



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

T E S I S

**Seroprevalencia de anticuerpos neutralizantes contra Sars-CoV-2 en perros y gatos
en México.**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y SALUD ANIMAL

P R E S E N T A

MVZ. Freddy Dehesa Canseco

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Humberto Ramírez Mendoza

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Jesús Hernández López

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO AC (CIAD)

Dr. José Iván Sánchez Betancourt

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias.

“Le dedico este trabajo de investigación y esta tesis a mi padre Freddy Dehesa Pineda, a mi madre Alma Rosa Canseco Enríquez, a mis hermanos Alma Alejandra Dehesa Canseco y Christian Dehesa Canseco, y a Roxana Pastrana Unzueta por apoyarme incondicionalmente toda la vida y brindarme todo su amor”



M. en C. Freddy Dehesa Canseco

Agradecimientos.

A mi tutor el **Dr. Humberto Ramírez Mendoza**, por brindarme todo su apoyo, orientación y consejos durante mi desarrollo, y ser mi mentor en el área de Virología e investigación.

Al **Dr. Mario Solís Hernández** por ser mi mentor en el área de la Virología y brindarme todo su apoyo en el desarrollo de nuevos experimentos.

Al **Dr. Jesús Hernández López** por brindarme todo su apoyo, orientación, consejos y apoyarme en mi crecimiento profesional en el área de investigación, y ser mi mentor como investigador

Al **Dr. José Iván Sánchez Betancourt** por todo su apoyo, orientación y consejos durante mi desarrollo profesional.

A la **QFB. Roxana Pastrana Unzueta**, por brindarme todo su amor, paciencia y apoyo en el desarrollo de esta investigación tanto técnica dentro del laboratorio como personal.

A el **Dr. Francisco L. Fuentes** y a la **Dra. Nadia Carrillo Guzmán** por brindarme siempre todo su apoyo y amistad.

A mi **familia** por apoyarme incondicionalmente toda la vida y brindarme todo su amor.

A la Comisión México Estados Unidos para la prevención de fiebre Aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales perteneciente al SENASICA, por el uso de sus instalaciones para desarrollar el proyecto y en la toma de muestras serológicas de los animales, así como el uso de su Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me fue otorgada para la realización de mis estudios, **CVU 1103921**.

El presente trabajo fue financiado por el proyecto **PAPIIT-UNAM IN 213321** y la Comisión México Estados Unidos para la prevención de fiebre Aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales perteneciente al SENASICA.

Al departamento de Microbiología e Inmunología por las facilidades brindadas en la realización de esta tesis.

“POR MI RAZA, HABLARA EL ESPIRITU”.

Contenido (índice)

Dedicatorias	2
Agradecimientos	3
Resumen	6
Abstract	6
Lista de cuadros y figuras	7
Abreviaturas	8
1. Introducción	9
1.1 Antecedentes e historia de los coronavirus.....	9
1.2 Coronavirus en animales.....	11
1.3 Situación en animales del Sars-CoV-2 a nivel mundial.....	12
1.4 Situación en animales del Sars-CoV-2 en México.....	14
1.5 Características generales de los coronavirus.....	15
1.6 Transmisión.....	17
1.7 Ciclo de replicación viral.....	17
1.8 Huésped y reservorios.....	20
1.9 Semiología.....	20
1.10 Diagnostico serológico.....	21
2. Justificación	22
3. Hipótesis	22
4. Objetivo general	22
5. Objetivos específicos	23
6. Material y métodos	23
6.1 Diseño experimental.....	23
6.2 Muestras de suero humano.....	23
6.3 Muestras de suero de perros y gatos.....	24
6.4 Línea celular.....	26
6.5 Virus.....	26
6.6 RT-qPCR.....	26
6.7 Secuencia genómica.....	27
6.8 Prueba de neutralización de la reducción de la placa al 90% (PRNT90).....	28
6.9 Microneutralización.....	29
6.10 Testigos positivos y negativos.....	29

6.11 Análisis estadístico	31
7. Resultados.	31
7.1 Aislamiento, titulación viral y preparación de semillas del virus del Sars-CoV-2 para las pruebas MN y PRNT	31
7.2 Análisis de anticuerpos neutralizantes en muestras humanas por MN y PRNT90... 33	
7.3 Análisis de anticuerpos neutralizantes en muestras de perros y gatos mediante las pruebas MN y PRNT90.....	35
8. Discusión.	41
9. Conclusión.	43
10. Referencias bibliográficas.	44
11. Anexos.	50
Anexo 1. Dictamen Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional (número de autorización CBE/006/2020).....	50
Anexo 2. Dictamen Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA) (número de autorización CICUAL-CPA-001-2022).	51
Anexo 3. Solicitud de artículo a la revista Transboundary and Emerging Diseases.	52
Anexo 4. Artículo científico enviado para su publicación.	53

Resumen.

Freddy Dehesa Canseco. **Seroprevalencia de anticuerpos neutralizantes contra Sars-CoV-2 en perros y gatos en México.**

El virus Sars-CoV-2 se originó en Wuhan, China, en 2019 y desde entonces se ha extendido por todo el mundo, infectando a personas y animales. Varios informes han descrito la seroprevalencia de anticuerpos en perros y gatos, pero no hay informes en México. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la seroprevalencia de anticuerpos neutralizantes contra la cepa ancestral y la subvariante Ómicron BA.1 en perros y gatos en México. Se obtuvieron 1,111 muestras entre perros (n=1052) y gatos (n=59) de diferentes regiones de México, y se evaluó la presencia de anticuerpos neutralizantes (nAbs) mediante una prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT90) y microneutralización (MN). Los resultados mostraron que el 15,25% (9 de 59) de los gatos y el 2,85% (30 de 1052) de los perros presentaban nAbs contra la cepa ancestral del Sars-CoV-2. Sin embargo, el análisis de los nAbs contra Ómicron BA.1 en los gatos mostró el mismo porcentaje de animales positivos pero una reducción del título. En el caso de los perros, el 2,09% (22 de 1052) mostraron nAbs contra Ómicron BA.1. Estos resultados coinciden con informes anteriores que muestran que los anticuerpos son más frecuentes en los gatos que en los perros y que estos anticuerpos tienen una menor capacidad para neutralizar la subvariante Ómicron BA.1

Palabras clave: Sars-CoV-2, COVID-19, seroprevalencia, perros, gatos, PRNT-90, Microneutralización.

Abstract.

Freddy Dehesa Canseco. **Seroprevalence of neutralizing antibodies against Sars-CoV-2 in dogs and cats in Mexico.**

The virus Sars-CoV-2 originated in Wuhan, China, in 2019 and has since spread worldwide, infecting humans and animals. Several reports have described the seroprevalence of antibodies in dogs and cats, but there are no reports from Mexico. This study aimed to evaluate the seroprevalence of neutralizing antibodies against the ancestral strain and Ómicron BA.1 subvariant in dogs and cats in Mexico. A total of 1,111 samples from dogs (n=1052) and cats (n=59) were collected in different regions of Mexico, and the presence of neutralizing antibodies (nAbs) was evaluated by a plaque reduction neutralization test (PRNT90) and microneutralization (MN). The results showed that 15.25% (9 of 59) of cats and 2.85% (30 of 1052) of dogs presented nAbs against the ancestral strain of Sars-CoV-2. However, the analysis of nAbs against Ómicron BA.1 in cats showed the same percentage of positive animals but a reduction in the titer. In the case of dogs, 2.09% (22 of 1052) showed nAbs against Ómicron BA.1. These results agree with previous reports showing that antibodies are more frequent in cats than in dogs and that these antibodies have a lower capacity to neutralize Ómicron BA.1

Keywords: Sars-CoV-2, COVID-19, seroprevalence, dogs, cats, PRNT-90, microneutralization.

Lista de cuadros y figuras.

Cuadros.

Cuadro 1. Miembros principales de la familia de los coronavirus.

Cuadro 2. Numero de informes de casos positivos a Sars-CoV-2 en el mundo y por región.

Cuadro 3. Características de las muestras de suero de perros y gatos.

Cuadro 4. Primers y Probes utilizados para el diagnóstico de Sars-CoV-2 por la técnica de RT-qPCR.

Cuadro 5. Seroprevalencia de anticuerpos neutralizantes en gatos.

Cuadro 6. Seroprevalencia de anticuerpos neutralizantes en perros.

Cuadro 7. Resultados de los testigos positivos.

Figuras.

Figura 1. Historia de los coronavirus desde 1930 (IBV y MHV) hasta la pandemia de 2022 (Sars-CoV-2).

Figura 2. Distribución mundial de casos reportados de Sars-CoV-2 en animales.

Figura 3. Estructura del Sars-CoV-2 y el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2).

Figura 4. Expresión de la proteína convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en órganos humanos.

Figura 5. Estructura y el ciclo de replicación del Sars-CoV-2.

Figura 6. Placas representativas de la prueba PRNT90.

Figura 7. Efecto citopático del virus Sars-CoV-2.

Figura 8. Título de PRNT90 y MN en muestras humanas utilizando la cepa ancestral.

Figura 9. Correlación de Pearson entre la técnica PRNT90 y la MN utilizando la cepa ancestral.

Figura 10. Mapa de México con la distribución de las muestras de perros y gatos positivos al Sars-CoV-2 por MN y PRNT90.

Figura 11. Correlación de Pearson entre PRNT90 vs. MN.

Abreviaturas.

Sars-CoV-2. Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2.

OMSA. World Organization for Animal Health.

ORF. Marco de Lectura Abierto.

ACE2. Receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2.

beta-CoV. *Betacoronavirus*.

ARN. Ácido Ribonucleico.

Pb. Pares de Bases.

RT-qPCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Retrotranscripción en Tiempo Real.

EDTA. Ácido Etilendiaminotetraacético.

KDa. Kilo Daltones.

RBD. Dominio de Unión al Receptor.

TMPRSS2. Proteasa de la Superficie Celular Serina-Proteasas Transmembrana de Tipo 2.

UFP. Unidades Formadoras de Placas.

ECP. Efecto Citopático.

PRNT. Prueba de Neutralización por Reducción de Placas.

MN. Microneutralización.

NAbs. Anticuerpos Neutralizantes.

DICC_{50%}. Dosis Infectantes en Cultivo Celular al 50%.

FBS. Suero Fetal Bovino.

DMEM. Dulbecco's Modified Eagle Medium.

1. Introducción.

En la actualidad la emergencia y reemergencia de patógenos constituye una amenaza constante para la sanidad y seguridad de la humanidad, las consecuencias económicas, sociales y sanitarias relacionadas a esta situación son impredecibles; en los últimos 20 años hemos sido testigos del impacto que pueden causar con dos brotes causados por coronavirus (SARS-CoV y MERS-CoV), originando reportes importantes graves de neumonía en humanos, mostrando un claro potencial pandémico (Azhar et al., 2019; Chan-yeung et al., 2003; Ramadan et al., 2019).

La pandemia de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), causada por el virus del síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (Sars-CoV-2), se notificó por primera vez en diciembre del 2019 en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, en el centro de China, y se asoció a un número importante de casos de neumonía de origen desconocido (WHO, 2020). Desde entonces, el virus se ha extendido a diferentes países, causando más de 600 millones de infecciones y 6 millones de muertes (WHO, 2020). El primer caso reportado en México fue en febrero de 2020; el número de casos ha aumentado y hasta el 9 de noviembre del 2022 se han reportado 7,430,970 millones de pacientes (SS-México, 2021b).

1.1 Antecedentes e historia de los coronavirus.

La historia de los coronavirus comenzó desde hace más de un siglo, con el aislamiento e identificación del virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV), que es el primer coronavirus que se aisló en 1937, seguido del virus de la hepatitis murina (MHV), del que se informó una década después, posteriormente se identificaron otros coronavirus que son altamente patógenos para los animales, como el virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), el coronavirus bovino (BCoV) y el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) (Figura 1) (Bailey et al., 1949; Cheever et al., 1949; Mulabbi et al., 2021).

El primer coronavirus humano que se aisló fue el HCoV-229E durante un estudio de enfermedades respiratorias entre estudiantes de medicina en la Universidad de Chicago y recibió el nombre de 229E porque se aisló del espécimen del estudiante 229E. Posteriormente, en 1965, se aislaron los virus B814 y HCoV-OC43 de pacientes con resfriado común, mediante la inoculación en cultivos de órganos del tracto respiratorio, con esto se logró demostró que estos virus, junto con el HCoV-229E, tenían características estructurales similares a las del IBV del pollo que se había aislado anteriormente (Figura 1) (Hamre et al., 1966; McIntosh et al., 1967; Mulabbi et al., 2021; Tyrrell et al., 1966).

Con el aumento de la investigación en el área de la virología, el número y la importancia de los coronavirus ha crecido exponencialmente; han sido descubiertos muchos virus nuevos en animales y humanos, antes de 2002, sólo se conocía que el HCoV 229E y el HCoV OC43 circulaban en la población humana causando el resfriado común, y se consideraban relativamente inofensivos porque causaban una enfermedad leve (Mulabbi et al., 2021; van der Hoek, 2007). Sin embargo, en 2002 se descubrió un coronavirus que causaba una

enfermedad respiratoria aguda grave y que se denominó coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV), que surgió inicialmente en 2002-2003 en la provincia de Guangdong, en el sur de China, y causó una infección respiratoria grave con una alta morbilidad y mortalidad que no se había experimentado antes con los coronavirus. Diez años después del descubrimiento del SARS- coronavirus, en 2012 se descubrió otro coronavirus humano que causa enfermedades respiratorias graves, denominado inicialmente Coronavirus Humano del Centro Médico Erasmus (HCoV-EMC), pero más tarde el comité internacional sobre la taxonomía de los virus lo denominó coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS). Este virus se identificó por primera vez en Arabia Saudí a partir de un hombre de 60 años con neumonía aguda, que desarrolló dificultad respiratoria, insuficiencia renal y finalmente sucumbió a la enfermedad (Figura 1) (Feng et al., 2007; Mulabbi et al., 2021; Woo et al., 2005).

El MERS-CoV causa una serie de infecciones del tracto respiratorio inferior altamente patógenas con una tasa de letalidad más alta, del 35%, en comparación con el 11% del SARS-CoV. Sin embargo, a diferencia del SARS que desapareció un año después de su descubrimiento, el MERS ha permanecido causando brotes en Oriente Medio, especialmente en Arabia Saudí (2014-2016) y en Corea del Sur (2015) (Figura 1.) (Chan et al., 2015; Mulabbi et al., 2021; Widagdo et al., 2017).

Apenas 7 años después del descubrimiento del MERS-CoV, en diciembre de 2019, se descubrió un nuevo CoV humano similar al SARS-CoV y se aisló de pacientes de la provincia de Hubei (China) que padecían neumonía, pero desde entonces se ha extendido a muchos países de todos los continentes. Este nuevo virus causa la enfermedad por coronavirus (COVID-19), que ha sido declarada pandemia por la Organización Mundial de la Salud. Este nuevo CoV, inicialmente designado como 2019-nCoV pero ahora denominado Sars-CoV-2, constituye el séptimo CoV que infecta a los humanos (Figura 1) (Mulabbi et al., 2021; Zhu et al., 2020).

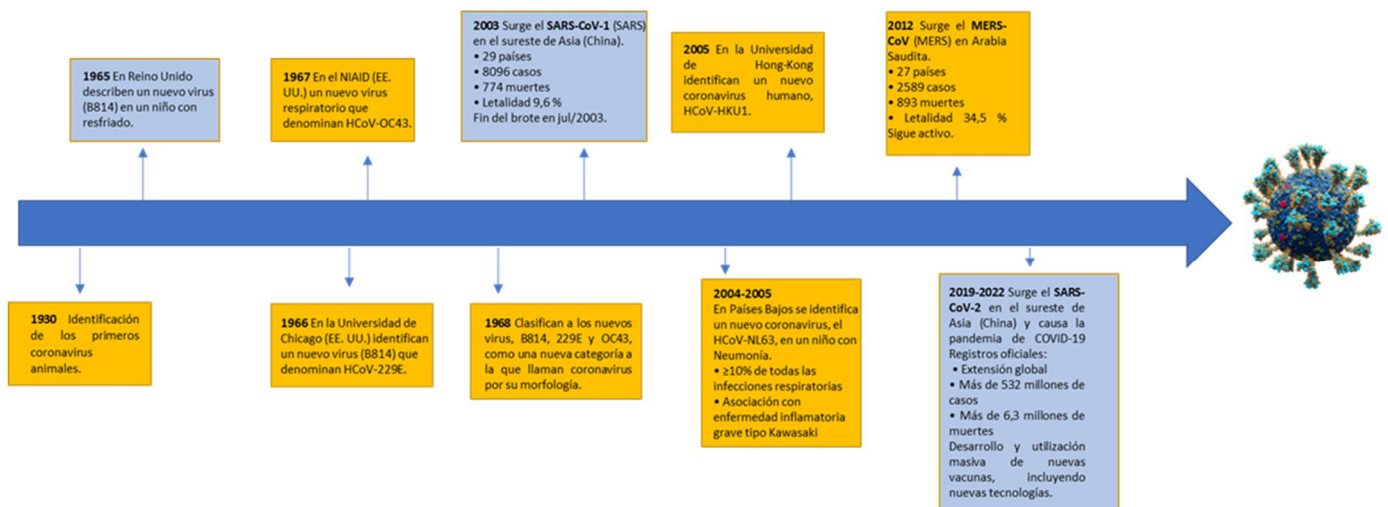


Figura 1. Historia de los coronavirus. Desde 1930 (IBV y MHV) hasta la pandemia de 2022 (Sars-CoV-2).

1.2 Coronavirus en animales.

Cada día se produce un número incalculable de interacciones entre humanos y animales en entornos domésticos, agrícolas, de investigación, recreativos, educativos, terapéuticos, de entretenimiento y silvestres. Se estima que en 2018 había más de 470 millones de perros y 370 millones de gatos fueron considerados como mascotas en todo el mundo en 2018 siendo Estados Unidos, China y Rusia las tres principales naciones propietarias de perros y gatos, en los últimos años existe un aumento en la tenencia de contar con mascotas en hogares, según informes y esta tendencia se ve reflejada principalmente en China, India y América Latina (Bedford, 2020; Hobbs et al., 2021).

En todo el mundo existe un floreciente comercio legal e ilegal de fauna y flora silvestres, y se calcula que el tráfico mundial de productos silvestres ilegales, como las escamas de pangolín, el marfil de elefante, los huesos de tigre y la bilis de oso, ascendió a 7.000-23.000 millones de dólares estadounidenses en 2016 (Hobbs et al., 2021).

La invasión de los seres humanos en zonas previamente deshabitadas, la tala, el cultivo y la urbanización puede crear diversas interfaces entre la vida silvestre, el ganado y los seres humanos que representan puntos críticos para la transmisión interespecie, la emergencia o reemergencia de patógenos. Más del 60% de las enfermedades emergentes identificadas recientemente han sido zoonóticas, la mayoría de las cuales han tenido un origen en la fauna silvestre y tales eventos han aumentado significativamente en los últimos tiempos (Hobbs et al., 2021).

Históricamente se han considerado a los murciélagos y las aves como los principales reservorios de los coronavirus, aunque en los últimos tiempos se han identificado nuevos coronavirus diversificados en todo el mundo, y se han aislado varios Gamma y Delta coronavirus de aves silvestres y domésticas (gansos, palomas, patos, etc.). En condiciones naturales, cada coronavirus tiene un rango de hospedaje restringido que infecta a una sola especie animal, y la transmisión entre especies ocurre raramente, si es que ocurre, en su mayoría infectan el tracto respiratorio y/o digestivo, y pocos virus pueden propagarse a los riñones, al hígado o al sistema nervioso central (Moneim et al., 2020).

Algunos coronavirus son endémicos en animales domésticos y silvestres en diferentes países. Los miembros más comunes de los coronavirus que infectan a los animales son el virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV; γ -CoV), el coronavirus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV; α -CoV), el coronavirus de la encefalomielitis hemaglutinante porcina (HEV; β -CoV), el coronavirus de la diarrea epidémica porcina (DEP; β -CoV), el CoV bovino (BCoV; β -CoV); el coronavirus entérico canino (CECoV; α -CoV) y el coronavirus respiratorio canino (CRCoV; β -CoV), coronavirus felino (FCoV; α -CoV) y el virus de la hepatitis murina (MHV; β -CoV) (Cuadro 1) (Moneim et al., 2020; Saif, 2010; Song et al., 2015).

Cuadro 1. Miembros principales de la familia de los coronavirus.

Genero	Subgénero	Especie	Receptor principal	Referencia
<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Pedacovirus</i>	Diarrea Epidémica Porcina	APN	(Li et al., 2007)
	<i>Duvinacovirus</i>	Coronavirus humano 229E	APN	(Yeager et al., 1992)
	<i>Setracovirus</i>	Coronavirus humano NL63	ACE2	(Wu et al., 2009)
	<i>Rhinacovirus</i>	Diarrea aguda porcina	No identificado	
	<i>Tegacovirus</i>		Alphacoronavirus 1	
		Coronavirus canino	APN	(Benbacer et al., 1997)
		Peritonitis Infecciosa Felina	APN	(Tresnan et al., 1996)
	Gastroenteritis transmisible porcina	APN	(Delmas et al., 1992)	
	Coronavirus Respiratorio Porcino	APN	(Schultze et al., 1996)	
<i>Betacoronavirus</i>	<i>Embecovirus</i>	Betacoronavirus 1		
		Coronavirus humano OC43	Neu5,9Ac2	(Krempl et al., 1995)
		Coronavirus Equino	No identificado	No identificado
		Coronavirus Bovino	Neu5,9Ac2/ HLA-I	(Beate et al., 1992)
		Coronavirus del dromedario HKU23	Sugar	(Cheng et al., 2019)
		Coronavirus respiratorio Canino	HLA-I	(Szczepanski et al., 2019)
		Encefalomiелitis Hemoaglutinante Porcina	Neu5,9Ac2	(Beate et al., 1991)
		HCoV-HKU1	Neu5,9Ac2	(Huang et al., 2015)
		MHV	CEACAM1a	(Williams et al., 1991)
		<i>Merbecovirus</i>	MERS-CoV	DPP4
<i>Sarbecovirus</i>	SARS-CoV-1	ACE2	(Li et al., 2003)	
	Sars-CoV-2	ACE2	(Hoffmann et al., 2020)	
<i>Gammacoronavirus</i>	<i>Igacovirus</i>	Bronquitis Infecciosa Aviar	Neu5Gc	(Beate et al., 1993)
		Coronavirus de los pavos (TCoV)	non-sialylated type 2 poly-LacNAc	(Ambepitiya et al., 2015)
<i>Delatacoronavirus</i>	<i>Buldecovirus</i>	Deltacoronavirus porcino	No identificado	No identificado

1.3 Situación en animales del Sars-CoV-2 a nivel mundial.

El Covid-19 causado por el virus del Sars-CoV-2 es considerada una enfermedad humana que muy probablemente se originó de una fuente animal como ocurrió con los otros *Betacoronavirus* y a través de una alta transmisión generalizada se convirtió en una pandemia. Hasta el 31 de julio del 2022 se han reportado alrededor de 584 millones de

casos humanos confirmados en todo el mundo, con más de 6,4 millones de muertes humanas (JHU, 2022).

