si existe la presencia del virus asociada a la enfermedad clínica

COVID-19 en su mascota, esto constituiría un caso de denuncia, lo cual debe ser reportado por usted o en su defecto por el grupo de investigación a la autoridad sanitaria (MINSAL). Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima. Si Ud. Lo requiere, se le informará el resultado de la prueba de diagnóstico realizada con su mascota.

**Derechos del participante:** Si Ud. Requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio o sobre los resultados que se deriven, puede comunicarse con el Investigador responsable Victor Neira Ramirez +569 54069030 o al e-mail:

[victorneira@u.uchile.cl](mailto:victorneira@u.uchile.cl)

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto “Serán los animales de compañía parte de la cadena de transmisión de COVID-19?”

Nombre del dueño

RUT

Firma

Correo electrónico

Fono

Nombre, raza, edad y N° chip de la mascota

Nombre del responsable del muestreo:

Fecha



## **BIBLIOGRAFÍA**

**ASTUTI, i.; YSRAFIL.** 2020. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr.* 14(4): 407-412.

**AVMA.** 2021. In-depth summary of reports of naturally acquired SARS-CoV-2 infections in domestic animals and farmed or captive wildlife. [En línea] <<https://www.avma.org/resources-tools/animal-health-and-welfare/covid-19/depth-summary-reports-naturally-acquired-sars-cov-2-infections-domestic-animals-and-farmed-or>> [Consulta: 03-08-2021]

**BARRS, V.; PEIRIS, M.; TAM, K.; LAW, P.; BRACKMAN, C.; TO, E.; YU, V.; CHU, D.; PERERA, R.; SIT, T.** 2020. SARS-CoV-2 in Quarantined Domestic Cats from COVID-19 Households or Close Contacts, Hong Kong, China. *Emerg Infect Dis.* 26(12): 3071–3074.

**BLANCOU, J.; CHOMEL, B.; BELLOTO, A.; MESLIN, F.** 2005. Emerging or re-emerging bacterial zoonoses: Factors of emergence, surveillance and control. *Vet. Res.* 36 (3): 507-522

**CHU, D.; YANG, P.; CHENG, S.; HUI, K.; KRISHNAN, P.; LIU, Y.; NG, D.; WAN, C.; YANG, P.; WANG, Q.; PEIRIS, M.; POONA, L.** 2020. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin. Chem.* 66(4): 549-555.

**CORTÉS, M.** 2020. Coronavirus como amenaza a la salud pública. *Rev Méd Chile.* 148(1): 124-126.

**DECARO, N.; MARTELLA, V.; SAIF, L.; BUONAVOGLIA, C.** 2020. COVID-19 from veterinary medicine and one health perspectives: What animal coronaviruses have taught us. *Res. Vet. Sci.* 131: 21–23.

**DECARO, N.; LORUSSO, A.** 2020. Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. *Vet. Microbiol.* 244: 108693.

**FUENTEALBA, N.; MORE, G.; BRAVI, M.; UNZAGA, J.; FELICE, LORENA.; SALINA, M.; VIEGAS, M.; NABAES, M.; VALINOTTO L.; RIVERO, F.; DILULLO, D.; PECORARO, M.; PANELI, C.** 2021. First detection and molecular analysis of SARS-CoV-2 from a naturally infected cat from Argentina. *Vet. Microbiol.* 260: 109179.

**GARIGLIANY, M.; VAN LAERE, A.; CLERCX, C.; GIET, D.; ESCRIOU, N.; HUON, C.; VAN DER WERF, S.; ELOIT, M.; DESMECHT, D.** 2020. SARS-CoV-2 Natural Transmission from Human to Cat, Belgium, March 2020. *Emerg Infect Dis.* 26(12):3069-3071.

**GAUDREAULT, N.; TRUJILLO, J.; CAROSSINO, M.; MEEKINS, D.; MOROZOV, D.; MADDEN, D.; INDRAN, S.; BOLD, D.; BALARAMAN, V.; KWON, T.; ARTIAGA, B.; COOL, K.; GARCÍA, A.; MA, W.; WILSON, W.; HENNINGSON, J.; BALASURIYA, U.; RICHT, J.** 2020. SARS-CoV-2 infection, disease and transmission in domestic cats. *Emerg. microbes & infect.* 9: 2322-2332.

**JIANZHONG, S.; ZHIYUAN, W.; GONGXUN, Z.; HUANLIANG, Y.; CHONG, W.; RENQIANG, L.; XIJUN, H.; LEI, S.; ZIRUO, S.; YUBO, Z.; LIBIN, L.; PENGFEI, C.; JINLIANG, W.; XIANFENG, Z.; YUNTAO, G.; HUALAN, C.; ZHIGAO, B.** 2020. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. *Science.* 368(6494): 1016-1020.

**JUNG, Y.; PARK, G.; MOON, J.; KU, K.; BEAK, S.; LEE, C.; KIM, S.; ARK, E.; PARK, D.; LEE, J.; BYEON, C.; LEE, J.; MAENG, J.; KIM, S.; KIM, S.; KIM, B.; LEE, M.; KIM, H.** 2020. Comparative Analysis of Primer-Probe Sets for RT-qPCR of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2). *ACS infectious diseases*, 6(9), 2513–2523.