La naturaleza del Sars-CoV-2, junto con su distribución generalizada y la susceptibilidad que presentan algunas especies animales, se manifiesta en infecciones derivadas del estrecho contacto entre las personas y los animales. A la inversa, también existen pruebas de que el contacto estrecho con algunas especies de animales infectados puede representar una fuente potencial de contagio para los seres humanos (Oreshkova et al., 2020).

Aunque la principal fuente de transmisión comunitaria es la transmisión entre personas, los casos de infecciones de animales por el Sars-CoV-2 siguen en aumento. Actualmente se han notificado 679 brotes en animales a nivel mundial, que afectan a 24 especies en 36 países (Figura 2; Cuadro 2). Algunos países han experimentado una alta prevalencia de brotes en granjas de visones, y ahora se han identificado cepas variantes en mustélidos (OIE, 2022b).

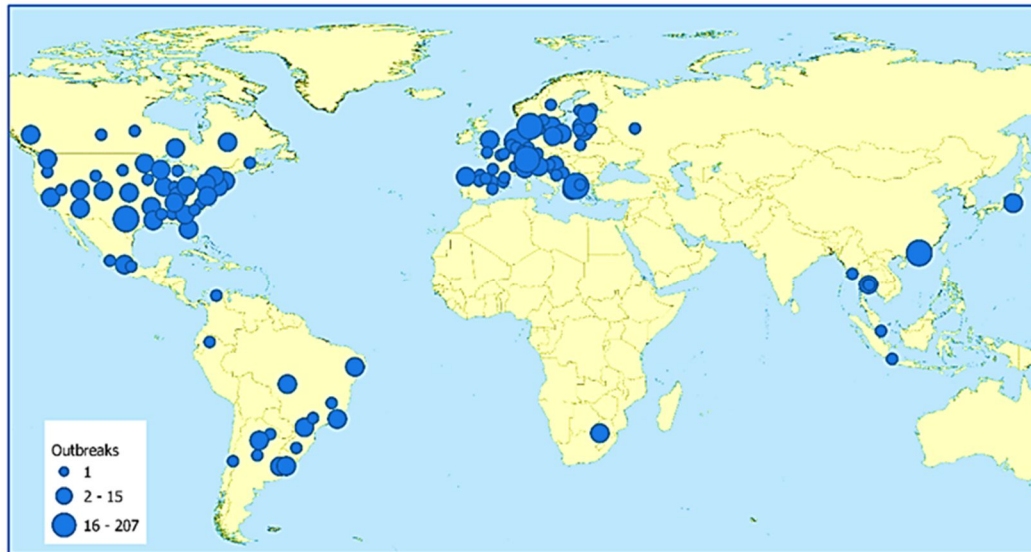


Figura 2. Distribución mundial de casos reportados de Sars-CoV-2 en animales. El siguiente mapa muestra los 36 países en donde se han notificado informes positivos de Sars-CoV-2 notificados a la OMSA hasta el 31 de julio de 2022. El tamaño de los puntos del mapa es proporcional al número de brotes notificados. Fuente: (OIE, 2022b).

Cuadro 2. Numero de informes de casos positivos a Sars-CoV-2 en el mundo y por región.

Especie animal	Región			
	África	América	Asia	Europa
Gato (<i>Felis catus</i>)		X	X	X
Perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)		X	X	X
Visón (<i>Neovison vison</i>)		X		X
Nutria (<i>Lutrinae</i>)		X		
Hurón (<i>Mustela putorius furo</i>)		X		X
León (<i>Panthera leo</i>)	X	X	X	X
Tigre (<i>Panthera tigris</i>)		X	X	X
Puma (<i>Puma concolor</i>)	X	X		
Leopardo de las nieves (<i>Panthera uncia</i>)		X		
Gorila (<i>Gorilla</i>)		X		X
Venado de cola blanca (<i>Odocoileus virginianus</i>)		X		
Gato pescador (<i>Prionailurus viverrinus</i>)		X		
Binturong (<i>Arctictis binturong</i>)		X		
Coatí (<i>Nasua</i>)		X		
Hiena manchada (<i>Crocuta crocuta</i>)		X		
Lince boreal (<i>Lynx Lynx</i>)		X		X
Lince de Canadá (<i>Lynx canadensis</i>)		X		
Hipopótamo (<i>Hippopotamus amphibius</i>)				X
Hámsteres (<i>Cricetinae</i>)			X	
Venado burra (<i>Odocoileus hemionus</i>)		X		
Oso hormiguero gigante (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>)		X		
Manatí antillano (<i>Trichechus manatus</i>)		X		
Tití de cola negra (<i>Mico melanurus</i>)		X		
Mono ardilla común (<i>Saimiri sciureus</i>)		X		

Fuente: (OIE, 2022b).

1.4 Situación en animales del Sars-CoV-2 en México.

En México existe el informe de 18 casos de perros positivos a Sars-CoV-2 notificados a la OMSA hasta el 31 de julio de 2022. Los casos representan muestras positivas por RT-qPCR, secuenciación genómica y un aislamiento viral notificado por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) (OIE, 2021; Navarro-Lopez et al., 2022). Estos animales infectados fueron notificados en los estados de Jalisco, Estado de México, Puebla y Ciudad de México. De estos casos, la mayor parte son animales que presentaron semiología y uno de ellos murió a consecuencia de la enfermedad.

1.5 Características generales de los coronavirus.

Los coronavirus pertenecen a la familia *Coronaviridae*, la subfamilia *Coronavirinae*, que contiene cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. Estos virus pueden causar enfermedades respiratorias, digestivas y del sistema nervioso en los seres humanos y muchos otros animales (Yang et al., 2020), presentan partículas esféricas con un diámetro de aproximadamente 80 a 160 nm, y una superficie envuelta cubierta principalmente por la glicoproteína denominada Spike (S), y las glicoproteínas de la membrana (M). También cuentan con glicoproteínas de envoltura (E) que se localizan entre las glicoproteínas S (Figura 3) (Hu et al., 2021).

El genoma que presentan los coronavirus está compuesto por un ARN de cadena positiva de 26 Kb a 32 Kb de longitud, constituyendo el genoma más largo conocido entre los virus de ARN. El ARN genómico y la proteína fosforilada de la nucleocápside (N) forman una nucleocápside en espiral, que se encuentra dentro de la envoltura del virus (Hu et al., 2021; Yang et al., 2020). Este genoma tiene una estructura de tapa en la posición 5', una estructura de cola de poliadenilato en la posición 3', y seis marcos de lectura abiertos (ORF), de los cuales el ORF1, se localiza cerca del extremo 5' y codifica a 16 proteínas no estructurales (nsp1-16) que intervienen en la replicación y la transcripción viral, existen otros ORFS que tienen la función de codificar a las cuatro proteínas principales (S, M, N y E), ocho proteínas accesorias (3a, 3b, p6, 7a, 7b, 8b, 9b). El ORF14 se encarga de desempeñar un papel importante en el ensamblaje de las partículas virales (Hu et al., 2021; Narayanan et al., 2015; Yang et al., 2020).

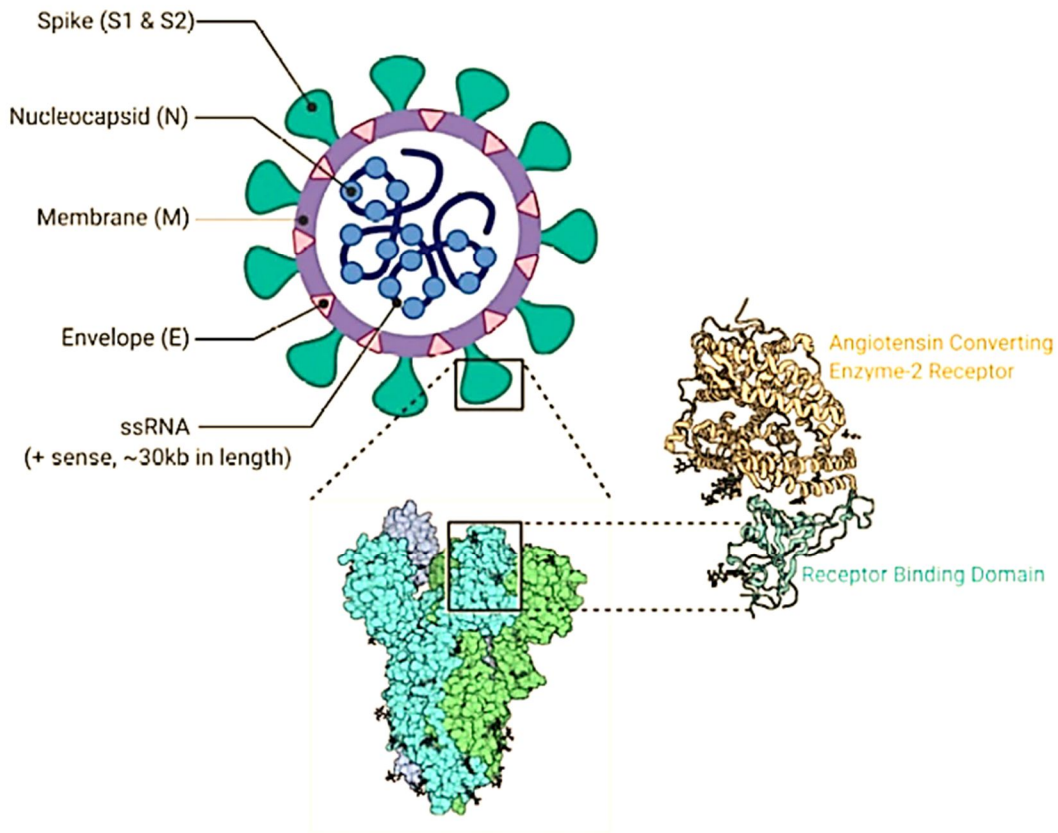


Figura 3. Estructura del Sars-CoV-2 y el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). Fuente: (Hasöksüz et al., 2020).

El virus Sars-CoV-2 pertenece al género *Betacoronavirus* (beta-CoV), presenta un genoma con un tamaño aproximado de 29,9 kb (M.-Y. Wang et al., 2020). La entrada de este virus en las células huésped está mediada por la glicoproteína S que es la responsable de la unión a las células blanco.

Cada monómero de la proteína S tiene una longitud aproximada de 180 KDa y está compuesta de dos subunidades funcionales, las subunidades S1 y S2. La subunidad S1 está formada por el dominio N-terminal (NTD) y el dominio de unión al receptor (RBD). La función de la subunidad S1 es unirse al receptor en la célula huésped. La subunidad S2 contiene el péptido de fusión (FP), la heptada repetida 1 (HR1), la hélice central (CH), el dominio conector (CD), la heptada repetida 2 (HR2), el dominio transmembrana (TM) y la cola citoplasmática (CT). Esta subunidad tiene como función fusionar las membranas de los virus y las células huésped, adicionalmente existe un sitio de corte en la frontera entre las subunidades S1 y S2 que se denomina sitio de corte de la proteasa (Hu et al., 2021; Jackson et al., 2022). Para todos los coronavirus, las proteasas (proteasa de la superficie celular serina-proteasas transmembrana de tipo 2 (TMPRSS2) y las catepsinas de las proteasas lisosomales) del huésped escinden la glicoproteína S en el sitio de corte de la subunidad S2 para activar a las proteínas. Este proceso es crítico para fusionar las

membranas de los virus y las células del huésped a través de cambios conformacionales irreversibles (Jackson et al., 2022).

La estructura de la proteína S del Sars-CoV-2, es similar y se encuentra estrechamente relacionada a las características de la proteína S del SARS-CoV. Otros coronavirus estos utilizan dominios especiales que se presentan en la subunidad S1 para reconocer diferentes receptores de entrada. En el caso del SARS-CoV y el Sars-CoV-2, el mecanismo para entrar en las células huésped se basa en reconocer el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en las células huésped a través del Receptor Binding Domain (RBD) (Figura 3) (Jackson et al., 2022).

La proteína S del Sars-CoV-2 contiene un RBD que se encarga de reconocer específicamente al receptor ACE2. Está compuesto por dos dominios estructurales, el núcleo y los subdominios externos. El subdominio del núcleo se encuentra muy conservado y está compuesto por cinco hebras β dispuestas de forma antiparalela y un enlace disulfuro entre dos hebras β (Jackson et al., 2022; Shang et al., 2020). Entre las hebras β 4 y β 7 antiparalelas se encuentra el receptor-binding motif (RBM), que consta de bucles y hélices α , así como de hebras β 5 y β 6 cortas. El RBM contiene la mayoría de los sitios de unión para Sars-CoV-2 y ACE2 (Shang et al., 2020). El subdominio externo se encuentra dominado principalmente por el bucle que está estabilizado por el enlace disulfuro (Shang et al., 2020).

1.6 Transmisión.

El Sars-CoV-2 se transmite principalmente a través de fluidos y secreciones respiratorias, aerosoles, el contacto directo con superficies contaminadas y la vía fecal-oral. En los animales la fuente principal de infección está relacionada con dueños positivos a la enfermedad que conviven y presentan un contacto directo con sus mascotas (Harrison et al., 2020).

1.7 Ciclo de replicación viral.

Para ingresar a la célula huésped, el Sars-CoV-2 reconoce a los receptores de la enzima ACE2 como puerta de entrada para establecer la infección, mismo receptor utilizado por el SARS-CoV pero con una afinidad 10 a 20 veces mayor lo que sugiere una posibilidad de transmisión entre especies y una rápida propagación de este virus (Hu et al., 2021; H. Li, Liu, Yu, Tang, & Tang, 2020). Estos receptores de membrana son ampliamente expresados en las diferentes células de casi todos los órganos como pulmón, corazón, riñón, vía biliar, hígado, intestino entre otros (Figura 4) (Hikmet et al., 2020; Renu et al., 2020; Salamanna et al., 2020).

Los receptores ACE2 son proteínas transmembrana responsables de la conversión de angiotensina I en angiotensina II, promoviendo la vasoconstricción, inflamación, homeostasis de la presión arterial y contracción del miocardio (Matheson et al., 2020).

La ACE2 actúa específicamente generando angiotensina 1-7 (Ang 1-7) después de la escisión de Ang II. Posteriormente, Ang 1-7 es responsable de la vasodilatación y de la producción de moléculas antiinflamatorias al interactuar con el receptor Mas (MasR) (Oudit et al., 2020; Wang et al., 2020).

La expresión y distribución de los receptores ACE2 regulan el tropismo del virus a los distintos tejidos como también la patogenia (Matheson et al., 2020).

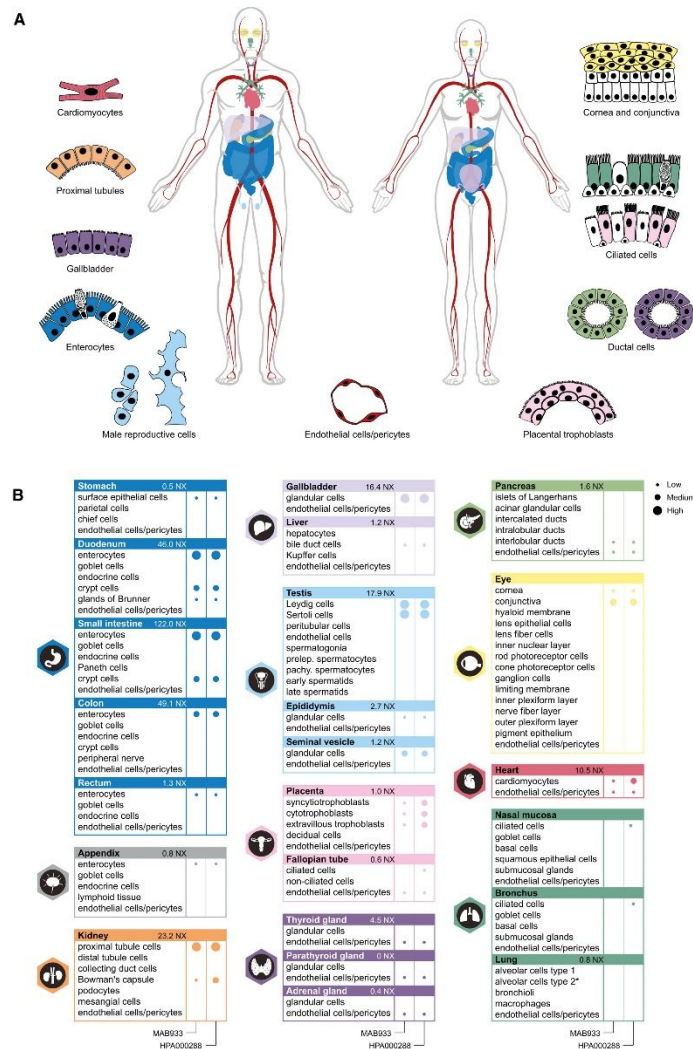


Figura 4. Expresión de la proteína convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en órganos humanos. (A) Principales tipos celulares que expresan la proteína convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en humanos. (B) Niveles de expresión específicos de la proteína ACE2 de cada tipo celular por la técnica de inmunohistoquímica en diferentes órganos utilizando la tinción MAB933 (R&D Systems) en el lado izquierdo y la tinción HPA000288 (Atlas Antibodies) del lado derecho (Hikmet et al., 2020).

En los pulmones los receptores ACE2 están expresados en los neumocitos tipo 2 y también están presentes en monocitos, macrófagos y células endoteliales (García-Salido, 2020). En el proceso de unión al receptor ACE2, el Sars-CoV-2 utiliza la glicoproteína S, responsable de mediar dos procesos fundamentales en la infección a través de sus dos subunidades

denominadas S1 y S2. La subunidad S1 se une al receptor ACE2 y la subunidad S2 determina la fusión permitiendo la entrada del virus por endocitosis (Matheson et al., 2020). En este proceso además participa una proteasa transmembrana de la célula huésped que escinde la glicoproteína S poco después de unirse a ACE2 (Figura 5) (Matheson et al., 2020).

El análisis estructural del mecanismo de unión del RBD del Sars-CoV-2 y los receptores ACE2 sugiere que ACE2 de peces, anfibios, aves y mamíferos puede unirse a la RBD del Sars-CoV-2, lo que los convierte en posibles huéspedes naturales del Sars-CoV-2 (Chen et al., 2020).

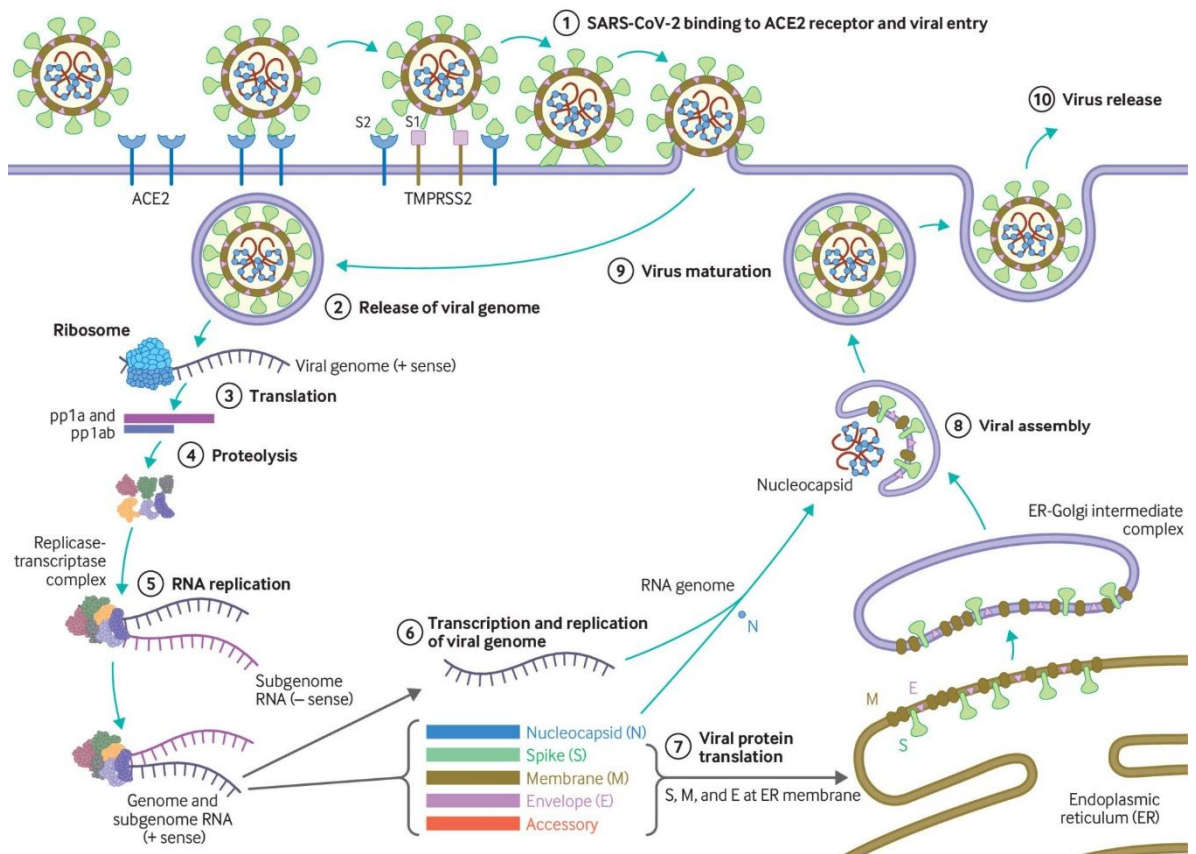


Figura 5. Estructura y el ciclo de replicación del Sars-CoV-2. (1) El Sars-CoV-2 se une al receptor ACE2 de la célula diana del huésped en sinergia con la serina-proteasas transmembrana de tipo 2, que se expresa principalmente en las células epiteliales de las vías respiratorias y en las células endoteliales vasculares. Esto conduce a la fusión de la membrana y libera el genoma viral en el citoplasma del huésped (2). Las etapas (3-7) muestran los pasos restantes de la replicación viral, que conducen al ensamblaje viral, la maduración y la liberación del virus. Fuente: (Cevik et al., 2020).

1.8 Huésped y reservorios.

Además de infectar a los humanos, el Sars-CoV-2 puede infectar a los animales domésticos y de zoológico. Sin embargo, aún se desconoce el papel de dicha infección en la transmisión del virus o como reservorio de la enfermedad. El primer caso de antropozoonosis se notificó en Hong Kong, en el perro de un paciente que presentaba COVID-19 diagnosticado por RT-qPCR (Sit et al., 2020). Desde entonces, se ha notificado un número significativo de animales de compañía infectados en diferentes partes del mundo (OIE, 2022a; Bao et al., 2020; Freuling et al., 2020; Kim et al., 2020; Newman et al., 2020; Patterson et al., 2020; Prince et al., 2021; Rockx et al., 2020; Sia et al., 2020; Williams et al., 2021).

En México, el primer caso de Sars-CoV-2 en perros fue notificado por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) en abril de 2020 (Navarro-Lopez et al., 2022). En este caso, cuatro perros estuvieron en contacto con humanos positivos a la RT-qPCR, y uno de los perros resultó positivo a Sars-CoV-2 por RT-qPCR, aislamiento viral en cultivo celular y secuenciación genómica (OIE, 2021). Independientemente de la baja probabilidad de transmisión de mascota a humano o de humano a mascota, es esencial analizar el papel de los animales de compañía en la transmisión del Sars-CoV-2.

Además de los perros, se ha reportado que el Sars-CoV-2 infecta a felinos (Patterson et al., 2020; Williams et al., 2021), ciervos (Chandler et al., 2021; Palmer et al., 2021), (Kim et al., 2020), primates no humanos (Rockx et al., 2020), hámsteres chinos y hámsteres dorados (Bertzbach et al., 2021; Sia et al., 2020).

Existen especies animales que tienen receptores que podrían ser infectados por la similitud con el receptor ACE2, destacando el *Paguma larvata* (civeta de palma enmascarada), *Equus caballus* (caballo), *Bos taurus* (ganado vacuno), *Ovis aries* (oveja), *Vulpes* (zorro rojo), *Heterocephalus glaber* (rata topo desnuda) e *Ictidomys tridecemlineatus* (ardilla de tierra de trece flancos) (Hassan et al., 2020; Luan et al., 2020; Sharun et al., 2020). Sin embargo, también hay especies que, a pesar de tener una ACE2 similar a la de los humanos, no se infectan como en el caso de los cerdos, que, tras infectarse por vía intranasal, no mostraron anticuerpos (Schlottau et al., 2020; Shi et al., 2020). Estos resultados sugieren que es importante considerar a estas especies dentro de la diseminación o reservorio del Sars-CoV-2.

1.9 Semiología.

El primer caso de infección reportado en felinos fue en un gato doméstico en Bélgica al principio de la pandemia. Posterior a este caso fueron reportados un importante número de felinos infectados en diferentes partes del mundo (n=124) de los cuales 70 casos reportados presentaban la información clara sobre la aparición o ausencia de signos clínicos. El 54 % de los casos (n=38), fueron reportados como asintomáticos, aunque presentaban una estrecha relación con pacientes humanos con Covid-19; el 46% de los casos (n=32) mostraron signos clínicos que podrían asociarse directamente a la infección por Sars-CoV-2 ; 26 de estos 32 animales lograron recuperarse exitosamente, seis animales murieron a

lo largo de la infección, tres fueron eusutanasiados y tres murieron a consecuencia de complicaciones médicas relacionadas con la infección (Ramirez et al., 2021; Hamer et al., 2021; Hosie et al., 2021; Segalés et al., 2020).

Entre los signos clínicos más comunes que se observan en los animales afectados están los que implican a las vías respiratorias, como tos, estornudos, dificultad para respirar, estertores en los pulmones, aumento de la frecuencia respiratoria, congestión y secreción ocular. También fueron notificados signos digestivos como vómitos, úlceras bucales y algunos signos no especificados clasificados como signos "digestivos leves", presumiblemente diarrea. Los signos no específicos incluían letargo, fiebre y falta de apetito. Por último, en algunos casos específicos, se observaron signos neurológicos (hipertensión endocraneada), signos cardíacos como la cardiomiopatía hipertrófica. Así como anemia y trombocitopenia, que no podían relacionarse directamente con la infección por Sars-CoV-2. Asimismo, fueron identificadas infecciones secundarias relacionadas con *Mycoplasma haemofelis* y la presencia de meningoencefalitis bacteriana (Ramirez et al., 2021; Hosie et al., 2021; Segalés et al., 2020).

En el caso de los perros, la infección no presentó semiología clínica en la mayoría de los casos. En algunos animales infectados pueden llegar a presentar signos respiratorios, especialmente tos seca por la noche, y algunos trastornos digestivos (diarrea acuosa). Los signos respiratorios que pueden llegar a presentar son: dificultad para respirar, estertores en los pulmones, aumento de la frecuencia respiratoria y congestión (Fernández et al., 2021; Hamer et al., 2020; Sit et al., 2020). Existen algunos informes en los cuales los perros infectados murieron a lo largo de la infección, sin que existiera una relación clara entre la causa de muerte y la presencia del virus (Hamer et al., 2020).

1.10 Diagnóstico serológico.

Desde el inicio de la pandemia del COVID-19, se autorizaron diferentes pruebas para el diagnóstico serológico como el inmunoensayo de flujo lateral, ELISA e inmunoensayo de microesferas. Todos estos ensayos están fundamentados en la unión antígeno-anticuerpo, utilizando como proteína base la proteína de membrana Spike, S1 o RBD. Sin embargo, este tipo de metodologías no miden la capacidad neutralizante de los anticuerpos (Amanat et al., 2020; Geurtsvan et al., 2020; Muruato et al., 2020). Convencionalmente, se ha establecido que las técnicas adecuadas para medir la respuesta de los anticuerpos neutralizantes es la neutralización por reducción de placas (PRNT) y microneutralización (MN) (Muruato et al., 2020; Perera et al., 2020). Generalmente existe una correlación entre ambas técnicas, sin embargo, el PRNT es considerada como la técnica de oro (Amanat et al., 2020; Okba et al., 2020; Perera et al., 2020).

Las técnicas de PRNT y MN, son consideradas como las técnicas que mejor reflejan la correlación virus-anticuerpos *in vitro*, que resultan en la neutralización de los virus de manera que ya no puedan infectar, ni reproducirse en un cultivo celular.

El PRNT se utiliza para determinar la máxima dilución de suero necesaria para reducir la formación de unidades formadoras de placas (UFP) del virus en un 90% en un cultivo celular. La MN se basa en el mismo principio que el PRNT, sin embargo, en lugar de contar

la cantidad de UFP, el resultado se determina mediante la ausencia de efecto citopático (ECP), y con ello cuantificar la capacidad neutralizante que presenta un anticuerpo contra un agente viral específico, impidiendo que los viriones infecten las células cultivadas (Plummer et al., 1964). Ambas técnicas son consideradas como semicuantitativas, por lo que se realizan diluciones del suero problema y se añade una cantidad constante de virus.

Después de la incubación suero-virus, la mezcla se añade a un sistema susceptible (cultivo celular) para ver la infectividad residual del virus, donde el virus no neutralizado pueda producir efecto citopático en el caso de la MN y la formación de UFP en el caso del PRNT (Plummer et al., 1964; Salje et al., 2014).

Diferentes estudios han reportado el uso de la prueba de PRNT90 y de MN para evaluar la prevalencia de anticuerpos neutralizantes (nAbs) contra el Sars-CoV-2 en perros y gatos. En Italia, se detectaron anticuerpos neutralizantes contra el Sars-CoV-2 en 15 de 451 muestras de perros (3,3%) y en 11 de 191 muestras de gatos (5,8%), con títulos que iban de 1:20 a 1:160 y de 1:20 a 1:1280, respectivamente. En todos los casos, las muestras positivas se encontraron en mascotas procedentes de hogares con personas positivas al Sars-CoV-2 (Días et al., 2021). En otro estudio realizado en Brasil, el porcentaje de muestras positivas fue pequeño, de sólo el 2% (2 de 96) según la técnica PRNT90; un felino y un canino tenían títulos de 1:80 y 1:40, respectivamente. Otros estudios que utilizaron ELISA encontraron tasas de prevalencia que oscilaban entre el 1,7% en gatos y el 0,8% en perros (Stevanovic et al., 2021). Estos estudios contribuyen a nuestra comprensión del papel de las mascotas y otros animales en la pandemia actual.

2. Justificación.

Debido al número desconocido de infecciones por Sars-CoV-2 en animales de México, la cantidad de casos reportados en diferentes especies en el mundo, y al ser una enfermedad zoonótica considerada de alta importancia para la salud pública, se presenta una necesidad urgente de implementar diagnósticos serológicos para determinar el número aproximado de infecciones y conocer el estado actual de la enfermedad en el país.

3. Hipótesis.

Mediante la implementación de los ensayos serológicos adecuados se podrá determinar el número aproximado de infecciones por Sars-CoV-2 en animales de compañía y se conocerá el estado actual de la enfermedad en el país.

4. Objetivo general.

Evaluar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el Sars-CoV-2, a partir de muestras de perros y gatos de diferentes regiones del país, mediante la implementación de técnicas serológicas para determinar la seroprevalencia en México.

5. Objetivos específicos.

1. Realizar el aislamiento en cultivo celular del virus Sars-CoV-2 a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos.
2. Confirmar el aislamiento del virus Sars-CoV-2 mediante la presencia de efecto citopático, reacción en cadena de la polimerasa (RT-qPCR) y secuenciación.
3. Implementar y estandarizar la técnica de Microneutralización (MN) y Neutralización por Reducción de Placas al 90% (PRNT90).

6. Material y métodos.

6.1 Diseño experimental.

El presente estudio se realizó en el 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). Este laboratorio es reconocido como el único en el área de sanidad animal en México que cuenta con la infraestructura para la manipulación de patógenos de alto impacto como fiebre aftosa, influenza aviar, influenza pandémica H1N1, encefalitis equina y Sars-CoV-2, entre otros.

En esta investigación se estandarizaron dos metodologías: MN y PRNT90. La técnica PRNT90 se basa en una adaptación del procedimiento utilizado por el Departamento de Microbiología e Inmunología del Centro Médico de la Universidad de Texas (UTMB) (Muruato et al., 2020), y la prueba de MN se implementó y estandarizó de acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) (Bewley et al., 2021; Perera et al., 2020).

6.2 Muestras de suero humano.

Las muestras serológicas humanas fueron utilizadas para el desarrollo y validación del PRNT90 y MN. Los testigos negativos fueron muestras de suero de personas sin antecedentes de infección o vacuna (n = 13; 6 hombres y 7 mujeres) y como controles positivos personas vacunadas que presentaban previamente anticuerpos contra la proteína N (n = 47; 29 hombres y 18 mujeres) mediante la prueba ELISA. Los pacientes incluidos en este estudio fueron invitados a participar tras dar su consentimiento informado. Las muestras se tomaron en unidades operativas equipadas con el material necesario y con personal capacitado para ello, que siguió las medidas de prevención de riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos Vacutainer sin anticoagulante, pero con gel separador y se centrifugaron a 527 g durante 10 minutos para obtener sueros. Las muestras

fueron identificadas, almacenadas y transportadas según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Este estudio se realizó siguiendo los principios éticos generales, y el protocolo fue aprobado por el comité de bioética de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, (número de autorización CBE/006/2020).

6.3 Muestras de suero de perros y gatos.

En este estudio se incluyeron 1,111 muestras de suero, de las cuales 1,052 eran de perros y 59 de gatos. Las muestras de suero se obtuvieron en 25 estados de la República Mexicana (Guerrero, Coahuila, Chihuahua, Durango, Michoacán, Nuevo León, Yucatán, Jalisco, Ciudad de México, Estado de México, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Yucatán, Zacatecas, Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Colima y Chiapas), derivado de un muestreo serológico que se realizó para la vigilancia epidemiológica por personal capacitado del SENASICA. Este estudio incluyó cinco fuentes de origen de las muestras de gatos y perros 1) Muestras de animales (domésticos) que estuvieron en contacto con personas positivas al virus por RT-qPCR; 2) muestras de perros y gatos urbanos en libertad que están en contacto frecuente con un número importante de personas porque formaron parte de las jornadas masivas de esterilización quirúrgica canina y felina organizadas por el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades y el SENASICA; 3) muestras de albergues de animales; 4) muestras de perros de las agencias federales de inspección fronteriza; y 5) muestras sin identificación obtenidas a partir de muestras de suero de pacientes recolectadas para diagnósticos de rutina en perros y gatos en el Hospital de Urgencias Veterinarias Borges, en Hermosillo, Sonora. Los animales muestreados se dividieron de acuerdo a su estado de salud y a las diferentes características clínicas descritas por los propietarios en las historias clínicas o que pudieron ser identificadas en el momento de la toma de muestras: enfermedad leve (congestión nasal, fatiga, tos), enfermedad moderada (gastroenteritis, congestión nasal, fatiga, tos, disnea, pirexia, emesis y dolor torácico pulsátil), enfermedad grave (neumonía bilateral y dificultad respiratoria aguda), y sanos (sin semiología clínica), excepto las muestras de suero clasificadas como muestras sin identificar (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características de las muestras de suero de gatos y perros.

Origen	Gatos (n)	Perros (n)	Estado de Origen
Hogar	9	264	Coahuila, Chihuahua, Ciudad de México, Durango, Estado de México, Michoacán, Nuevo León, Puebla, Yucatán y Jalisco.
Calle	13	142	Chihuahua, Ciudad de México, Guerrero, Estado de México, Nuevo León, Puebla, Quintana Roo y Yucatán.
Refugio	6	118	Estado de México, Ciudad de México, Puebla y Yucatán.
Agencias federales de inspección fronteriza	0	50	Aguas Calientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Colima, Chiapas, Chihuahua, Ciudad de México, Durango, Jalisco, Estado de México, Nuevo León, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Yucatán y Zacatecas.
Muestras de suero no identificadas	31	478	Sonora.

Las muestras de sangre se obtuvieron por la vena cefálica o yugular (aproximadamente 3-5 ml) utilizando tubos Vacutainer® sin anticoagulante, pero con gel separador, se centrifugaron a 527 g para obtener el suero y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Se registraron los datos relativos a la ubicación geográfica, la especie, el estado de salud del animal, el sexo, la edad y si estuvieron en contacto estrecho con personas positivas al Sars-CoV-2.

Las muestras se recogieron en los meses finales del año 2020 hasta diciembre del 2021, durante la primera, segunda y tercera oleada de brotes de COVID-19 en México, donde las subvariantes predominantes fueron B.1.1.519, B.1.640.1, Delta (B.1.617.2) y Ómicron (B.1.1.529).

La recolección de estas muestras siguió los lineamientos establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio perteneciente a la CPA-SENASICA (número de autorización CICUAL-CPA-001-2022) y CEI/005-2/2020.

Las muestras fueron procesadas en el 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).

6.4 Línea celular.

Las células Vero C1008 (Vero 76, clon E6, Vero E6) (ATCC-CRL-1586) se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco®, n° de cat. 11995-065), con un 5% de suero fetal bovino (FBS) (ATCC n° de cat. 30-2020). El suero se sometió a radiación gamma con cobalto 60 y se inactivó a 56°C durante una hora. El medio se complementó con una suspensión de penicilina-estreptomicina-anfotericina B al 2% (× 100) Sigma (N° de cat. A5955-100ML).

6.5 Virus.

Los virus hCoV-19/México/CPALB32021036/2020 (GISAID: EPI_ISL_11988445) y Sars-CoV-2 /human/Mex/CPALBS32021032/2022 se utilizaron para evaluar la capacidad de neutralización de muestras de suero por MN y PRNT90.

Los virus fueron aislados y caracterizados en las instalaciones del LBS3 de CPA/SENASICA a partir de hisopados nasofaríngeo de origen humano confirmado como positivo por RT-qPCR y secuenciación genómica. Los virus mostraron un 99,9% de identidad con la secuencia de referencia Wuhan-Hu-1 (GenBank: NC_045512.2) y un 99,9% de identidad con la secuencia Sars-CoV-2 /human/USA/CA-CDC-STM-B8VEK3CPH/2022 (GenBank: OM464899.1) identificada como la subvariante Ómicron (BA.1). Los virus fueron seleccionados por su alta capacidad de infección (efecto citopático evidente y formación de placas líticas). Se replicó en células Vero C1008 y se preparó un stock a partir del tercer pase viral, se fraccionó en alícuotas de 0.5 ml y se almacenó en nitrógeno líquido a -196°C. El virus se tituló en placas de 96 pocillos para la técnica MN y en placas de 6 pocillos para la técnica PRNT90. Para ambas técnicas, se realizaron diluciones dobles seriadas empezando por la dilución 101 hasta la dilución 108 para obtener el DICC50%, con observación diaria durante 72 h. El título se determinó mediante el método de Reed y Muench (Reed et al., 1938).

6.6 RT-qPCR.

La RT-qPCR en tiempo real fue utilizada para la confirmación de los aislamientos virales y las muestras de animales de compañía se basó en la detección de las regiones del Sars-CoV-2 con el uso de los primers N1, N2 y RP (2019-nCoV PC y RP) (Cuadro 4). Se utilizó un kit de ensayo y detección de sonda CDC qPCR para el nuevo coronavirus Sars-CoV-2 (2019-nCoV) (sondeo de PCR-fluorescencia) con un sistema de PCR rápida en tiempo real 7500 (Thermo Fisher Scientific®) y un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories®).

Cuadro 4. Primers y Probes utilizados para el diagnóstico de Sars-CoV-2 por la técnica de RT-qPCR.

Nombre del primer	Descripción del primer	Secuencia de oligonucleótidos (5'>3')
2019-nCoV_N1-F	2019-nCoV_N1 Forward Primer	GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT
2019-nCoV_N1-R	2019-nCoV_N1 Reverse Primer	TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG
2019-nCoV_N1-P	2019-nCoV_N1 Probe	FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ1
2019-nCoV_N1-P	2019-nCoV_N1 Probe	FAM-ACC CCG CAT /ZEN/ TAC GTT TGG TGG ACC-3IABkFQ
2019-nCoV_N2-F	2019-nCoV_N2 Forward Primer	TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA
2019-nCoV_N2-R	2019-nCoV_N2 Reverse Primer	GCG CGA CAT TCC GAA GAA
2019-nCoV_N2-P	2019-nCoV_N2 Probe	FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-BHQ1
2019-nCoV_N2-P	2019-nCoV_N2 Probe	FAM-ACA ATT TGC /ZEN/ CCC CAG CGC TTC AG-3IABkFQ
RP-F	RNase P Forward Primer	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G
RP-R	RNase P Reverse Primer	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT
RP-P	RNase P Probe	FAM – TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG – BHQ-1
RP-P	RNase P Probe	FAM-TTC TGA CCT /ZEN/ GAA GGC TCT GCG CG-3IABkFQ

(CDC, 2020).

6.7 Secuencia genómica.

La técnica de secuenciación genómica utilizada para la confirmación de los aislados virales se realizó preparando las bibliotecas genéticas mediante el protocolo Nextera XT®, siguiendo las especificaciones del producto. Las muestras se fragmentaron por marcaje, obteniendo cadenas cortas de ADN con tamaños de aproximadamente 500 pb. Los fragmentos resultantes se sometieron a un proceso de ligadura de índice y se amplificaron siguiendo las condiciones de ciclado específicas del protocolo.

La purificación de los fragmentos se realizó con el sistema de perlas Agencourt Ampure XP (Beckman Coulter™).

Una vez obtenidas las bibliotecas genéticas, se analizó la calidad mediante electroforesis capilar, utilizando el equipo 2100 Bioanalyzer®, y finalmente las muestras fueron secuenciadas con el equipo Miseq® de Illumina® con extremos pareados.

6.8 Prueba de neutralización de la reducción de la placa al 90% (PRNT90).

Se utilizaron placas de cultivo celular de seis pocillos con fondo plano (NEST®, n° de cat. 07-6006) y se cultivaron células VERO C1008 a una concentración de $1,5 \times 10^6$ células/pocillo entre 12 y 18 h antes de realizar el ensayo. Normalmente, el día de la prueba, las células mostraban una confluencia del 90% al 100%. Se inactivaron las muestras de suero y se hicieron diluciones dobles desde la dilución 1:10 hasta la dilución 1:5120 en DMEM (Gibco® Cat. 11995-065) complementado con un 2% de SFB (ATCC®, Cat. No. 30-2020) y un 2% de suspensión de penicilina-estreptomicina-anfotericina B ($\times 100$) (SIGMA, Cat. No. A5955-100ML).

La dilución del virus de trabajo se ajustó a 30-40 unidades formadoras de placas (UFP) por pocillo, lo que corresponde a una dilución de 10^4 del virus semilla. Para cada muestra de suero diluida, se añadió el virus de trabajo en una proporción de 1:2 y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 1h. Además, se hicieron las diluciones correspondientes para verificar el título viral e interpretar el PRNT90 en cada experimento. Para ello, se utilizaron cinco diluciones decuples seriadas del virus de trabajo de 10^1 a 10^5 . Tras la incubación, se retiró el medio de mantenimiento de las placas de seis pocillos previamente sembradas con células VERO C1008, y se añadieron 200 µl de la mezcla virus-suero. Asimismo, se añadieron 100 µl de las diluciones correspondientes a la dilución del virus para verificar el título viral, y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 60 min. Durante este tiempo, se homogeneizó el contenido de los pocillos cada 20 min.

Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 2 ml de agarosa LE al 1,6% y SFB MEM 2X al 8% (Gibco® Cat. No. 2277357) más antibiótico al 2%, se dejaron solidificar y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 h. Por último, se añadió a cada pocillo 1 ml de solución de rojo neutro (0,33%; Sigma-Aldrich® Cat. No. N2889-100ML) diluida al 0,058% en DPBS (1X) (Gibco® Cat. No. 14190-136). Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 4-6 h. Posteriormente, se retiró la solución de rojo neutro y se procedió a la lectura e interpretación de los resultados.

Las muestras se consideraron positivas cuando una dilución de suero de al menos 1:10 redujo la formación de placas líticas de Sars-CoV-2 en no menos del 90% en comparación con el testigo (Muruato et al., 2020).

Para la preparación de la solución de agarosa LE al 1,6% (Affymetrix® Cat. No. 32802-500GM), primero se disolvió la agarosa en agua destilada estéril en un microondas durante 2 min y se colocó en un baño de agua a 56°C durante 30 minutos. Posteriormente, se transfirió a un baño de agua a 42°C con 2X MEM, 8% SFB y 2% de antibiótico y se incubó durante 10 min. Finalmente, la agarosa y el MEM 2X se mezclaron a partes iguales, se incubaron durante 10 minutos y se añadieron a los pocillos. La preparación de la agarosa se realizó durante los 60 min de incubación de la mezcla de suero y virus con las células VERO C1008 para hacer coincidir los tiempos y evitar que la agarosa se solidificara prematuramente (Figura 6).