**KHAN A.; CHEUNG P.** 2020. Presence of mismatches between diagnostic PCR assays and coronavirus SARS-CoV-2 genome. *R. Soc. Open Sci.* 7: 200636.

**MA, C.; GONG, C.** 2021. ACE2 models of frequently contacted animals provide clues of their SARS-CoV-2 S protein affinity and viral susceptibility. *J. Med. Virol.* 93(7): 4469-4479.

**MANI MISHRA, P.; UVERSKY, V.; NANDI, C.** 2020. Serum albumin-mediated strategy for the effective targeting of SARS-CoV-2. *Med. Hypotheses*. 140: 109790.

**MICHELITSCH, A.; SCHÖN, J.; HOFFMANN, D.; BEER, M.; WERNIKE, K.** 2021. The Second Wave of SARS-CoV-2 Circulation—Antibody Detection in the Domestic Cat Population in Germany. *Viruses*. 13(6): 1009.

**MINSAL.** 2020. Reporte Diario: 3 de agosto 2021. [En línea] <<https://www.gob.cl/coronavirus/cifrasoficiales>> [Consulta: 03-08-2021]

**NATALE, A.; MAZZOTTA, E.; MASON, N.; CEGLIE, L.; MION, M.; STEFANI, A.; FINCATO, A.; BONFANTE, F.; BORTOLAMI, A.; MONNE, I.; BELLINATI, L.; GUADAGNO, C.; QUARANTA, E.; PASTORI, A.; TERREGINO, C.** SARS-Cov-2 Natural Infection in a Symptomatic Cat: Diagnostic, Clinical and Medical Management in a One Health Vision. *Animals*. 11(6): 1640.

**LEROY, E.; AR GOUILH, M.; 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*. 100133.

**LUAN, J.; LU, Y.; JIN, X.; ZHANG, L.** 2020. Spike protein recognition of mammalian ACE2 predicts the host range and an optimized ACE2 for SARS-CoV-2 infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 526(1): 165–169.

**PAHO.** 2020. Directrices de laboratorio para la detección y el diagnóstico de la infección con el virus COVID-19. [En línea] <<https://www.paho.org/es/documentos/directrices-laboratorio-para-deteccion-diagnostico-infeccion-con-virus-covid-19>> [Consulta: 16-06-2020]

**PEREIRA-GÓMEZ, M.; FAJARDO, A.; ECHEVERRÍA, N.; LÓPEZ-TORT, N.; PERBOLIANACHIS, P.; COSTÁBILE, A.; ALDUNATE, F.; MORENO, P.; MORATORIO, G.** 2021. Evaluation of SYBR Green real time PCR for detecting SARS-CoV-2 from clinical samples. *J Virol Methods*. 289: 114035.

**SAILLEAU, C.; DUMAREST, M.; VANHOMWEGEN, J.; DELAPLACE, M.; CARO, V.; KWASIBORSKI, A.; HOURDEL, V.; CHEVAILLIER, P.; BARBARINO, A.; COMTET, L.; POURQUIER, P.; KLONJKOWSKI, B.; MANUGUERRA, J.; ZIENTARA, S.; LE PODER, S.** 2020. First detection and genome sequencing of SARS-CoV-2 in an infected cat in France. *Transbound Emerg Dis.* 67(6): 2324-2328.

**SEGALÉS, J.; PUIG, M.; RODON, J.; AVILA-NIETO, C.; CARRILLO, J.; CANTERO, G.; TERRÓN, M.; CRUZ, S.; PARERA, M.; NOGUERA, M.; IZQUIERDO, N.; GUALLAR, V.; VIDAL, E.; VALENCIA, A.; BLANCO, I.; BLANCO, J.; CLOTET, B.; VERGARA, J.** 2020. Detection of SARS-CoV-2 in a cat owned by a COVID-19-affected patient in Spain. *PNAS.* 117(40): 24790-24793

**SHI, J.; WEN, Z.; ZHONG, G.; YANG, H.; WANG, C.; HUANG, B.; LIU, R.; HE, X.; SHUAI, L.; SUN, Z.; ZHAO, Y.; LIU, P.; LIANG, L.; CUI, P.; WANG, J.; ZHANG, X.; GUAN, Y.; TAN, W.; WU, G.; CHEN, H.; BU, Z.** 2020. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science.* 368: 1016-1020.

**WANG, L.; WANG, Y.; YE, D.; LIU, Q.** 2020. Review of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) based on current evidence. *Int. J. Antimicrob. Agents,* 105948.

**WINKLER LTDA.** 1985. Purificación de RNA, DNA y Proteínas con la Solución de Chomczynski con Fenol. [En línea] <<http://winklerltda.cl/quimicav2/wp-content/uploads/2017/04/Solucion-de-Chomczynski-DNA-con-fenol.pdf>> [Consulta: 16-05-2020].