6.9 Microneutralización.

Las células de la línea VERO C1008 se cultivaron a una concentración de $1,5 \times 10^5$ ml en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Las células se prepararon con 12-18 horas de antelación para alcanzar una confluencia del 70 al 80%. Posteriormente, se realizó una dilución inicial 1:10 con los sueros (previamente inactivos) en placas de 96 pocillos con fondo plano (Corning® Cat. No. CLS3585-50EA). La solución de dilución consistió en un medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco® Cat. No. 11995-065) complementado con un 2% de FBS (ATCC, Cat. No. 30-2020) y un 2% de antibiótico penicilina-estreptomicina-amfotericina B en suspensión ($\times 100$) (SIGMA, Cat. No. A5955-100ML). Se realizaron diluciones seriadas dobles con 50 μ l hasta la dilución 1:5,120. Posteriormente, se añadieron 50 μ l de virus ajustados a una concentración de 100 DICC_{50%} y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 60 min. Tras la incubación, se transfirieron 100 μ l de la mezcla de suero y virus a placas de 96 pocillos con células Vero, se añadieron 100 μ l de DMEM con 2% de FBS y se incubaron las células a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 h. Finalmente, se realizó la lectura e interpretación de los resultados. Para verificar el título viral utilizado en la MN, se hicieron diluciones decuples seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) del virus ajustado a 100 DICC_{50%}, y se transfirieron 50 μ L a las placas con células Vero. Las muestras se consideraron positivas cuando una dilución de suero de al menos 1:10 no neutralizaba el efecto citopático del 100 % del virus ajustado a 100 DICC_{50%} (Bewley et al., 2021; Perera et al., 2020; Zhang et al., 2020) (Figura 6).

6.10 Testigos positivos y negativos.

Los controles positivos utilizados para las pruebas de PRNT90 y MN fueron antisueros positivos a Sars-CoV-2 producidos en cobayos (*Cavia porcellus*), los cuales fueron inoculados a partir la de lisis de cultivo celular con la cepa ancestral (hCoV-19/México/CPALB32021036/2020) y la subvariante Ómicron BA.1 (hCoV-19/México/CPALBS32021032/2022). Ambos virus se ajustaron a 100 DICC_{50%}, los cuales se inactivaron con rayos gamma de cobalto-60 (60Co), y se preparó una emulsión utilizando Montanide ISA™ 51 (Aucoeurier et al., 2002).

Estos dos prototipos de vacunas inactivas emulsionadas fueron utilizados para realizar tres inmunizaciones por la vía intramuscular con 1 ml en el miembro pélvico izquierda de cada animal con una diferencia de tiempo de 21 días en la primera vacunación y 10 días entre la segunda y tercera, esto con el fin de aumentar la producción y niveles de anticuerpos en los cobayos (*cavia porcellus*).

La colecta de sangre se realizó según lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y autorizado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio perteneciente a la CPA-SENASICA (número de autorización CICUAL-CPA-001-2022). Para confirmar la presencia de anticuerpos contra el Sars-CoV-2 se utilizó el kit comercial de ELISA ID Screen® Sars-CoV-2 Double Antigen Multispecies ELISA Kit. Como control negativo, se utilizó un suero de perro negativo para RT-qPCR y negativo para anticuerpos confirmado por ELISA con el kit comercial de ELISA ID Screen® Sars-CoV-2 Double Antigen Multispecies ELISA Kit.

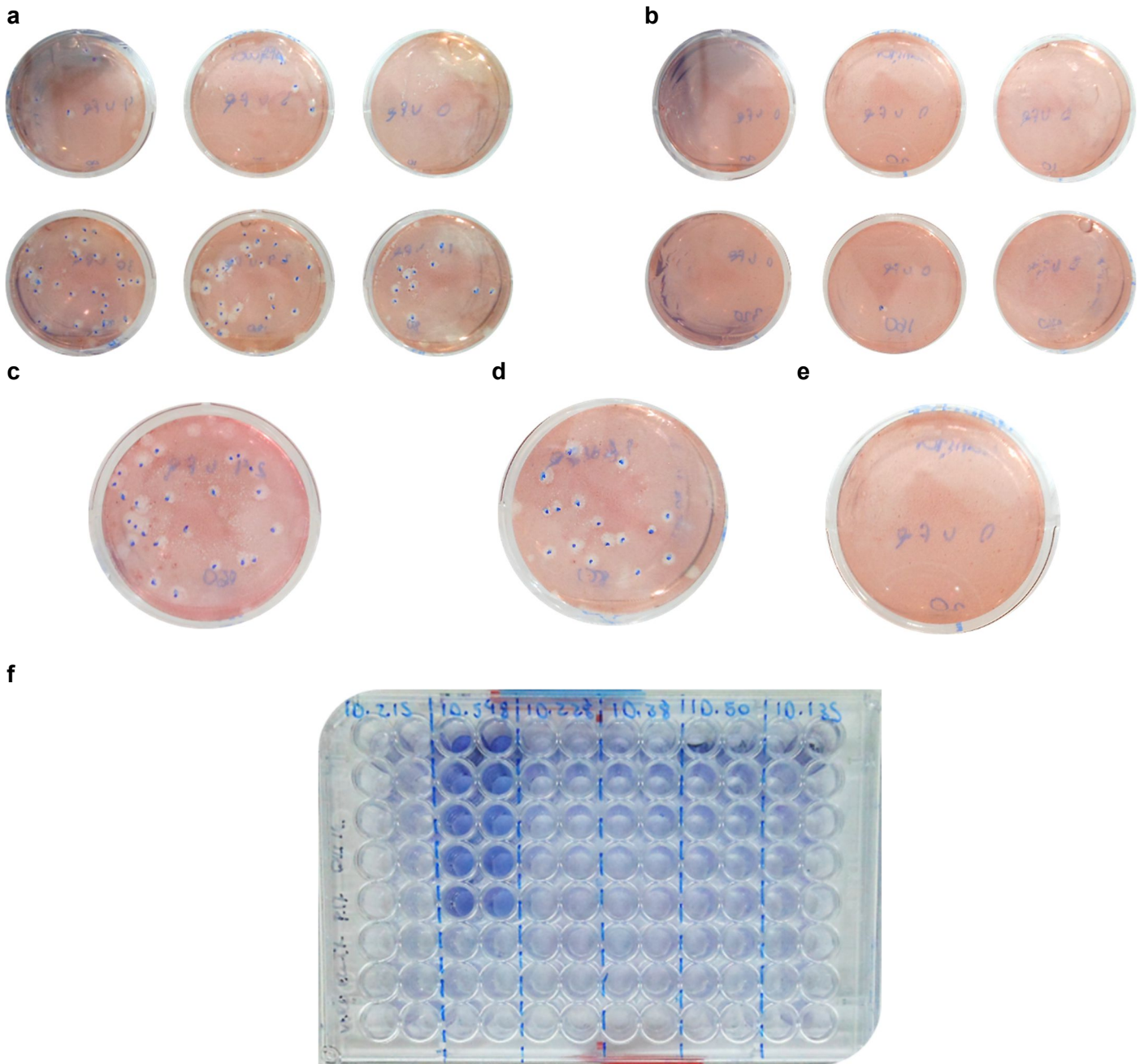


Figura 6. Placas representativas de la prueba PRNT90. a. Muestra de suero humano positiva, ID 1041 con un título 1:10. **b.** Muestra de suero humano positiva, ID 688 con un título > 1:640. **c.** Ejemplo de un pozo PRNT90 sin neutralización. **d.** Ejemplo de un pozo PRNT90 que muestra una neutralización parcial. **e.** Ejemplo de un pozo PRNT90 mostrando neutralización. **f.** Ejemplo de una placa de 96 pozos, teñida con violeta de cristal al 0,5%, para la representación visual de la técnica de MN. La presencia del monostrato celular completo teñido con violeta de cristal indica la ausencia de CE/presencia de CE.

6.11 Análisis estadístico.

La correlación entre MN y PRNT90 se realizó con el coeficiente de correlación de Pearson utilizando el programa estadístico IBM® SPSS® Statistics versión 25 y el programa GraphPad Prism versión 8. En todos los casos, un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

7. Resultados.

7.1 Aislamiento, titulación viral y preparación de semillas del virus del Sars-CoV-2 para las pruebas MN y PRNT.

El aislamiento del virus Sars-CoV-2 se obtuvo a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos de pacientes humanos provenientes de la Ciudad de México que resultaron positivos por RT-qPCR y secuenciación genómica. Se realizaron cuatro pases ciegos en la línea celular VERO C1008, utilizando botellas de cultivo celular de 25 cm² (Corning® Cat. No. 430168) con una confluencia del 80 %. La infección de las células se realizó con 200 µl de estas muestras, observándolas cada 24 h para identificar la presencia del efecto citopático (EC). El EC del virus hCoV-19/México/CPALB32021036/2020 se detectó a las 48 h postinoculación del segundo pase ciego en más del 80 % del monostrato celular. El EC consistió en un cambio en la morfología celular, aglomeración de células redondeadas y lisis total de la monocapa celular (Figura 7). Se cosechó el sobrenadante a las 72 h y se verificó la presencia del virus mediante RT-qPCR (datos no mostrados) y secuenciación genómica (GISAID: EPI_ISL_11988445). La secuencia obtenida se subió en la plataforma GISAID.

La semilla de trabajo se preparó a partir del tercer pase del virus y se tituló por el método de Reed y Muench (Reed et al., 1938). El virus semilla tenía un título de $10^{3.55}$ DICC₅₀ y 10^4 PFU, ambos titulados a punto final.

En el caso de la subvariante Ómicron (BA.1), el EC se detectó a los 6 días postinoculación del segundo pase ciego, presentando un EC del 50 % del monostrato celular. La semilla de trabajo se preparó a partir del cuarto pase del virus y se tituló (Reed et al., 1938), presentando un título de 10^4 DICC_{50%} y 10^5 UFP, ambos titulados a punto final. El EC se presentó de la misma forma que en el caso del virus descrito anteriormente.

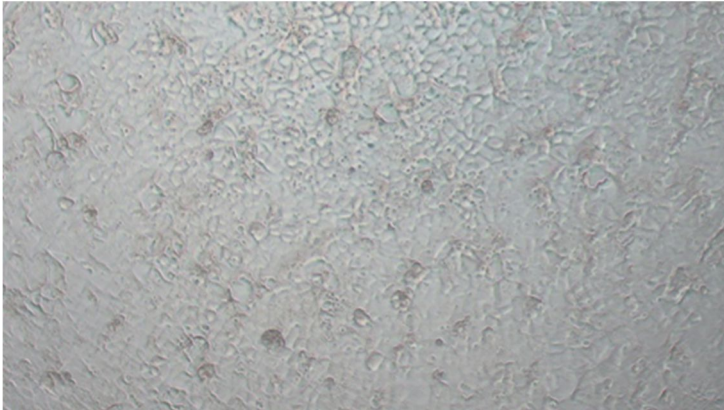
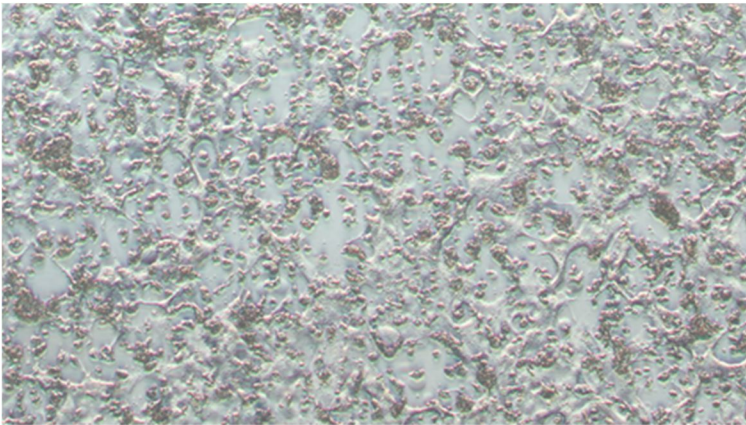
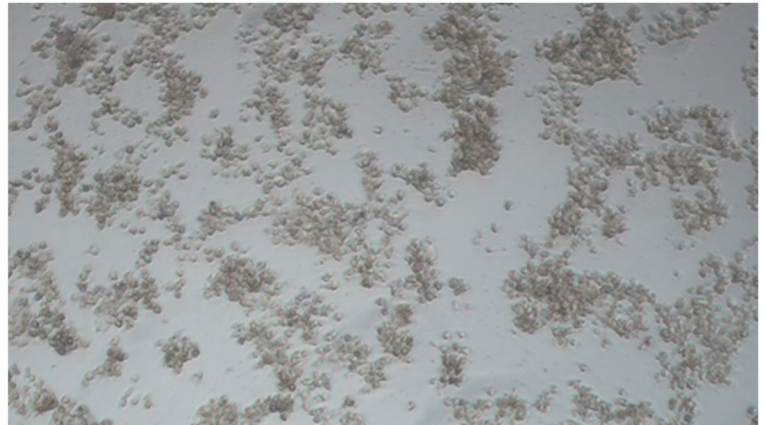
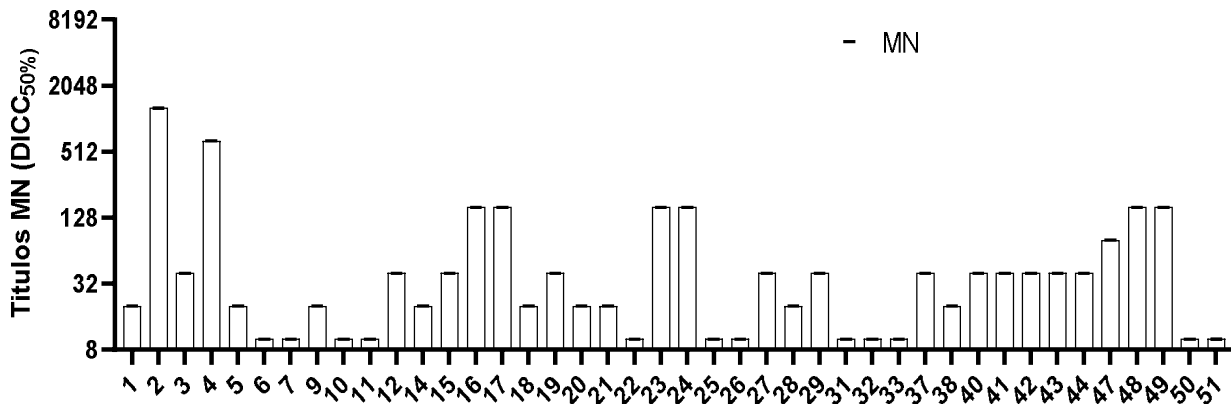
a**b****c****d**

Figura 7. Efecto citopático del virus Sars-CoV-2. La figura muestra el efecto del virus Sars-CoV-2 (hCoV-19/México/CPALB32021036/2020.) sobre la línea celular VERO C1008. El sobrenadante del tercer pasaje (200 uL) se inoculó en el monostrato celular al 80% de confluencia y se dejó durante 60 min en incubación. Posteriormente, se añadió DMEM suplementado con 2% de SFB y 2% de antibióticos y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 h. **a.** Testigo negativo, células no infectadas; **b.** células con 24 h de infección; **c.** células con 48 h de infección, y **d.** células con 72 h de infección. Microscopía de contraste de fase. Objetivo 10X, aumento total a 100X.

7.2 Análisis de anticuerpos neutralizantes en muestras humanas por MN y PRNT90.

De las 60 muestras de suero humano, 13 correspondían a individuos negativos, que no tenían antecedentes de infección o vacunación, no presentaban anticuerpos determinados por una prueba ELISA (datos no mostrados) y eran negativos a la RT-qPCR. Las muestras positivas (n = 47) correspondían a personas positivas vacunadas e infectadas (n = 18) o sólo vacunadas (n = 29). El grupo positivo incluía a personas que habían recibido alguna de las siguientes vacunas: Sputnik V®, AstraZeneca®, Pfizer®, Sinovac® o Cansino®. La figura 8 muestra que el título de los sueros positivos fluctuó entre 1:10 y 1:1,280 con la prueba MN y de 1:10 a 1: 5,120 por PRNT90. La muestra de suero que presentó el mayor título fue 1:5,120 por PRNT90 y 1: 1,280 por MN, presentando dos logaritmos de diferencia entre ambos resultados. Esta diferencia se observó en la mayoría de los sueros, y en todos los casos, los títulos fueron más altos con la prueba PRNT90 que con la prueba MN. Los títulos más bajos observados fueron de 1:10 para ambas técnicas (punto de corte). El número total de muestras humanas positivas por las técnicas PRNT90 y MN fue de 42 (Figura 8).

a



b

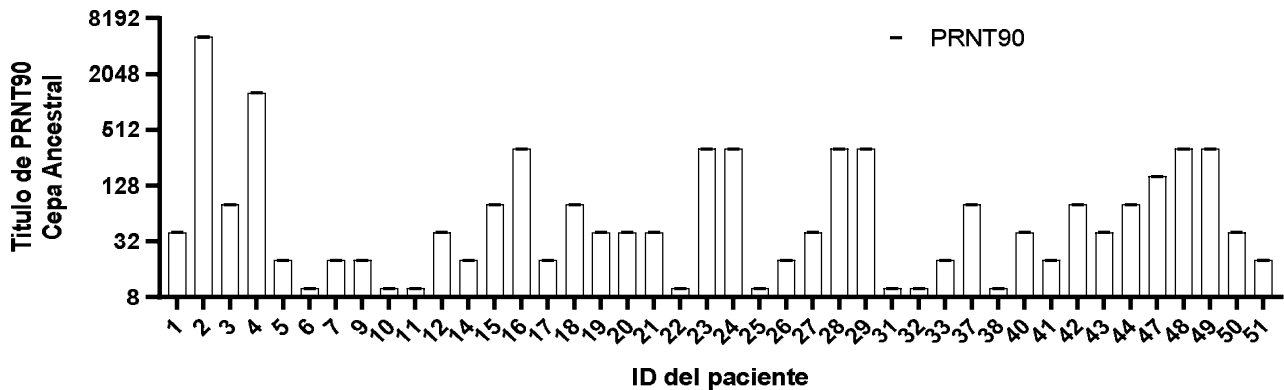


Figura 8. Título de PRNT90 y MN en muestras humanas utilizando la cepa ancestral. La figura muestra el título de MN (a) y PRNT90 (b) de las muestras positivas (n = 42). Las muestras con título

>1:10 se consideraron positivas; los títulos fluctuaron entre 1:10 y 1:1,280 con la prueba MN y de 1:10 a 1: 5,120 con la PRNT.

El análisis de correlación de Pearson reveló una correlación muy estrecha entre ambas técnicas ($p > 0,0001$; $r = 0,957$) (Figura 9). De los individuos previamente identificados como positivos que presentaron resultados negativos, cuatro de ellos fueron muestreados en la semana siguiente a la aplicación de su primera dosis de vacuna, y el otro tenía antecedentes de uso de inmunosupresores.

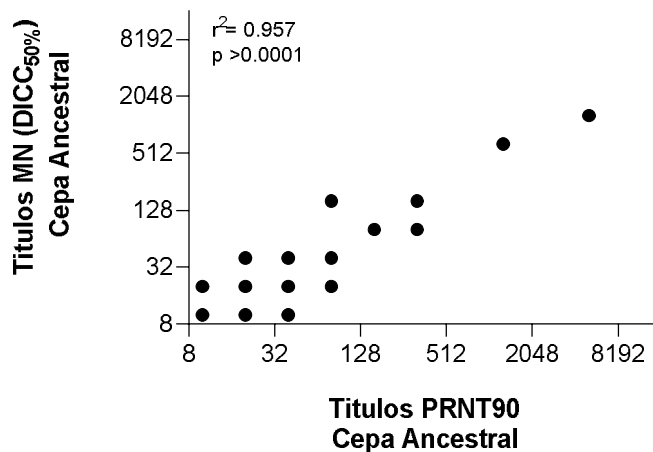


Figura 9. Correlación de Pearson entre la técnica PRNT90 y la MN utilizando la cepa ancestral. Correlación entre los títulos de neutralización de muestras de suero humano entre la técnica PRNT90 y la MN. PRNT90: prueba de neutralización por reducción de placas; MN: Microneutralización; R: coeficiente de Pearson; DICC_{50%}: dosis de infección en cultivo celular al 50%. El análisis de correlación de Pearson con un valor de ($p > 0,01$) se consideró significativo.

7.3 Análisis de anticuerpos neutralizantes en muestras de perros y gatos mediante las pruebas MN y PRNT90.

En este estudio se incluyeron 1,111 sueros de gatos (n=59) y perros (n=1,052) obtenidos de 25 estados de la República Mexicana (Figura 10). Los estados con muestras positivas fueron Puebla, Estado de México, Sonora, Ciudad de México, Chiapas y Quintana Roo (Figura 10). Sonora presentó el mayor número de muestras positivas (26 de 494), seguido del estado de Puebla (6 de 61) (Figura 10)(cuadro 5)(cuadro 6).

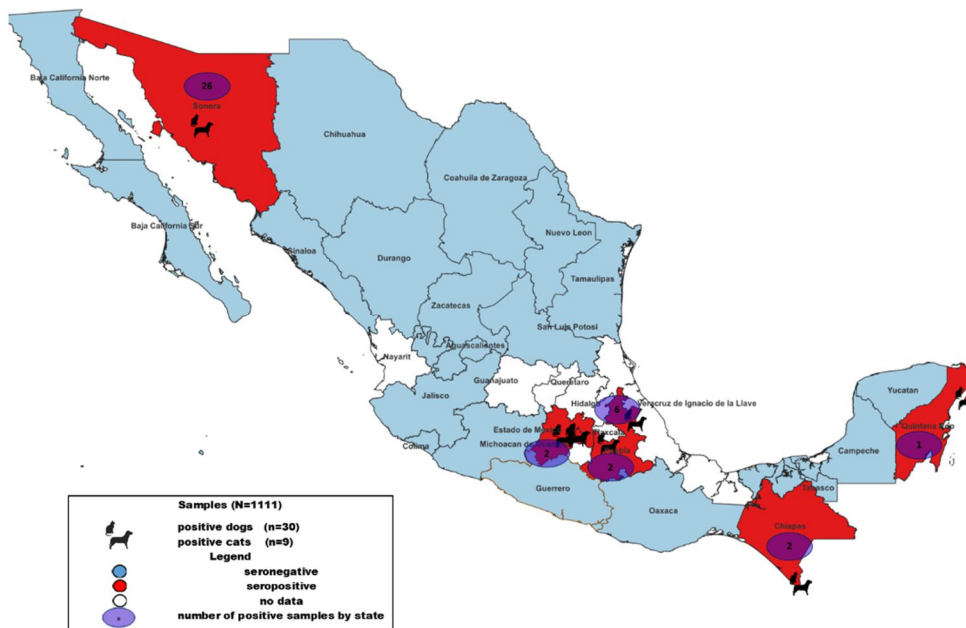


Figura 10. Mapa de México con la distribución de las muestras de perros y gatos positivos al Sars-CoV-2 por MN y PRNT90. La ilustración de los perros y gatos representa las ubicaciones de las muestras, el color rojo representa los estados con muestras positivas y el color azul representa los estados con muestras negativas identificadas en este estudio.

El primer grupo incluyó 273 muestras de animales (domésticos) que viven en estrecho contacto con personas; 264 corresponden a perros y nueve a gatos. Fueron analizadas 113 muestras por RT-qPCR, y sólo tres fueron positivas (**545**: gen N1, Ct 37,51 y gen N2, Ct 38,28; **549**: gen N1, Ct 33,44 y gen N2, Ct 37,46; **546**: gen N1, Ct 30,14 y gen N2, Ct 32,01).

El criterio para realizar una prueba RT-qPCR fue que el propietario tuviera una prueba RT-qPCR positiva y que el animal presentara algún signo de COVID-19. Según este criterio, 160 muestras de animales no se analizaron por RT-qPCR. Sin embargo, todas las muestras fueron analizadas por PRNT90 y MN. Los resultados indicaron que, en este grupo, cinco muestras presentaron nAbs contra la cepa ancestral del Sars-CoV-2, tres gatos (33,3%) y

dos perros (0,73%) (Cuadro 5 y Cuadro 6). En el caso de los nAbs contra la subvariante Ómicron BA.1, tres gatos fueron positivos, pero los perros fueron negativos. Los títulos contra la cepa ancestral en los gatos fueron más altos que contra la subvariante Ómicron BA.1.

Las tres muestras positivas a la RT-qPCR tenían anticuerpos neutralizantes en MN y PRNT90 (Cuadro 5 y Cuadro 6). muestra **ID. 545** e **ID. 546** no presentaron semiología clínica; sin embargo, la muestra con **ID. 549** fue identificada como una enfermedad grave, presentando dificultad respiratoria aguda y alteraciones de la función pulmonar tres semanas antes del muestreo (sin confirmar la presencia de neumonía bilateral). El animal muestreado presentaba un estado grave días después del muestreo; por este motivo, los propietarios aplicaron un procedimiento de eutanasia.

El segundo grupo incluyó 155 muestras de perros urbanos en libertad (n=142) y gatos (n=13). En este caso, no se realizó la RT-qPCR porque los animales no presentaban signos de la enfermedad. El análisis de estas muestras reveló dos perros (1,4%) con nAbs contra la cepa ancestral (Cuadro 6) y la subvariante Ómicron BA.1; sin embargo, un perro fue negativo contra la subvariante Ómicron BA.1 con la prueba MN. Los gatos de este grupo fueron negativos a los nAbs.

El tercer grupo consistió en muestras obtenidas de refugios (n = 124): 118 de perros y 6 de gatos. Ninguna de estas muestras se analizó por RT-qPCR porque no había signos de la enfermedad cuando se recogieron las muestras. Los resultados mostraron un perro (0,84%) y un gato (16,6%) positivos para nAbs contra la cepa ancestral y la subvariante Ómicron BA.1; sin embargo, el perro fue negativo para la subvariante Ómicron BA.1 con la prueba de MN.

El cuarto grupo incluye 50 muestras de perros de las agencias federales de inspección fronteriza. En este caso, no se realizó la prueba RT-qPCR. Cuatro muestras (8%) fueron positivas para nAbs contra la cepa ancestral y la subvariante Ómicron BA.1.

El quinto grupo incluyó 494 muestras no identificadas obtenidas a partir de muestras de suero de pacientes recolectadas para diagnósticos de rutina en el Hospital de Urgencias Veterinarias Borges (n= 478 de perros y n= 31 de gatos). En este caso, no se realizó el diagnóstico por RT-qPCR de los pacientes ni se disponía de un historial clínico. Los resultados mostraron 21 perros (4,3%) y 5 gatos (16,6%) con nAbs contra la cepa ancestral. En cuanto a los nAbs contra la subvariante Ómicron BA.1, sólo 15 perros y 5 gatos fueron positivos. Sin embargo, utilizando la prueba de MN, tres gatos y cuatro perros fueron negativos para la subvariante Ómicron BA.1.

Se observó que los títulos eran más altos con la prueba PRNT90 que con la prueba MN, independientemente de si se utilizaba la cepa ancestral o la subvariante Ómicron BA.1. Los títulos más altos observados en este estudio fueron 1:640 con PRNT90 y 1:320 con MN con la cepa ancestral, pero más bajos (1:320 y 1:160 para PRNT90 para MN, respectivamente) cuando se utilizó la subvariante Ómicron BA.1. Algunos gatos o perros con títulos bajos contra la cepa ancestral fueron negativos para Ómicron BA.1. Los nAbs contra la subvariante Ómicron presentan hasta tres logaritmos de diferencia en las muestras de gatos y perros en comparación con la cepa ancestral, especialmente con la prueba MN. Sin embargo, incluso con esta diferencia de sensibilidad, ambas pruebas mostraron una fuerte correlación ($r^2 = 0,8109$; $p < 0,0001$) (Figura 11). Estos resultados sugieren que la técnica

PRNT90 es más sensible que la prueba MN, aunque la prueba MN es más sencilla de realizar. Además, los resultados sugieren que los nAbs en gatos y perros pueden neutralizar a Ómicron BA.1 pero con menor potencia.

Cuadro 5. Seroprevalencia de anticuerpos neutralizantes contra el Sars-CoV-2 en gatos.

ID	Origen	Estado	Estado de salud	PRNT90 Cepa ancestral	MN Cepa ancestral	PRNT90 Ómicron (BA.1)	MN Ómicron (BA.1)
546	Hogar	Puebla	Sano	1:320	1:320	1:160	1:40
547	Hogar	Puebla	Sano	1:640	1:80	1:320	1:40
548	Hogar	Puebla	Sano	1:160	1:160	1:80	1:20
476	Refugio	Estado de México	Sano	1:40	1:20	1:40	1:10
608	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:40	1:10	1:10	Negativo
615	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:160	1:40	1:40	1:10
620	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:40	1:10	1:10	Negativo
626	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:40	1:20	1:20	1:10
1049	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:40	1:10	1:20	Negativo

Cuadro 6. Seroprevalencia de anticuerpos neutralizantes contra el Sars-CoV-2 en perros.

ID	Origen	Estado	Estado de salud	PRNT90 Cepa ancestral	MN Cepa ancestral	PRNT90 Ómicron (BA.1)	MN Ómicron (BA.1)
545	Hogar	Puebla	Sano	1:40	1:10	Negativo	Negativo
549	Hogar	Puebla	Enfermedad grave	1:20	1:10	Negativo	Negativo
539	Calle	Ciudad de México	Sano	1:80	1:20	1:40	1:10
538	Calle	Puebla	Sano	1:40	1:20	1:10	Negativo
483	Refugio	Estado de México	Moderadamente enfermo	1:40	1:10	1:10	Negativo
688	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:640	1:320	1:320	1:160
698	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:40	1:10	1:20	1:10
709	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:40	1:10	1:10	Negativo
758	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:160	1:40	1:40	1:10
763	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:40	1:20	1:20	1:10
767	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:40	1:10	1:10	Negativo
774	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:20	1:10	Negativo	Negativo
785	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:40	1:10	1:20	1:10
873	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:40	1:20	1:20	1:10
874	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:20	1:10	Negativo	Negativo
875	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:20	1:10	Negativo	Negativo
885	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:20	1:10	Negativo	Negativo

888	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:40	1:20	1:10	1:10
892	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:320	1:80	1:160	1:40
904	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:20	1:10	Negativo	Negativo
907	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:80	1:20	1:40	1:20
964	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:40	1:10	1:40	1:10
992	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:20	1:10	Negativo	Negativo
1028	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:40	1:10	1:10	Negativo
1041	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:40	1:10	1:10	Negativo
1043	Muestras de suero no identificadas	Sonora	Desconocido	1:40	1:20	1:40	1:10
540	Agencias federales de inspección fronteriza	Chiapas	Sano	1:80	1:40	1:40	1:20
1075	Agencias federales de inspección fronteriza	Ciudad de México	Moderadamente enfermo	1:40	1:10	1:20	1:10
1092	Agencias federales de inspección fronteriza	Quintana Roo	Moderadamente enfermo	1:40	1:40	1:40	1:20
1106	Agencias federales de inspección fronteriza	Chiapas	Sano	1:40	1:10	1:20	1:10

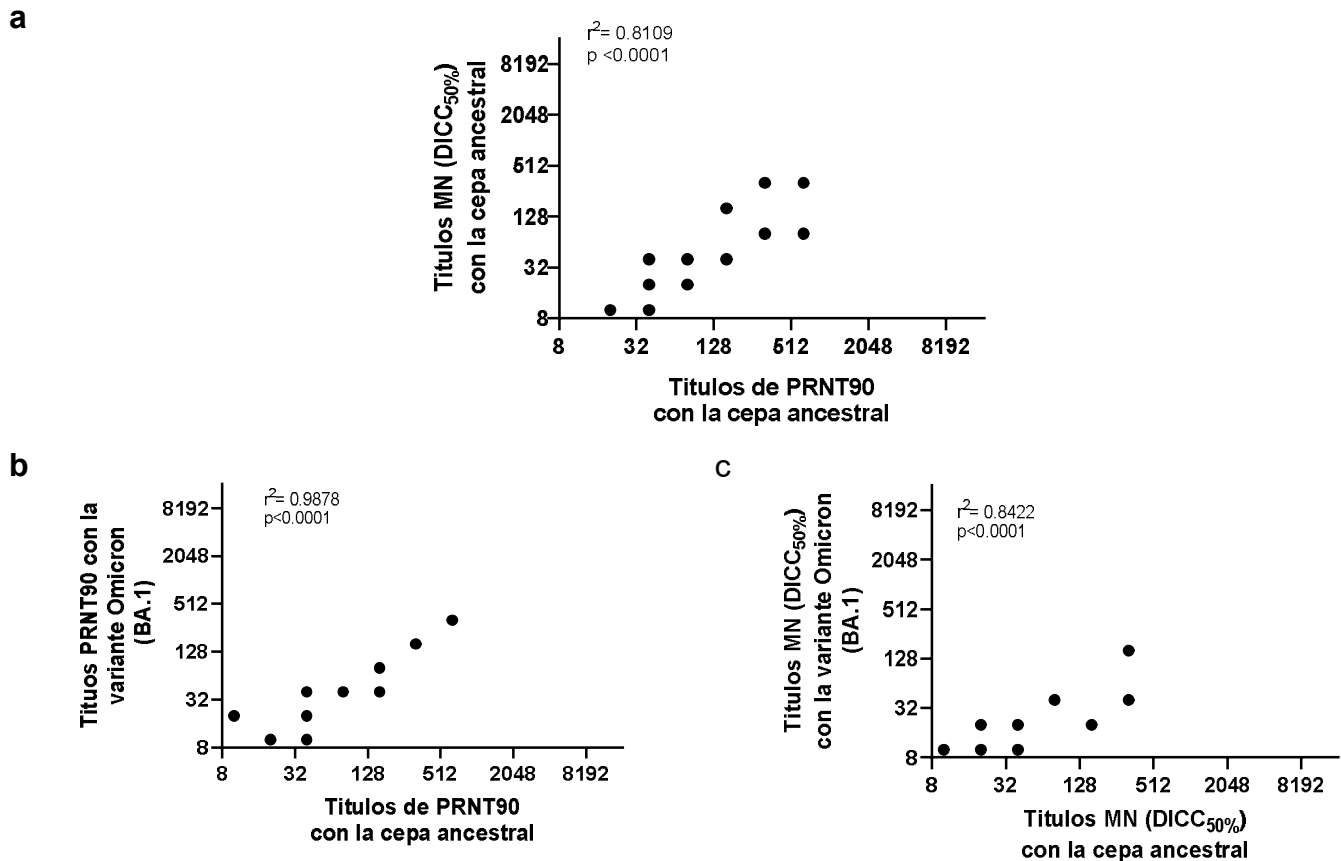


Figura 11. Correlación de Pearson entre PRNT90 vs. MN. **a.** Correlación de Pearson entre los resultados del PRNT90 (cepa ancestral) y MN (cepa ancestral) utilizando muestras de perros ($n = 1,052$) y gatos ($n = 59$). **b.** Correlación de Pearson entre los resultados obtenidos por el PRNT90 (Ómicron (BA.1)) y PRNT90 (cepa ancestral) utilizando muestras positivas de perros ($n = 1,052$) y gatos ($n = 59$). **c.** Correlación de Pearson para los resultados obtenidos por MN (Ómicron (BA.1)) y MN (cepa ancestral) utilizando muestras de perros ($n = 1,052$) y gatos ($n = 59$). MN: microneutralización; PRNT90: Prueba de neutralización por reducción de placa al 90%; El análisis de correlación de Pearson con un valor de ($p > 0,01$) se consideró significativo.

Una observación interesante fue que el testigo positivo producido con la cepa ancestral (CPALBS32021014) y desafiado contra su virus homólogo presentó un título de 1:40 por PRNT90 y 1:20 por MN. Sin embargo, cuando este control fue desafiado contra Ómicron BA.1, se observó una reducción del título, 1:20 por PRNT90 y 1:10 por MN. En el caso del control positivo producido con la subvariante Ómicron BA.1 (CPALBS32022011), el título presentado contra su virus homólogo fue de 1:80 por PRNT90 y de 1:40 por MN. Curiosamente, desafiado contra la cepa ancestral, el título no se modificó, 1:80 para PRNT90 y 1:40 para MN (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados serológicos por la técnica de MN y PRNT90 de los testigos positivos.

ID de los controles positivos	Origen del Antisuero	PRNT90 Cepa ancestral	MN Cepa ancestral	PRNT90 Ómicron (BA.1)	MN Ómicron (BA.1)
CPALBS32021014	Cepa ancestral	1:40	1:20	1:20	1:10
CPALBS32022011	Ómicron (BA.1)	1:80	1:40	1:80	1:40
CPALBS32021014	Cepa ancestral	1:20	1:20	1:20	1:10
CPALBS32022011	Ómicron (BA.1)	1:40	1:20	1:40	1:20
CPALBS32021014	Cepa ancestral	1:40	1:20	1:20	1:10
CPALBS32022011	Ómicron (BA.1)	1:80	1:40	1:80	1:40
CPALBS32021014	Cepa ancestral	1:40	1:20	1:20	1:10
CPALBS32022011	Ómicron (BA.1)	1:80	1:40	1:80	1:40
CPALBS32021014	Cepa ancestral	1:20	1:10	1:20	1:10
CPALBS32022011	Ómicron (BA.1)	1:80	1:40	1:80	1:40

La correlación entre ambas técnicas utilizando la cepa ancestral y la subvariante Ómicron BA.1 fue $r^2 = 0,9878$ ($p < 0,0001$) para PRNT90 y $r^2 = 0,8422$ ($p < 0,0001$) para MN (Figura 10), mostrando una fuerte correlación entre los resultados de ambas técnicas, sugiriendo que, a pesar de una diferencia logarítmica significativa entre los resultados, no había una diferencia significativa, y los resultados estaban estrechamente relacionados utilizando ambos virus.

8. Discusión.

El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de anticuerpos neutralizantes (nAbs) contra el Sars-CoV-2, a partir de muestras de perros y gatos de diferentes regiones del país, mediante la implementación de técnicas serológicas para determinar la seroprevalencia en México. Para ello se analizaron 1,111 muestras, 1,052 correspondientes a perros y 59 a gatos. En general, nuestros resultados demuestran que la seroprevalencia de nAbs contra la cepa ancestral fue del 15.25% en gatos y del 2.85% en perros. La prevalencia de nAbs contra la subvariante Ómicron BA.1 fue del 15,25% en gatos y del 2,09% (22 de 1,052) en perros. Nuestro estudio confirma que los gatos son más susceptibles a la infección por Sars-CoV-2 (Shi et al., 2020). La seroprevalencia encontrada en este estudio fue similar a la de otros países (Calvet et al., 2021; Dias et al., 2021; Laidoudi et al., 2021; Patterson et al., 2020; Stevanovic et al., 2021; Udom et al., 2021; Zhang et al., 2020). En el caso de los perros, la mayoría de los informes coinciden en que la seroprevalencia es menor que en los gatos, pero hay estudios con un porcentaje diverso de seroprevalencia.

La seroprevalencia es importante porque es un excelente parámetro para estimar el número de animales infectados. Sin embargo, en este estudio también confirmamos la presencia de perros infectados. Dos perros y un gato de un hogar dieron positivo a Sars-CoV-2 por RT-qPCR y positivo a nAbs. Los animales estuvieron en contacto con una persona positiva al Sars-CoV-2. Estos resultados confirman que una de las fuentes más frecuentes de infección en los perros son sus propietarios. Este no es el primer informe de infección en

perros en México, ya que anteriormente el SENASICA reportó otro caso a la OMSA (Navarro-López et al., 2022). También es interesante observar que otros perros en contacto con personas infectadas fueron negativos por RT-qPCR, pero positivos para anticuerpos. Una explicación es que el Sars-CoV-2 tenía una baja tasa de replicación en los perros, o que la infección se produjo semanas antes de la recogida de la muestra.

Los nAbs se analizaron con las técnicas PRNT90 y MN, que se emplean ampliamente para detectar anticuerpos contra el Sars-CoV-2 en humanos (Bewley et al., 2021; Muruato et al., 2020; Okba et al., 2020; Perera et al., 2020). Diferentes estudios han mencionado que la PRNT90 es el estándar de oro para confirmar la presencia de anticuerpos contra el Sars-CoV-2 (Okba et al., 2020; Perera et al., 2020). Sin embargo, esta metodología tiene una mayor dificultad técnica. Por ejemplo, se necesita personal altamente capacitado para llevar a cabo la prueba; también tiene costos más altos, y se puede procesar un menor número de muestras en un tiempo determinado. Por el contrario, la MN tiene una menor dificultad técnica y menores costos operativos, y se puede procesar un número más significativo de muestras por prueba, dependiendo de la capacidad de diagnóstico del laboratorio (Bewley et al., 2021). En el caso de los animales, la técnica de PRNT90 no se utiliza habitualmente debido a la dificultad técnica descrita anteriormente. Sin embargo, estudios realizados en Brasil e Italia han utilizado estas pruebas (Calvet et al., 2021; Dias et al., 2021; Patterson et al., 2020). Una observación interesante en este trabajo fue la correlación positiva y alta entre PRNT90 y MN.

En este estudio, encontramos que los gatos tenían títulos de anticuerpos más altos que los perros, lo que coincide con informes anteriores los cuales notifican títulos mayores en gatos en comparación con los títulos de anticuerpos notificados en perros (Dias et al., 2021; Patterson et al., 2020; Stevanovic et al., 2021; Zhang et al., 2020). La seroprevalencia en gatos fue del 15.25% y del 2.85% en perros. Estos porcentajes son similares a los comunicados por otros estudios realizados en China con 14.7% en gatos y 1.69% en perros (Zhang et al., 2020), Tailandia con 1.66% en gatos y 0.36% en perros (Udom et al., 2021), en Brasil con 2% en gatos y 1% en perros (Calvet et al., 2021; Dias et al., 2021), en Francia con 4.3% en perros y 12.5% en gatos (Laidoudi et al., 2021) e Italia con 3.3% en gatos y 5.8% en perros (Patterson et al., 2020), los cuales confirman que los felinos son más susceptibles que los perros. Se ha informado de que muchos perros positivos a la RT-qPCR no sufren seroconversión, lo que conlleva una menor susceptibilidad al virus (Bosco et al., 2020; Shi et al., 2020).

Este estudio mostró una diferencia de dos a tres logaritmos entre los títulos de nAbs en perros y gatos por las técnicas PRNT90 y MN utilizando la cepa ancestral y la Ómicron BA.1. En algunos perros, los nAbs no fueron capaces de neutralizar la Ómicron BA.1. Estos resultados son similares a los observados con los controles positivos. En este caso, los cobayas inmunizados con la cepa ancestral mostraron una respuesta reducida de nAb contra Omicron BA.1. Sin embargo, el control inoculado con Ómicron mostró el mismo título contra la cepa ancestral. Estos resultados sugieren que los perros y gatos infectados pueden reinfectarse con las nuevas variantes como en los humanos (Altarawneh et al., 2022; Cheng et al., 2022; Sheward et al., 2022). Además, estos resultados sugieren que las mutaciones en Ómicron BA.1, y probablemente otras mutaciones, no afectaron a la respuesta contra la cepa ancestral.

Una limitación de este estudio fue que no se dispuso de los resultados de la RT-qPCR para todas las muestras, con la imposibilidad de establecer una correlación entre los animales positivos por RT-qPCR y el PRNT90/MN. En el caso de las muestras obtenidas de animales en hogares con humanos positivos a Sars-CoV-2 (n = 273), 113 muestras pudieron ser analizadas por RT-qPCR, y todas contenían anticuerpos (n = 5). Sin embargo, fue imposible realizar la RT-qPCR en las muestras obtenidas en el refugio, en los animales urbanos en libertad, en las muestras de suero no identificadas o en las agencias federales de inspección fronteriza (n = 838).

Otra limitación del estudio fue el reducido número de muestras de gatos (n=59) en comparación con el número de muestras de perros (n=1052), sin embargo, era importante incluir esta información porque informes anteriores han identificado una mayor susceptibilidad en los gatos que en los perros y se identificó la presencia de nAbs en 9 muestras de suero (Shi et al., 2020).

9. Conclusión.

En este estudio, se implementaron las pruebas PRNT90 y MN para determinar la presencia de a nAbs contra el Sars-CoV-2 en muestras de suero de perros y gatos. Los gatos mostraron una mayor seroprevalencia que los perros, lo que confirma la mayor susceptibilidad a la infección por Sars-CoV-2. Además, este estudio muestra por primera vez la diferencia en los títulos de nAbs en muestras de suero de perros y gatos entre la variante Ómicron BA.1 y la variante ancestral, concluyendo que los títulos contra la variante Ómicron BA.1 son inferiores a los producidos por la variante ancestral.

Hasta la fecha, se desconoce el papel de estos animales en la diseminación del Sars-CoV-2; por lo tanto, es importante establecer estudios seroepidemiológicos que incluyan un número más significativo de animales y otras especies susceptibles que sean animales de compañía, como hurones, hámsteres, etc. Además, los animales de zoológico, especialmente los felinos (Patterson et al., 2020; Williams et al., 2021) y los ciervos (Chandler et al., 2021; Palmer et al., 2021), debido a que son muy susceptibles al Sars-CoV-2. Este estudio estableció el estado actual de la enfermedad en los animales en México.

Queda por investigar si las posibles reinfecciones de perros y gatos pueden aumentar la probabilidad de transmitir la infección a otros animales y a los humanos.

10. Referencias bibliográficas.

- OMSA, W. O. f. A. H. (2021). Follow-up report 4. Retrieved from <https://wahis.OMSA.int/#/report-info?reportId=34006>
- OMSA, W. O. f. A. H. (2022). SARS-COV-2 IN ANIMALS – SITUATION REPORT 11. Retrieved from <https://www.OMSA.int/es/que-ofrecemos/emergencia-y-resiliencia/covid-19/#ui-id-3>
- WHO, W. H. O. (2020). Listings of WHO's response to COVID-19. Retrieved from <https://www.who.int/news/item/29-06-2020-covidtimeline>
- Altarawneh, H. N., Chemaitelly, H., Hasan, M. R., Ayoub, H. H., Qassim, S., AlMukdad, S., . . . Abu-Raddad, L. J. (2022). Protection against the Ómicron Variant from Previous Sars-CoV-2 Infection. *386*(13), 1288-1290. doi:10.1056/NEJMc2200133
- Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S., Nguyen, T. H. O., Chromikova, V., McMahan, M., . . . Krammer, F. (2020). A serological assay to detect Sars-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine*, *26*(7), 1033-1036. doi:10.1038/s41591-020-0913-5
- Ambepitiya Wickramasinghe, I. N., de Vries, R. P., Weerts, E. A., van Beurden, S. J., Peng, W., McBride, R., . . . Verheije, M. H. (2015). Novel Receptor Specificity of Avian Gammacoronaviruses That Cause Enteritis. *J Virol*, *89*(17), 8783-8792. doi:10.1128/jvi.00745-15
- Aucouturier, J., Dupuis, L., Deville, S., Ascarateil, S., & Ganne, V. (2002). Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Review of Vaccines*, *1*(1), 111-118. doi:10.1586/14760584.1.1.111
- Bailey, O. T., Pappenheimer, A. M., Cheever, F. S., & Daniels, J. B. (1949). A MURINE VIRUS (JHM) CAUSING DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS WITH EXTENSIVE DESTRUCTION OF MYELIN : II. PATHOLOGY. *J Exp Med*, *90*(3), 195-212. doi:10.1084/jem.90.3.195
- Bao, L., Gao, H., Deng, W., Lv, Q., Yu, H., Liu, M., . . . Qin, C. (2020). Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 via Close Contact and Respiratory Droplets Among Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 Mice. *J Infect Dis*, *222*(4), 551-555. doi:10.1093/infdis/jiaa281
- Benbacher, L., Kut, E., Besnardeau, L., Laude, H., & Delmas, B. (1997). Interspecies aminopeptidase-N chimeras reveal species-specific receptor recognition by canine coronavirus, feline infectious peritonitis virus, and transmissible gastroenteritis virus. *71*(1), 734-737. doi:doi:10.1128/jvi.71.1.734-737.1997
- Bertzbach, L. D., Vladimirova, D., Dietert, K., Abdelgawad, A., Gruber, A. D., Osterrieder, N., & Trimpert, J. (2021). Sars-CoV-2 infection of Chinese hamsters (*Cricetulus griseus*) reproduces COVID-19 pneumonia in a well-established small animal model. *Transbound Emerg Dis*, *68*(3), 1075-1079. doi:10.1111/tbed.13837
- Bewley, K. R., Coombes, N. S., Gagnon, L., McInroy, L., Baker, N., Shaik, I., . . . Charlton, S. (2021). Quantification of Sars-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. *Nature Protocols*, *16*(6), 3114-3140. doi:10.1038/s41596-021-00536-y
- Bosco-Lauth Angela, M., Hartwig Airn, E., Porter Stephanie, M., Gordy Paul, W., Nehring, M., Byas Alex, D., . . . Bowen Richard, 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. doi:10.1073/pnas.2013102117
- Calvet, G. A., Pereira, S. A., Ogrzewalska, M., Pauvolid-Corrêa, A., Resende, P. C., Tassinari, W. d. S., . . . Menezes, R. C. (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), e0250853. doi:10.1371/journal.pone.0250853
- Chan, J. F., Lau, S. K., To, K. K., Cheng, V. C., Woo, P. C., & Yuen, K. Y. (2015). Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin Microbiol Rev*, 28(2), 465-522. doi:10.1128/cmr.00102-14
- Chandler, J. C., Bevins, S. N., Ellis, J. W., Linder, T. J., Tell, R. M., Jenkins-Moore, M., . . . Shriner, S. A. (2021). Sars-CoV-2 exposure in wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(47). doi:10.1073/pnas.2114828118
- Cheever, F. S., Daniels, J. B., & et al. (1949). A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. *J Exp Med*, 90(3), 181-210. doi:10.1084/jem.90.3.181
- Chen, Y., Guo, Y., Pan, Y., & Zhao, Z. J. (2020). Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 525(1), 135-140. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.071>
- Cheng, S. M., Mok, C. K. P., Chan, K. C., Ng, S. S., Lam, B. H., Luk, L. L., . . . Peiris, M. (2022). Sars-CoV-2 Ómicron variant BA.2 neutralisation in sera of people with Comirnaty or CoronaVac vaccination, infection or breakthrough infection, Hong Kong, 2020 to 2022. 27(18), 2200178. doi:<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.18.2200178>
- Cheng, Y., He, B., Yang, J., Ye, F., Lin, S., Yang, F., . . . Lu, G. (2019). Crystal structure of the S1 subunit N-terminal domain from DcCoV UAE-HKU23 spike protein. *Virology*, 535, 74-82. doi:10.1016/j.virol.2019.06.015
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, Sjöström, H., Norén, & Laude, H. (1992). Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature*, 357(6377), 417-420. doi:10.1038/357417a0
- Dias, H. G., Resck, M. E. B., Caldas, G. C., Resck, A. F., da Silva, N. V., Dos Santos, A. M. V., . . . Dos Santos, F. B. (2021). Neutralizing antibodies for Sars-CoV-2 in stray animals from Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*, 16(3), e0248578. doi:10.1371/journal.pone.0248578
- Feng, Y., & Gao, G. F. (2007). Towards our understanding of SARS-CoV, an emerging and devastating but quickly conquered virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 30(5-6), 309-327. doi:10.1016/j.cimid.2007.05.009
- Freuling, C. M., Breithaupt, A., Müller, T., Sehl, J., Balkema-Buschmann, A., Rissmann, M., . . . Mettenleiter, T. C. (2020). Susceptibility of Raccoon Dogs for Experimental Sars-CoV-2 Infection. *Emerg Infect Dis*, 26(12), 2982-2985. doi:10.3201/eid2612.203733
- García-Salido, A. (2020). Revisión narrativa sobre la respuesta inmunitaria frente a coronavirus: descripción general, aplicabilidad para SARS-COV-2 e implicaciones terapéuticas. *Anales de Pediatría*, 93(1), 60.e61-60.e67. doi:10.1016/j.anpedi.2020.04.016
- GeurtsvanKessel, C. H., Okba, N. M. A., Igloi, Z., Embregts, C. W. E., Laksono, B. M., Leijten, L., . . . Koopmans, M. (2020). Towards the next phase: evaluation of serological assays for diagnostics and exposure assessment. 2020.2004.2023.20077156. doi:10.1101/2020.04.23.20077156 %J medRxiv
- Hamre, D., & Procknow, J. J. (1966). A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med*, 121(1), 190-193. doi:10.3181/00379727-121-30734
- Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of Sars-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*, 41(12), 1100-1115. doi:<https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
- Hassan, S. S., Ghosh, S., Attrish, D., Choudhury, P. P., Aljabali, A. A. A., Uhal, B. D., . . . Brufsky, A. M. (2020). Possible Transmission Flow of Sars-CoV-2 Based on ACE2 Features. *Molecules*, 25(24). doi:10.3390/molecules25245906

- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., . . . Pöhlmann, S. (2020). Sars-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, *181*(2), 271-280.e278. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z.-L. (2021). Characteristics of Sars-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(3), 141-154. doi:10.1038/s41579-020-00459-7
- Huang, X., Dong, W., Milewska, A., Golda, A., Qi, Y., Zhu, Q. K., . . . Sui, J. (2015). Human Coronavirus HKU1 Spike Protein Uses *O*-Acetylated Sialic Acid as an Attachment Receptor Determinant and Employs Hemagglutinin-Esterase Protein as a Receptor-Destroying Enzyme. *89*(14), 7202-7213. doi:doi:10.1128/JVI.00854-15
- Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of Sars-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *23*(1), 3-20. doi:10.1038/s41580-021-00418-x
- Kim, Y.-I., Kim, S.-G., Kim, S.-M., Kim, E.-H., Park, S.-J., Yu, K.-M., . . . Choi, Y. K. (2020). Infection and Rapid Transmission of Sars-CoV-2 in Ferrets. *Cell Host & Microbe*, *27*(5), 704-709.e702. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.023>
- Krempl, C., Schultze, B., & Herrler, G. (1995). Analysis of Cellular Receptors for Human Coronavirus OC43. In P. J. Talbot & G. A. Levy (Eds.), *Corona- and Related Viruses: Current Concepts in Molecular Biology and Pathogenesis* (pp. 371-374). Boston, MA: Springer US.
- Laidoudi, Y., Sereme, Y., Medkour, H., Watier-Grillot, S., Scandola, P., Ginesta, J., . . . Davoust, B. (2021). Sars-CoV-2 antibodies seroprevalence in dogs from France using ELISA and an automated western blotting assay. *One Health*, *13*, 100293. doi:<https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100293>
- Li, B. X., Ge, J. W., & Li, Y. J. (2007). Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology*, *365*(1), 166-172. doi:10.1016/j.virol.2007.03.031
- Li, H., Liu, S.-M., Yu, X.-H., Tang, S.-L., & Tang, C.-K. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *55*(5), 105951. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105951>
- Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., . . . Farzan, M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, *426*(6965), 450-454. doi:10.1038/nature02145
- 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. doi:10.1016/j.bbrc.2020.03.047
- Martins, M., do Nascimento, G. M., Nooruzzaman, M., Yuan, F., Chen, C., Caserta, L. C., . . . Diel, D. G. (2022). The Ómicron variant BA.1.1 presents a lower pathogenicity than B.1 D614G and Delta variants in a feline model of Sars-CoV-2 infection. *BioRxiv*. doi:10.1101/2022.06.15.496220
- Matheson, N. J., & Lehner, P. J. (2020). How does Sars-CoV-2 cause COVID-19? , *369*(6503), 510-511. doi:doi:10.1126/science.abc6156
- Mulabbi, E. N., Tweyongyere, R., & Byarugaba, D. K. (2021). The history of the emergence and transmission of human coronaviruses. *Onderstepoort J Vet Res*, *88*(1), e1-e8. doi:10.4102/ojvr.v88i1.1872
- Muruato, A. E., Fontes-Garfias, C. R., Ren, P., Garcia-Blanco, M. A., Menachery, V. D., Xie, X., & Shi, P. Y. (2020). A high-throughput neutralizing antibody assay for COVID-19 diagnosis and vaccine evaluation. *Nat Commun*, *11*(1), 4059. doi:10.1038/s41467-020-17892-0
- Narayanan, K., Ramirez, S. I., Lokugamage, K. G., & Makino, S. (2015). Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression. *Virus Res*, *202*, 89-100. doi:10.1016/j.virusres.2014.11.019

- Navarro-Lopez, R., Solis-Hernandez, M., Rocha-Martinez, M. K., Eberl, S., Gomez-Romero, N., Velazquez-Salinas, L., & Estrada-Franco, J. G. (2022). Near-Full-Length Genome Sequences Representing an Event of Zooanthroponotic Transmission of Sars-CoV-2 Lineage B.1.189 in Mexico during 2020. *Microbiol Resour Announc*, e0049722. doi:10.1128/mra.00497-22
- Newman, A., Smith, D., Ghai, R. R., Wallace, R. M., Torchetti, M. K., Loiacono, C., . . . Barton Behravesh, C. (2020). First Informed Cases of Sars-CoV-2 Infection in Companion Animals - New York, March-April 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 69(23), 710-713. doi:10.15585/mmwr.mm6923e3
- Okba, N. M. A., Müller, M. A., Li, W., Wang, C., GeurtsvanKessel, C. H., Corman, V. M., . . . Haagmans, B. L. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis*, 26(7), 1478-1488. doi:10.3201/eid2607.200841
- Okba, N. M. A., Müller, M. A., Li, W., Wang, C., GeurtsvanKessel, C. H., Corman, V. M., . . . Haagmans, B. L. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis*, 26(7), 1478-1488. doi:10.3201/eid2607.200841
- Palmer, M. V., Martins, M., Falkenberg, S., Buckley, A., Caserta, L. C., Mitchell, P. K., . . . Diel, D. G. (2021). Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to Sars-CoV-2. *J Virol*, 95(11). doi:10.1128/jvi.00083-21
- Patterson, E. I., Elia, G., Grassi, A., Giordano, A., Desario, C., Medardo, M., . . . Decaro, N. (2020). Evidence of exposure to Sars-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy. *Nat Commun*, 11(1), 6231. doi:10.1038/s41467-020-20097-0
- Perera, R. A., Mok, C. K., Tsang, O. T., Lv, H., Ko, R. L., Wu, N. C., . . . Peiris, M. (2020). Serological assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (Sars-CoV-2), March 2020. 25(16), 2000421. doi:doi:<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.16.2000421>
- Plummer, G., & Benyesh-Melnick, M. (1964). A Plaque Reduction Neutralization Test for Human Cytomegalovirus. *117*(1), 145-150. doi:10.3181/00379727-117-29520
- Prince, T., Smith, S. L., Radford, A. D., Solomon, T., Hughes, G. L., & Patterson, E. I. (2021). Sars-CoV-2 Infections in Animals: Reservoirs for Reverse Zoonosis and Models for Study. *Viruses*, 13(3), 494. doi:10.3390/v13030494
- Raj, V. S., Mou, H., Smits, S. L., Dekkers, D. H. W., Müller, M. A., Dijkman, R., . . . Haagmans, B. L. (2013). Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*, 495(7440), 251-254. doi:10.1038/nature12005
- REED, L. J., & MUENCH, H. (1938). A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS¹². *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493-497. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408 %J American Journal of Epidemiology
- Renu, K., Prasanna, P. L., & Valsala Gopalakrishnan, A. (2020). Coronaviruses pathogenesis, comorbidities and multi-organ damage – A review. *Life Sciences*, 255, 117839. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117839>
- Rockx, B., Kuiken, T., Herfst, S., Bestebroer, T., Lamers, M. M., Oude Munnink, B. B., . . . Haagmans, B. L. (2020). Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science*, 368(6494), 1012-1015. doi:10.1126/science.abb7314
- Salje, H., Rodríguez-Barraquer, I., Rainwater-Lovett, K., Nisalak, A., Thaisomboonsuk, B., Thomas, S. J., . . . Cummings, D. A. T. (2014). Variability in Dengue Titer Estimates from Plaque Reduction Neutralization Tests Poses a Challenge to Epidemiological Studies and Vaccine Development. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(6), e2952. doi:10.1371/journal.pntd.0002952

- Schlottau, K., Rissmann, M., Graaf, A., Schön, J., Sehl, J., Wylezich, C., . . . Beer, M. (2020). Sars-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. *The Lancet Microbe*, 1(5), e218-e225. doi:10.1016/S2666-5247(20)30089-6
- Schultze, B., Enjuanes, L., Cavanagh, D., & Herrler, G. (1993). N-Acetylneuraminic Acid Plays a Critical Role for the Haemagglutinating Activity of Avian Infectious Bronchitis Virus and Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus. In H. Laude & J.-F. Vautherot (Eds.), *Coronaviruses: Molecular Biology and Virus-Host Interactions* (pp. 305-310). Boston, MA: Springer US.
- Schultze, B., & Herrler, G. (1992). Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells. 73(4), 901-906. doi:<https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-4-901>
- Schultze, B., Krempf, C., Ballesteros, M. L., Shaw, L., Schauer, R., Enjuanes, L., & Herrler, G. (1996). Transmissible gastroenteritis coronavirus, but not the related porcine respiratory coronavirus, has a sialic acid (N-glycolylneuraminic acid) binding activity. 70(8), 5634-5637. doi:10.1128/jvi.70.8.5634-5637.1996
- Schultze, B., Wahn, K., Klenk, H.-D., & Herrler, G. (1991). Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-destroying and receptor-binding activity. *Virology*, 180(1), 221-228. doi:[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90026-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90026-8)
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of Sars-CoV-2. 117(21), 11727-11734. doi:10.1073/pnas.2003138117
- Sharun, K., Tiwari, R., Patel, S. K., Karthik, K., Iqbal Yattoo, M., Malik, Y. S., . . . Dhama, K. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in domestic animals and wildlife: advances and prospects in the development of animal models for vaccine and therapeutic research. *Hum Vaccin Immunother*, 16(12), 3043-3054. doi:10.1080/21645515.2020.1807802
- Sheward, D. J., Kim, C., Ehling, R. A., Pankow, A., Castro Dopico, X., Dyrdak, R., . . . Murrell, B. (2022). Neutralisation sensitivity of the Sars-CoV-2 Ómicron (B.1.1.529) variant: a cross-sectional study. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(6), 813-820. doi:[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00129-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00129-3)
- Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., . . . Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*, 368(6494), 1016-1020. doi:10.1126/science.abb7015
- Sia, S. F., Yan, L. M., Chin, A. W. H., Fung, K., Choy, K. T., Wong, A. Y. L., . . . Yen, H. L. (2020). Pathogenesis and transmission of Sars-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*, 583(7818), 834-838. doi:10.1038/s41586-020-2342-5
- Sit, T. H. C., Brackman, C. J., Ip, S. M., Tam, K. W. S., Law, P. Y. T., To, E. M. W., . . . Peiris, M. (2020). Infection of dogs with Sars-CoV-2. *Nature*, 586(7831), 776-778. doi:10.1038/s41586-020-2334-5
- SS-México. (2021a). Covid-19 México. Retrieved from <https://datos.covid-19.conacyt.mx>
- SS-México. (2021b). Covid-19 México. Retrieved from <https://datos.covid-19.conacyt.mx>
- Stevanovic, V., Vilibic-Cavlek, T., Tabain, I., Benveniste, I., Kovac, S., Hruskar, Z., . . . Barbic, L. (2021). Seroprevalence of Sars-CoV-2 infection among pet animals in Croatia and potential public health impact. *Transbound Emerg Dis*, 68(4), 1767-1773. doi:10.1111/tbed.13924
- Szczepanski, A., Owczarek, K., Bzowska, M., Gula, K., Drebot, I., Ochman, M., . . . Pyrc, K. (2019). Canine Respiratory Coronavirus, Bovine Coronavirus, and Human Coronavirus OC43: Receptors and Attachment Factors. *Viruses*, 11(4). doi:10.3390/v11040328
- Tresnan, D. B., Levis, R., & Holmes, K. V. (1996). Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. 70(12), 8669-8674. doi:10.1128/jvi.70.12.8669-8674.1996

- Udom, K., Jairak, W., Chamsai, E., Charoenkul, K., Boonyapisitsopa, S., Bunpapong, N., . . . Amonsin, A. (2021). Serological survey of antibodies against Sars-CoV-2 in dogs and cats, Thailand. *Transbound Emerg Dis*, *n/a(n/a)*. doi:<https://doi.org/10.1111/tbed.14208>
- van der Hoek, L. (2007). Human coronaviruses: what do they cause? *Antivir Ther*, *12*(4 Pt B), 651-658.
- Wang, M.-Y., Zhao, R., Gao, L.-J., Gao, X.-F., Wang, D.-P., & Cao, J.-M. (2020). Sars-CoV-2 : Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *10*. doi:10.3389/fcimb.2020.587269
- WHO. (12 January 2020). Novel Coronavirus – China. Retrieved from <https://www.who.int/csr/don/12-january-2020-novel-coronavirus-china/en/>
- Widagdo, W., Okba, N. M. A., Stalin Raj, V., & Haagmans, B. L. (2017). MERS-coronavirus: From discovery to intervention. *One Health*, *3*, 11-16. doi:10.1016/j.onehlt.2016.12.001
- Williams, E., Carter, A., Rendle, J., & Ward, S. (2021). Impacts of COVID-19 on animals in zoos: a longitudinal multi-species analysis. *2*(2), 130-145.
- Williams, R. K., Jiang, G. S., & Holmes, K. V. (1991). Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *88*(13), 5533-5536. doi:10.1073/pnas.88.13.5533
- Windsor, I. W., Tong, P., Lavidor, O., Sanjari Moghaddam, A., McKay, L. G. A., Gautam, A., . . . Harrison, S. C. (2022). Antibodies induced by ancestral Sars-CoV-2 strain that cross-neutralize variants from Alpha to Ómicron BA.1. *Sci Immunol*, eabo3425. doi:10.1126/sciimmunol.abo3425
- Woo, P. C., Lau, S. K., Chu, C. M., Chan, K. H., Tsoi, H. W., Huang, Y., . . . Yuen, K. Y. (2005). Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol*, *79*(2), 884-895. doi:10.1128/jvi.79.2.884-895.2005
- Wu, K., Li, W., Peng, G., & Li, F. (2009). Crystal structure of NL63 respiratory coronavirus receptor-binding domain complexed with its human receptor. *106*(47), 19970-19974. doi:10.1073/pnas.0908837106
- Yang, Y., Xiao, Z., Ye, K., He, X., Sun, B., Qin, Z., . . . Zhao, W. (2020). Sars-CoV-2 : characteristics and current advances in research. *Virology Journal*, *17*(1), 117. doi:10.1186/s12985-020-01369-z
- Yeager, C. L., Ashmun, R. A., Williams, R. K., Cardellicchio, C. B., Shapiro, L. H., Look, A. T., & Holmes, K. V. (1992). Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*, *357*(6377), 420-422. doi:10.1038/357420a0
- Zhang, Q., Zhang, H., Huang, K., Yang, Y., Hui, X., Gao, J., . . . Jin, M. (2020). Sars-CoV-2 neutralizing serum antibodies in cats: a serological investigation. In: bioRxiv.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., . . . Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, *382*(8), 727-733. doi:10.1056/NEJMoa2001017

11. Anexos.

Anexo 1. Dictamen Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional (número de autorización CBE/006/2020).



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"
175 Aniversario de la Escuela Superior de Comercio y Administración
125 Aniversario de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía
80 Aniversario del CECyT 6 "Miguel Othón de Mendizábal"
75 Aniversario de la Escuela Nacional de Biblioteconomía y Archivonomía

EL COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

HACE CONSTAR

Que el proyecto de investigación titulado:

"ZONOSIS VIRALES EMERGENTES EN TIEMPOS DE CIRCULACIÓN DE COVID-19 EN MÉXICO".

Cuyos investigadores responsables son el **Dr. José Guillermo Estrada Franco** y el **Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez**, fue evaluado por el Comité de Bioética de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN, llegando a las siguientes conclusiones:

Este trabajo de investigación que se llevará a cabo en seres humanos, no implica ningún daño a los participantes, ni a terceras personas, así como tampoco tiene efectos negativos sobre el medio ambiente y se rige bajo las normas de bioseguridad del laboratorio BSL-2 avanzado de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) en Matamoros-Tamaulipas llevado a cabo por investigadores del Laboratorio de Biomedicina (LBM) del CBG-IPN.

El consentimiento informado elaborado para este proyecto incluye los aspectos requeridos para proveer la información necesaria a las personas que se incluyan en el estudio y los investigadores responsables deben garantizar la obtención del documento firmado por cada uno de los participantes en el mismo.

Con base en lo expresado anteriormente y considerando la pertinencia de la investigación, el rigor metodológico, su calidad científica, la coherencia y el cumplimiento de las normas científicas, técnicas y éticas, nacionales e internacionales que rigen este tipo de investigaciones, el Comité de Bioética dictamina que el proyecto cumple con todos los requisitos de calidad exigidos y en consecuencia otorga su **APROBACIÓN**. Lo cual consta en el archivo correspondiente con número de registro **CBE/006/2020**.

Se expide la presente en la Ciudad de México a los veintinueve días del mes de diciembre de 2020.

A T E N T A M E N T E
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"

M. EN C. ANGELA NÚÑEZ VÁZQUEZ
PRESIDENTA DEL COMITÉ DE BIOÉTICA.

"PROGRAMA DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO Y HOMEOPATIA ACREDITADO POR COMAEM 2014/2019"
"PROGRAMA DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO Y PARTERO ACREDITADO POR COMAEM 2017/2022"
Guillermo Massieu Helguera, No. 235, Fracc. "La Escalera", Tacomasán, C.P. 07320 Ciudad de México
Red IPN 5729 6000 ext. 555501, 555530 Y 555563 www.enmh.ipn.mx



2020
LEONA VICARIO
BENEMÉRITA MADRE DE LA PATRIA

Anexo 2. Dictamen Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA) (número de autorización CICAL-CPA-001-2022).



AGRICULTURA



SENASICA

DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD ANIMAL,
COMISIÓN MÉXICO-ESTADOS UNIDOS
PARA LA PREVENCIÓN DE LA FIEBRE
AFTOSA Y OTRAS ENFERMEDADES
EXÓTICAS DE LOS ANIMALES

EL COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE
LABORATORIO (CICAL) DE LA CPA

HACE CONSTAR

Que el proyecto de investigación titulado: "Elaboración de antígenos y antisueros de referencia para SARS-Cov-2 para la implementación de pruebas virológicas y serológicas", cuyos responsables de proyecto son el C. MVZ Mario Solís Hernández, el C. Francisco José Liljehult Fuentes y el C. MVZ Freddy Dehesa Canseco, fue evaluado por este Comité, concluyendo:

Este trabajo se llevará a cabo con la premisa de promover, verificar y salvaguardar el cuidado humanitario de los animales utilizados en la investigación y que no implica efectos negativos sobre el medio ambiente, ni en el personal participante del proyecto y siempre en observancia de los manuales de bioseguridad que rigen el trabajo de la CPA, así como en estricto apego a lo estipulado en la Ley Federal de Sanidad Animal; en la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio; en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos-clasificación y especificaciones de manejo; en la Ley de Protección a los Animales de la Ciudad de México y en el Manual para la integración y funcionamiento del CICAL perteneciente a la CPA.

Con base en lo expresado anteriormente y considerando la pertinencia de la investigación, el rigor metodológico, su calidad científica, la coherencia y el cumplimiento de las normas científicas, técnicas y éticas, nacionales e internacionales que rigen este tipo de investigaciones, el CICAL-CPA dictamina que el proyecto cumple con todos los requisitos de calidad exigidos y en consecuencia otorga su **APROBACIÓN**.

Se expide la presente en la Ciudad de México a los once días del mes de marzo de 2022 y queda registrado en el expediente CICAL-CPA-001-2022.

ATENTAMENTE

MVZ Héctor Luis Delint Rojas
SECRETARIO TÉCNICO DEL CICAL DE LA CPA

Anexo 3. Solicitud de artículo a la revista Transboundary and Emerging Diseases.

Your manuscript entitled "Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 ancestral strain and Omicron BA.1 subvariant in dogs and cats in Mexico" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Transboundary and Emerging Diseases.

Thank you for your submission to Transboundary and Emerging Diseases. Throughout 2022, this journal is in the process of transitioning to a fully open access title, published and hosted by Hindawi. The journal will continue to process manuscripts submitted via this site for now; however, any manuscript submitted through ScholarOne before October 11, 2022 may not complete peer review within this system or be published by Wiley. In that event, we will contact you with more details, including the option to submit your revised article to Transboundary and Emerging Diseases via <https://review.hindawi.com/submit?journal=TBED>, where you will be asked to confirm your ability to pay the APC of \$2,500. For more information, please visit the journal's Author Guidelines on Wiley Online Library.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is TBED-OA-842-22.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions.

What happens now?

Your manuscript will now be checked by the Editorial Office and Editor-in-Chief to ensure:

1. all aspects of the manuscript are complete and nothing is missing or incorrect;
2. the journal's ethical guidelines have been respected;
3. your manuscript is in scope for the journal;
4. that the quality of the presentation and use of English is adequate.

Only on successful completion of these checks will your manuscript will be assigned to an Associate Editor. The assigned Associate Editor will then try to appoint reviewers and manage the remainder of the submission process.

You can view the status of your manuscript at any time by logging into the submission site at: <https://wiley.atyponrex.com/journal/TBED>

Thank you for your submission to Transboundary and Emerging Diseases. Throughout 2022, this journal is in the process of transitioning to a fully open access title, published and hosted by Hindawi. The journal will continue to process manuscripts submitted via this site for now; however, any manuscript submitted through ScholarOne/Editorial Manager before [11 October 2022] may not complete peer review within this system or be published by Wiley. In that event, we will contact you with more details, including the option to submit your revised article to Transboundary and Emerging Diseases via <https://review.hindawi.com/submit?journal=TBED>, where you will be asked to confirm your ability to pay the APC of \$2500. For more information, please visit the journal's Author Guidelines on Wiley Online Library.

This journal offers a number of license options, information about this is available here: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing/index.html>. All co-authors are required to confirm that they have the necessary rights to grant in the submission, including in light of each co-author's funder policies. For example, if you or one of your co-authors received funding from a member of Coalition S, you may need to check which licenses you are able to sign.

Thank you for submitting your manuscript to Transboundary and Emerging Diseases.

We recognise that the impact of the COVID-19 pandemic may affect your ability to return your revised manuscript to us within the requested timeframe. If this is the case, please let us know.

Thank you for your patience during this time.

Sincerely,
Anjishana Sashikumar
Transboundary and Emerging Diseases Editorial Office
tbbeditorial@wiley.com

Anexo 4. Artículo científico enviado para su publicación.

Neutralizing antibodies against the Sars-CoV-2 in dogs and cats in Mexico

Dehesa-Freddy¹, Pastrana-Unzueta Roxana¹, Carillo-Guzmán Nadia¹, Francisco Liljehult-Fuentes¹, Pérez-De la Rosa Juan Diego², Humberto Ramírez-Mendoza⁴, José Guillermo Estrada Franco³, Navarro-López Roberto¹, Jesús Hernández⁵, Solís-Hernández Mario^{1*}

¹ Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA), SENASICA, SADER.

² Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA), SENASICA, SADER.

³ Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Cd. Reynosa, Tamaulipas, México.

⁴ Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México.

⁵ Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C, Hermosillo, México.

* Correspondence: mario.solis@senasica.gob.mx

Abstract

The virus Sars-CoV-2 originated in Wuhan, China, in 2019 and has since spread worldwide, infecting humans and animals. Several reports have described the seroprevalence of antibodies in dogs and cats, but there are no reports from Mexico. This study aimed to evaluate the seroprevalence of neutralizing antibodies against the ancestral strain and Ómicron BA.1 subvariant in dogs and cats in Mexico. A total of 1111 samples from dogs (n=1052) and cats (n=59) were collected in different regions of Mexico, and the presence of neutralizing antibodies (nAbs) was evaluated by a plaque reduction neutralization test (PRNT90) and microneutralization (MN). The results showed that 15.25% (9 of 59) of cats and 2.85% (30 of 1052) of dogs presented nAbs against the ancestral strain of Sars-CoV-2. However, the analysis of nAbs against Ómicron BA.1 in cats showed the same percentage of positive animals but a reduction in the titer. In the case of dogs, 2.09% (22 of 1052) showed

nAbs against Ómicron BA.1. These results agree with previous reports showing that antibodies are more frequent in cats than in dogs and that these antibodies have a lower capacity to neutralize Ómicron BA.1

Keywords: Sars-CoV-2 , COVID-19, seroprevalence, dogs, cats, PRNT-90, microneutralization.

Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (Sars-CoV-2), was first informed in December 2019 in the city of Wuhan, Hubei Province, central China, and was associated with a significant number of cases of pneumonia of unknown origin (WHO, 12 January 2020). Since then, the virus has spread to different countries, causing more than 4 million infections and 6 million deaths (WHO, 12 January 2020). The first case informed in Mexico was in February 2020; the number of cases has increased, and 6,011,033 million patients have been informed as of April 21, 2022 (SS-México, 2021a).

In addition to infecting humans, Sars-CoV-2 can infect domestic and zoo animals. However, the role of such infection in the transmission of the virus or as a reservoir of the disease is still unknown. The first case of anthrozoosis was informed in Hong Kong, involving the dog of a patient who presented with COVID-19 diagnosed by RT-qPCR (Thomas H. C. Sit et al., 2020). Since then, a significant number of infected companion animals have been informed in different parts of the world ((OIE), 2022a; Bao et al., 2020; Freuling et al., 2020; Kim et al., 2020; Newman et al., 2020; Patterson et al., 2020; Prince et al., 2021; Rockx et al., 2020; Sia et al., 2020; E. Williams et al., 2021). In Mexico, the first case of Sars-CoV-2 in dogs was informed by the National Service of Agri-Food Health, Safety and Quality (SENASICA, for its Spanish acronym) in April 2020. In this case, four dogs were in contact with RT-qPCR-positive humans and one of the dogs was found to be positive for Sars-CoV-2 by RT-qPCR ((OIE), 2021). Regardless of the low probability of transmission from pet to human or from human to pet, it is essential to analyze the role of companion animals in the transmission of Sars-CoV-2 .

In addition to dogs, it has been informed that Sars-CoV-2 can infect felines and wildlife animals (Patterson et al., 2020; E. Williams et al., 2021);(Chandler et al., 2021; Kim et al., 2020; Palmer et al., 2021); (Rockx et al., 2020); (Bertzbach et al., 2021; Sia et al., 2020). Different studies have informed using the plaque reduction neutralization test (PRNT90) and microneutralization (MN) to evaluate the prevalence of neutralizing antibodies (nAbs) against Sars-CoV-2 in dogs and cats. In Italy, neutralizing antibodies against Sars-CoV-2 were detected in 15 of 451 samples from dogs (3.3%) and 11 of 191 samples from cats (5.8%), with titers ranging from 1:20 to 1:160 and from 1:20 to 1:1280, respectively. In all cases, positive samples were found in pets from households with people positive for Sars-CoV-2 (Dias et al., 2021). In another study conducted in Brazil, the percentage of positive samples was small, at only 2% (2 of 96) based on the PRNT90 technique; one feline and one canine had titers of 1:80 and 1:40, respectively. Other studies using ELISA found prevalence rates ranging from 1.7% in cats to 0.8% in dogs (Stevanovic et al., 2021). These studies contribute to our understanding of the role of pets and other animals in the current pandemic. The emergence of variants of Sars-CoV-2 has provoked re-infections and reduced neutralizing response on vaccine or infected individuals, especially with the Ómicron subvariants (Windsor et al., 2022). There is limited information regarding the response of cats or dogs to the Ómicron subvariants. A recent study showed that cats infected with Ómicron BA.1 subvariant were less pathogenic than D614G and Delta variants (Martins et al., 2022). Because Sars-CoV-2 can infect animals, it is essential to determine the extent of the disease in these populations via comprehensive analysis within the context of One Health. Therefore, this study aimed to evaluate the seroprevalence of neutralizing antibodies against the ancestral strain and Ómicron BA.1 subvariants in dogs and cats from different regions of Mexico.

Material and Methods

Serum samples

A total of 1111 serum samples were included in this study, of which 1052 were from dogs, and 59 were from cats. Serum samples were collected from 25 states of the Mexican Republic (Guerrero, Coahuila, Chihuahua, Durango, Michoacán, Nuevo León, Yucatán, Jalisco, México City, Estado de México, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Yucatán, Zacatecas, Aguascalientes, Baja California Norte,

Baja California Sur, Campeche, Colima, and Chiapas), derived from a serological sampling that was conducted for epidemiological surveillance by trained SENASICA personnel. This study included five sources of cats and dogs (Table 1). 1) Samples from animals (household) that were in contact with people positive for the virus by RT-qPCR; 2) samples from urban free-ranging dogs and cats that are in frequent contact with a significant number of people because they were part of the massive days of canine and feline surgical sterilization organized by the National Center for Preventive Programs and Disease Control and SENASICA; 3) samples of animal shelters; 4) samples from dogs of the federal border inspection agencies; and 5) deidentified samples obtained from discarded patient serum samples collected for routine diagnostics of dogs and cats at the Hospital de Urgencias Veterinarias Borges, at Hermosillo, Sonora.

The sampled animals were divided according to their health conditions and the different clinical characteristics described by the owners in the medical records, or that could be identified at the time of sampling: mild (nasal congestion, fatigue, cough), moderate disease (gastroenteritis, nasal congestion, fatigue, cough, dyspnea, pyrexia, emesis, and pulsating chest pain), severe disease (bilateral pneumonia, acute respiratory distress, and alterations in lung function), asymptomatic and healthy except di-identified discarded serum samples.

Blood samples were collected by cephalic or jugular vein (approximately 3-5 ml) using Vacutainer tubes without anticoagulant but with separating gel, centrifuged to obtain serum, and then stored at -20°C until use. The samples were collected in the final of 2020 until December of 2021. The samples were processed at the biosafety diagnostic laboratory level 3 (LBS3) of the Mexico–United States Commission for the Prevention of Foot-and-Mouth Disease and Other Exotic Animal Diseases (CPA) of the National Service for Disease Control, Safety and Agri-food Quality (SENASICA). This laboratory is the only laboratory in the area of animal health in Mexico with the infrastructure for manipulating high-impact pathogens such as foot-and-mouth disease, avian influenza, pandemic H1N1, equine encephalitis, and Sars-CoV-2, among others.

This work was conducted in agreement with general ethical principles and guidelines established by the Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999. The protocol was approved by the Internal Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL)

belonging to the **CPA-SENASICA (CICUAL-CPA-001-2022)** and by the Ethics Committee of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (**CEI/005-2/2020**).

Cell line

Vero C1008 (Vero 76, clone E6, Vero E6) (ATCC-CRL-1586 cells) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco®, Cat. No. 11995-065), with 5% fetal bovine serum (FBS) (ATCC Cat. No. 30-2020). The serum was subjected to gamma radiation with cobalt 60 and inactivated at 56°C for one hour. The medium was supplemented with 2% penicillin–streptomycin–amphotericin B suspension ($\times 100$) Sigma (Cat. No. A5955-100ML).

Virus

The viruses hCoV-19/Mexico/CPALB32021036/2020 and hCoV-19/Mexico/CPALBS32021032/2022 were used to evaluate the neutralizing capacity of serum samples by MN and PRNT90. The viruses were isolated and characterized in the facilities of the LBS3 of CPA/SENASICA. The viruses showed 99.9% identity with the reference sequence Wuhan-Hu-1 (GenBank: NC_045512.2) and 99.9% identity with the sequence Sars-CoV-2 /human/USA/CA-CDC-STM-B8VEK3CPH/2022 (GenBank: OM464899.1) identified as the Ómicron (BA.1) subvariant.

RT–qPCR

Real-time RT–qPCR was based on the detection of Sars-CoV-2 regions with the use of primers N1, N2, and RP (2019-nCoVPC and RP). A Sars-CoV-2 (2019-nCoV) CDC qPCR Probe Assay and Detection kit for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV RNA (PCR-fluorescence probing) with a 7500 fast real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific®) and CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories®) were used.

Plaque reduction neutralization test (PRNT90)

Plaque reduction neutralization was conducted as previously described (Muruato et al., 2020), but with some modifications. Six-well cell culture plates with flat bottoms (NEST®, Cat. No. 07-6006) were used, and Vero C1008 cells were cultured at a concentration of 1.5×10^6 cells/well for 12-18 hours before performing the test. Serum samples were inactivated (heat-inactivated at 56°C for 60 minutes), and double dilutions from the 1:10 dilution to the 1:5120 dilution were prepared in DMEM (Gibco® Cat. 11995-065) supplemented with 2%

FBS (ATCC®, Cat. No. 30-2020) and 2% penicillin–streptomycin–amphotericin B suspension ($\times 100$) (Sigma, Cat. No. A5955-100ML).

Dilution of the working virus was adjusted to 30-40 plaque-forming units (PFUs) per well, corresponding to a 10^4 dilution of the seed virus. For each diluted serum sample, the active virus (15-20 final PFU) was added in a 1:2 ratio and incubated at 37°C and 5% CO₂ for one hour. Additionally, corresponding dilutions were performed to verify the viral titer and interpret the PRNT90 result in each experiment. For this purpose, four tenfold dilutions of the working virus from 10^1 to 10^5 were used. After incubation, the maintenance medium was removed from six-well plates previously seeded with Vero C1008 cells, and 200 μ l of the virus-serum mixture was added. Similarly, 100 μ l of the dilutions corresponding to the virus dilution were added to verify the viral titer, and the plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 60 minutes. Subsequently, 2 ml of 1.6% LE agarose and 8% MEM 2X (Gibco® Cat. No. 2277357) SFB plus 2% antibiotic was added to each well, allowed to solidify, and then incubated at 37°C and 5% CO₂ for 48 hours. Finally, 1 ml of Neutral Red Solution (0.33%; Sigma–Aldrich® Cat. No. N2889-100ML) diluted to 0.058% in DPBS (1X) (Gibco® Cat. No. 14190-136) was added to each well. The plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 4-6 hours. Subsequently, the neutral red solution was removed, and the measurement and interpretation of the results were analyzed. Samples were considered positive when a serum dilution of at least 1:10 reduced Sars-CoV-2 lytic plaque formation by no less than 90% compared to the control (Muruato et al., 2020).

Microneutralization

Microneutralization was conducted as previously described (Bewley et al., 2021; Perera et al., 2020), but with some modifications. Vero C1008 cells were cultured at a concentration of 1.5×10^5 ml in 96-well cell culture plates; to reach 70 to 80% confluence, the cells were prepared 12-18 hours in advance. Subsequently, an initial 1:10 dilution was performed with sera (previously inactivated) in 96-well plates with flat bottoms (Corning® Cat. No. CLS3585-50EA). The solution for dilution consisted of medium Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco® Cat. No. 11995-065) supplemented with 2% FBS (ATCC, Cat. No. 30-2020) and 2% penicillin–streptomycin–amphotericin B suspension ($\times 100$) (SIGMA, Cat. No. A5955-100ML). Twofold serial dilutions up to the 1:5120 dilution were prepared with 50 μ l, after which 50 μ l of the virus was adjusted to a concentration of 100

TCID₅₀ and incubated at 37°C in 5% CO₂ for 60 minutes. After incubation, 100 µl of the serum-virus mixture was transferred to 96-well plates with Vero cells, 100 µl of DMEM with 2% FBS was added, and the cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 72 hours. Samples were considered positive when a serum dilution of at least 1:10 did not neutralize the 100% cytopathic effect of the virus adjusted to 100 TCID₅₀ (Bewley et al., 2021; Perera et al., 2020; Zhang et al., 2020).

Positive and negative controls

Positive controls for the PRNT90 and MN tests were produced in guinea pigs (*Cavia porcellus*). The ancestral strain (hCoV-19/Mexico/CPALB32021036/2020) and the Ómicron BA.1 (hCoV-19/Mexico/CPALBS32021032/2022) were inactivated with cobalt-60 gamma rays (⁶⁰Co), emulsified with Montanide ISA™ 51 and used for immunizing guinea pigs (twice). As a negative control, a dog serum negative for RT–qPCR and negative for antibodies (ID Screen® Sars-CoV-2 Double Antigen Multispecies ELISA Kit.) was used as a negative control using the commercial

Statistical analysis

The correlation between MN and PRNT90 was performed with the Pearson correlation coefficient using the statistical program IBM® SPSS® Statistics version 25 and the program GraphPad Prism version 8. In all cases, a value of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

This study included 1111 sera from cats (n=59) and dogs (n=1052) obtained from 25 states of the Mexican Republic (Table 1). The states with positive samples were Puebla, Estado de Mexico, Sonora, Mexico City, Chiapas, and Quintana Roo (Figure 1). Sonora showed the highest positive samples (26 of 494), followed by Puebla (6 of 61).

The first group included 273 samples of animals (household) that live in close contact with persons; 264 correspond to dogs and nine to cats. One hundred thirteen samples were tested by RT–qPCR, and only three were positive (545: gene N1, Ct 37.51 and gene N2, Ct 38.28; 549: gene N1, Ct 33.44 and gene N2, Ct 37.46; 546: gene N1, Ct 30.14 and gene N2, Ct 32.01). The criterion for performing an RT–qPCR test was that the owner had a positive RT–qPCR test and that the animal presented some symptoms of COVID-19. Under this criterion, 160 animal samples were not analyzed by RT–qPCR. However, all samples were analyzed by PRNT90 and MN. The results indicated that in this group, five samples showed nAbs

against the ancestral strain of Sars-CoV-2, three cats (33.3%) and two dogs (0.73%) (Table 2 and Table 3). In the case of nAbs against Ómicron BA.1, three cats were positive, but dogs were negative. Titers against the ancestral strain in cats were higher than against the Ómicron BA.1 sublineage.

All three RT-qPCR-positive samples had neutralizing antibodies in MN and PRNT90 (Table 2 and Table 3), sample ID. 545 and ID. 546 did not present clinical synology; however, the sample with ID. 549 was identified as a severe disease, presenting acute respiratory distress and pulmonary function alterations three weeks before sampling (without confirming the presence of bilateral pneumonia). The sampled animal presented a severe condition days after sampling; for this reason, a euthanasia procedure was applied by the owners.

The second group included 155 samples from free-ranging urban dogs (n=142) and cats (n=13). In this case, RT-qPCR was not performed because the animals did not show disease symptoms. The analysis of these samples revealed two dogs (1.4%) with nAbs against the ancestral strain (Table 3) and the Ómicron BA.1 subvariant; however, one dog was negative against the Ómicron BA.1 with the MN test. Cats in this group were negative for nAbs.

The third group consisted of samples obtained from shelters (n = 124): 118 from dogs and six from cats. None of these samples were analyzed by RT-qPCR because there were no symptoms of the disease when the samples were collected. The results showed one dog (0.84%) and one cat (16.6%) positive for nAbs against the ancestral strain and Ómicron BA.1; however, the dog was negative for Ómicron BA.1 with the MN test.

The fourth group includes 50 samples from dogs of the federal border inspection agencies. In this case, the RT-qPCR test was not performed. Four samples (8%) were positive for nAbs against the ancestral strain and Ómicron BA.1 subvariant.

The fifth group included 494 deidentified samples obtained from discarded patient serum samples and 478 from dogs and 31 cats. In this case, non-RT-qPCR was performed, and a nonclinical history of the samples was available. The results showed 21 dogs (4.3%) and 5 cats (16.6%) with nAbs against the ancestral strain. Regarding nAbs against the Ómicron BA.1 subvariant, only 15 dogs and five cats were positive. However, using the MN test, three cats and four dogs were negative for the Ómicron BA.1 subvariant.

We observed that titers were higher with PRNT90 than with MN, regardless of whether the Ancestral strain or Ómicron BA.1 subvariant was used. The higher titers observed in this

study were 1:640 with PRNT90 and 1:320 with MN with the ancestral strain but lower (1:320 and 1:160 for PRNT90 for MN, respectively) when using Ómicron BA.1. Some cats or dogs with low titers against the ancestral strain were negative for Ómicron BA.1. nAbs against Ómicron subvariant present up to three logarithms of difference in cat and dog samples compared to Ancestral strain, especially with the MN test. However, even with this difference in sensitivity, both tests showed a strong correlation ($r^2 = 0.8109$; $p < 0.0001$) (Figure 2). These results suggest that the PRNT90 technique is more sensitive than the MN test, although the MN test is simpler to perform. Additionally, the results suggest that nAbs in cats and dogs can neutralize Ómicron BA.1 but with lower potency.

One interesting observation was that the positive control produced with the ancestral strain (CPALBS32021014) and challenged against its homologous virus presented a titer of 1:40 by PRNT90 and 1:20 by MN. However, when this control was challenged against Ómicron BA.1, a reduction in the titer was observed, 1:20 by PRNT90 and 1:10 by MN. In the case of the positive control produced with Ómicron BA.1 (CPALBS32022011), the titer presented against its homologous virus was 1:80 for PRNT90 and 1:40 for MN. Interestingly, challenged against the ancestral strain, the titer was not changed, 1:80 for PRNT90 and 1:40 for MN (Table 4).

The correlation between both techniques using the ancestral strain and Ómicron BA.1 subvariant was $r^2 = 0.9878$ ($p < 0.0001$) for PRNT90 and $r^2 = 0.8422$ ($p < 0.0001$) for MN, showing a strong correlation between the results of both techniques, suggesting that despite a significant log difference between the results, there was no significant difference, and the results were closely related using both viruses.

Discussion

The objective of this study was to evaluate the seroprevalence of nAbs against the ancestral strain and Ómicron BA.1 subvariant of Sars-CoV-2 using PRNT90 and MN. For this purpose, 1111 samples were analyzed, 1052 corresponding to dogs and 59 to cats. Overall, our results demonstrate that the seroprevalence of nAbs against the ancestral strain was 15.25% in cats and 2.85% in dogs. The prevalence of nAbs against the Ómicron BA.1 subvariant was similar to the ancestral, but with lower titers in cats and 2.09% (22 of 1052) in dogs. Our study confirms that cats are more susceptible to Sars-CoV-2 infection and that nAb against Ómicron BA.1 subvariant was lower or even negative. The seroprevalence found

in this study was similar to that in other reports from other countries (Calvet et al., 2021; Dias et al., 2021; Laidoudi et al., 2021; Patterson et al., 2020; Stevanovic et al., 2021; Udom et al., 2021; Zhang et al., 2020). In the case of dogs, most reports concord that seroprevalence is lower than in cats, but there are studies with a diverse percentage of seroprevalence. The differences in the assays used to evaluate the antibodies could explain the differences because some cross-reactivity with other coronaviruses affecting dogs has been described.

Seroprevalence is important because it is an excellent parameter to estimate the number of infected animals. However, in this study, we also confirmed the presence of infected dogs. Two dogs and one cat from a household were positive for Sars-CoV-2 by RT-qPCR and positive for nAbs. The animals were in contact with a person positive for Sars-CoV-2. These results confirm that one of the most frequent sources of infections in dogs is their owners. This is not the first report of dog infection in Mexico because previously, SENASICA informed another case to the OMSA. It is also interesting to observe that other dogs in contact with infected persons were negative by RT-qPCR but positive for antibodies. One explication is that Sars-CoV-2 had a low replication rate in dogs, or the infection was weeks before the sample collection.

The nAbs were analyzed with the PRNT90 and MN techniques, which are widely employed to detect antibodies against Sars-CoV-2 in humans (Bewley et al., 2021; Muruato et al., 2020; Nisreen M. A. Okba et al., 2020; Perera et al., 2020). Different studies have mentioned that PRNT90 is the gold standard for confirming the presence of antibodies against Sars-CoV-2 (Nisreen M. A. Okba et al., 2020; Perera et al., 2020). However, this methodology has greater technical difficulty. For example, highly trained personnel are needed to conduct the test; it also has higher costs, and a smaller number of samples can be processed in a given time. In contrast, MN has a lower level of technical difficulty and fees, and a more significant number of samples can be processed per test, depending on the diagnostic capacity of the laboratory (Bewley et al., 2021). In the case of animals, this test is not commonly used due to the technical difficulty described above. Nevertheless, studies conducted in Brazil and Italy have used these tests (Calvet et al., 2021; Dias et al., 2021; Patterson et al., 2020). PRNT90 and MN were utilized in the present study, and the results are similar to previous reports. An interesting observation in this work was the positive and high correlation between PRNT90 and MN.

In this study, we found that cats had higher antibody titers than dogs, which coincides with previous reports (Dias et al., 2021; Patterson et al., 2020; Stevanovic et al., 2021; Zhang et al., 2020). The seroprevalence in cats was 15.25% and 2.85% in dogs. These percentages are similar to those informed by other studies carried out in China (Zhang et al., 2020), Thailand (Udom et al., 2021), Brazil (Calvet et al., 2021; Dias et al., 2021), France (Laidoudi et al., 2021) and Italy (Patterson et al., 2020), and the results confirm that felines are more susceptible than dogs. It has been informed that many RT-qPCR-positive dogs do not undergo seroconversion, leading to lower susceptibility to the virus (Bosco-Lauth Angela et al., 2020; Shi et al., 2020). To date, the role of these animals in disseminating Sars-CoV-2 is unknown; therefore, it is important to establish seroepidemiological studies that involve a more significant number of animals and other susceptible species that are companion animals, such as ferrets or hamsters. In addition, zoo animals, especially felines (Patterson et al., 2020; E. Williams et al., 2021) and deer (Chandler et al., 2021; Palmer et al., 2021), are highly susceptible to Sars-CoV-2. This study will establish the current state of the disease in animals in Mexico.

This study showed a difference of two to three logarithms between the nAbs titers in dogs and cats by the PRNT90 and MN techniques using the ancestral strain compared with the Ómicron BA.1. In some dogs, were negative for nAb against Ómicron BA.1. These results are similar to those observed with the positive controls. In this case, guinea pigs immunized with the ancestral strain showed a reduced nAb response against Omciron BA.1. However, the control inoculated with Ómicron showed the same titer against the ancestral strain. These results suggest that infected dogs and cats can be reinfected with the new variants as in humans (Altarawneh et al., 2022; S. M. Cheng et al., 2022; Sheward et al., 2022). Additionally, these results suggest that mutations in Ómicron BA.1, and probably other mutations, did not affect the response against the ancestral strain. It remains to be investigated whether possible reinfections of dogs and cats can increase the probability of transmitting the infection to other animals and humans. In this study we were unable to confirm the type of varaint infecting the cats and dogs, but considereing the sampling dates, the infection was not by the Ómicron BA.1 subvariant.

A limitation of this study was that RT-qPCR results for all samples were unavailable, with the inability to establish a correlation between positive animals by RT-qPCR and

PRNT90/MN. In the case of the samples obtained from animals in households with humans positive for Sars-CoV-2 (n = 273), 113 samples could be analyzed by RT-qPCR, and all contained antibodies (n = 5). Nonetheless, it was impossible to perform RT-qPCR for the samples obtained from the refuge, urban free-ranging animals, deidentified serum samples, or Federal border inspection agencies (n = 838).

Conclusion

In this study, we used the PRNT90 and MN tests to determine the presence of aAbs against Sars-CoV-2 in serum samples of dogs and cats. As previously described, cats in Mexico showed a higher seroprevalence than dogs, confirming the increased susceptibility to Sars-CoV-2 infection. Additionally, this study shows for the first time the presence of nAbs against Ómicron BA.1, indicating that the titer against this variant is lower than that against the ancestral variant.

Author Contributions: Conceptualization, D.F., S.H.M., J.H.; methodology, D.F., P.U.R., N.C.G., V.S.M., P.D.J.D., E.G.F. C, B.E., and N.E.G.R.; formal analysis, D.F., S.H.M., J.H.; validation, D.F., P.U.R., N.C.G., J.H.; resources, N.L.R.; data curation, D.F., S.H.M., J.H.; original draft preparation, D.F., P.U.R., J.H.; writing, review, and editing, S.H.M., H.R.M., J.G.E.F., J.H.; supervision, N.L.R., S.H.M., F.L.F.; project administration, D.F., S.H.M.; funding acquisition, N.L.R. All authors have read and agreed to the version of this manuscript submitted for publication.

Funding: This research was funded by Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are grateful to Grace H. Rafael for her valuable technical assistance and all the coordinators of CPA for acquiring samples. We also thank the Hospital Veterinario Borges for the discharged serum samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- (CDC), C. f. D. C. a. P. (2020). Research Use Only 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Primers and Probes. Retrieved from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>
- (JHU), J. H. U. (2022). COVID-19 Dashboard
by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). Retrieved from <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
- (OIE), W. O. f. A. H. (2021). Follow-up report 4. Retrieved from <https://wahis.oie.int/#/report-info?reportId=34006>
- (OIE), W. O. f. A. H. (2022a). SARS-COV-2 IN ANIMALS – SITUATION REPORT 11. Retrieved from <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/emergencia-y-resiliencia/covid-19/#ui-id-3>
- (OIE), W. O. f. A. H. (2022b). SARS-CoV-2 in animals – Situation report 15. Retrieved from <https://www.woah.org/app/uploads/2022/08/sars-cov-2-situation-report-15.pdf>
- (WHO), W. H. O. (2020). Listings of WHO's response to COVID-19. Retrieved from <https://www.who.int/news/item/29-06-2020-covidtimeline>
- Abdel-Moneim, A. S., & Abdelwhab, E. M. (2020). Evidence for SARS-CoV-2 Infection of Animal Hosts. *Pathogens*, 9(7). doi:10.3390/pathogens9070529
- Altarawneh, H. N., Chemaitelly, H., Hasan, M. R., Ayoub, H. H., Qassim, S., AlMukdad, S., . . . Abu-Raddad, L. J. (2022). Protection against the Omicron Variant from Previous SARS-CoV-2 Infection. *386*(13), 1288-1290. doi:10.1056/NEJMc2200133
- Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S., Nguyen, T. H. O., Chromikova, V., McMahon, M., . . . Krammer, F. (2020). A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine*, 26(7), 1033-1036. doi:10.1038/s41591-020-0913-5
- Ambepitiya Wickramasinghe, I. N., de Vries, R. P., Weerts, E. A., van Beurden, S. J., Peng, W., McBride, R., . . . Verheije, M. H. (2015). Novel Receptor Specificity of Avian Gammacoronaviruses That Cause Enteritis. *J Virol*, 89(17), 8783-8792. doi:10.1128/jvi.00745-15
- Aucouturier, J., Dupuis, L., Deville, S., Ascarateil, S., & Ganne, V. (2002). Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 1(1), 111-118. doi:10.1586/14760584.1.1.111
- Azhar, E. I., Hui, D. S. C., Memish, Z. A., Drosten, C., & Zumla, A. (2019). The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). *Infectious Disease Clinics*, 33(4), 891-905. doi:10.1016/j.idc.2019.08.001
- Bailey, O. T., Pappenheimer, A. M., Cheever, F. S., & Daniels, J. B. (1949). A MURINE VIRUS (JHM) CAUSING DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS WITH EXTENSIVE DESTRUCTION OF MYELIN : II. PATHOLOGY. *J Exp Med*, 90(3), 195-212. doi:10.1084/jem.90.3.195
- Bao, L., Gao, H., Deng, W., Lv, Q., Yu, H., Liu, M., . . . Qin, C. (2020). Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 via Close Contact and Respiratory Droplets Among Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 Mice. *J Infect Dis*, 222(4), 551-555. doi:10.1093/infdis/jiaa281
- Bedford, E. (2020). Number of dogs and cats kept as pets worldwide in
2018. Retrieved from <https://www.statista.com/statistics/1044386/dog-and-cat-pet-population-worldwide/>
- Benbacer, L., Kut, E., Besnardeau, L., Laude, H., & Delmas, B. (1997). Interspecies aminopeptidase-N chimeras reveal species-specific receptor recognition by canine coronavirus, feline

- infectious peritonitis virus, and transmissible gastroenteritis virus. *71*(1), 734-737. doi:doi:10.1128/jvi.71.1.734-737.1997
- Bertzbach, L. D., Vladimirova, D., Dietert, K., Abdelgawad, A., Gruber, A. D., Osterrieder, N., & Trimpert, J. (2021). SARS-CoV-2 infection of Chinese hamsters (*Cricetulus griseus*) reproduces COVID-19 pneumonia in a well-established small animal model. *Transbound Emerg Dis*, *68*(3), 1075-1079. doi:10.1111/tbed.13837
- Bewley, K. R., Coombes, N. S., Gagnon, L., McInroy, L., Baker, N., Shaik, I., . . . Charlton, S. (2021). Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. *Nature Protocols*, *16*(6), 3114-3140. doi:10.1038/s41596-021-00536-y
- Bosco-Lauth Angela, M., Hartwig Airn, E., Porter Stephanie, M., Gordy Paul, W., Nehring, M., Byas Alex, D., . . . Bowen Richard, 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. doi:10.1073/pnas.2013102117
- Calvet, G. A., Pereira, S. A., Ogrzewalska, M., Pauvolid-Corrêa, A., Resende, P. C., Tassinari, W. d. S., . . . Menezes, R. C. (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), e0250853. doi:10.1371/journal.pone.0250853
- CHAN-YEUNG, M., & XU, R.-H. (2003). SARS: epidemiology. *8*(s1), S9-S14. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00518.x>
- Chan, J. F., Lau, S. K., To, K. K., Cheng, V. C., Woo, P. C., & Yuen, K. Y. (2015). Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin Microbiol Rev*, *28*(2), 465-522. doi:10.1128/cmr.00102-14
- Chandler, J. C., Bevins, S. N., Ellis, J. W., Linder, T. J., Tell, R. M., Jenkins-Moore, M., . . . Shriner, S. A. (2021). SARS-CoV-2 exposure in wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Proc Natl Acad Sci U S A*, *118*(47). doi:10.1073/pnas.2114828118
- Cheever, F. S., Daniels, J. B., & et al. (1949). A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. *J Exp Med*, *90*(3), 181-210. doi:10.1084/jem.90.3.181
- Chen, Y., Guo, Y., Pan, Y., & Zhao, Z. J. (2020). Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *525*(1), 135-140. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.071>
- Cheng, S. M., Mok, C. K. P., Chan, K. C., Ng, S. S., Lam, B. H., Luk, L. L., . . . Peiris, M. (2022). SARS-CoV-2 Omicron variant BA.2 neutralisation in sera of people with Comirnaty or CoronaVac vaccination, infection or breakthrough infection, Hong Kong, 2020 to 2022. *27*(18), 2200178. doi:doi:<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.18.2200178>
- Cheng, Y., He, B., Yang, J., Ye, F., Lin, S., Yang, F., . . . Lu, G. (2019). Crystal structure of the S1 subunit N-terminal domain from DcCoV UAE-HKU23 spike protein. *Virology*, *535*, 74-82. doi:10.1016/j.virol.2019.06.015
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, Sjöström, H., Norén, & Laude, H. (1992). Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature*, *357*(6377), 417-420. doi:10.1038/357417a0
- Dias, H. G., Resck, M. E. B., Caldas, G. C., Resck, A. F., da Silva, N. V., Dos Santos, A. M. V., . . . Dos Santos, F. B. (2021). Neutralizing antibodies for SARS-CoV-2 in stray animals from Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*, *16*(3), e0248578. doi:10.1371/journal.pone.0248578

- Feng, Y., & Gao, G. F. (2007). Towards our understanding of SARS-CoV, an emerging and devastating but quickly conquered virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 30(5-6), 309-327. doi:10.1016/j.cimid.2007.05.009
- Fernández-Bastit, L., Rodon, J., Pradenas, E., Marfil, S., Trinité, B., Parera, M., . . . Segalés, J. (2021). First Detection of SARS-CoV-2 Delta (B.1.617.2) Variant of Concern in a Dog with Clinical Signs in Spain. *13(12)*, 2526.
- Freuling, C. M., Breithaupt, A., Müller, T., Sehl, J., Balkema-Buschmann, A., Rissmann, M., . . . Mettenleiter, T. C. (2020). Susceptibility of Raccoon Dogs for Experimental SARS-CoV-2 Infection. *Emerg Infect Dis*, 26(12), 2982-2985. doi:10.3201/eid2612.203733
- García-Salido, A. (2020). Revisión narrativa sobre la respuesta inmunitaria frente a coronavirus: descripción general, aplicabilidad para SARS-COV-2 e implicaciones terapéuticas. *Anales de Pediatría*, 93(1), 60.e61-60.e67. doi:10.1016/j.anpedi.2020.04.016
- GeurtsvanKessel, C. H., Okba, N. M. A., Igloi, Z., Embregts, C. W. E., Laksono, B. M., Leijten, L., . . . Koopmans, M. (2020). Towards the next phase: evaluation of serological assays for diagnostics and exposure assessment. 2020.2004.2023.20077156. doi:10.1101/2020.04.23.20077156 %J medRxiv
- Giraldo-Ramirez, S., Rendon-Marin, S., Jaimes, J. A., Martinez-Gutierrez, M., & Ruiz-Saenz, J. (2021). SARS-CoV-2 Clinical Outcome in Domestic and Wild Cats: A Systematic Review. *11(7)*, 2056.
- Hamer, S. A., Pauvolid-Corrêa, A., Zecca, I. B., Davila, E., Auckland, L. D., Roundy, C. M., . . . Hamer, G. L. (2020). Natural SARS-CoV-2 infections, including virus isolation, among serially tested cats and dogs in households with confirmed human COVID-19 cases in Texas, USA. *bioRxiv*. doi:10.1101/2020.12.08.416339
- Hamer, S. A., Pauvolid-Corrêa, A., Zecca, I. B., Davila, E., Auckland, L. D., Roundy, C. M., . . . Hamer, G. L. (2021). SARS-CoV-2 Infections and Viral Isolations among Serially Tested Cats and Dogs in Households with Infected Owners in Texas, USA. *13(5)*, 938.
- Hamre, D., & Procknow, J. J. (1966). A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med*, 121(1), 190-193. doi:10.3181/00379727-121-30734
- Hamre, D., & Procknow, J. J. (1966). A New Virus Isolated from the Human Respiratory Tract. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 121(1), 190-193. doi:10.3181/00379727-121-30734
- Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*, 41(12), 1100-1115. doi:<https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
- Hasöksüz, M., Kiliç, S., & Saraç, F. (2020). Coronaviruses and SARS-COV-2. *Turk J Med Sci*, 50(Si-1), 549-556. doi:10.3906/sag-2004-127
- Hassan, S. S., Ghosh, S., Attrish, D., Choudhury, P. P., Aljabali, A. A. A., Uhal, B. D., . . . Brufsky, A. M. (2020). Possible Transmission Flow of SARS-CoV-2 Based on ACE2 Features. *Molecules*, 25(24). doi:10.3390/molecules25245906
- Hikmet, F., Méar, L., Edvinsson, Å., Micke, P., Uhlén, M., & Lindskog, C. (2020). The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Molecular Systems Biology*, 16(7), e9610. doi:<https://doi.org/10.15252/msb.20209610>
- Hobbs, E. C., & 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. *Transbound Emerg Dis*, 68(4), 1850-1867. doi:10.1111/tbed.13885
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., . . . Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically

- Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e278. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hosie, M. J., Epifano, I., Herder, V., Orton, R. J., Stevenson, A., Johnson, N., . . . Weir, W. (2021). Detection of SARS-CoV-2 in respiratory samples from cats in the UK associated with human-to-cat transmission. *188*(8), e247. doi:<https://doi.org/10.1002/vetr.247>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z.-L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 141-154. doi:10.1038/s41579-020-00459-7
- Huang, X., Dong, W., Milewska, A., Golda, A., Qi, Y., Zhu, Q. K., . . . Sui, J. (2015). Human Coronavirus HKU1 Spike Protein Uses *N*-Acetylated Sialic Acid as an Attachment Receptor Determinant and Employs Hemagglutinin-Esterase Protein as a Receptor-Destroying Enzyme. *89*(14), 7202-7213. doi:10.1128/JVI.00854-15
- Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 3-20. doi:10.1038/s41580-021-00418-x
- Kim, Y.-I., Kim, S.-G., Kim, S.-M., Kim, E.-H., Park, S.-J., Yu, K.-M., . . . Choi, Y. K. (2020). Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. *Cell Host & Microbe*, 27(5), 704-709.e702. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.023>
- Krempl, C., Schultze, B., & Herrler, G. (1995). Analysis of Cellular Receptors for Human Coronavirus OC43. In P. J. Talbot & G. A. Levy (Eds.), *Corona- and Related Viruses: Current Concepts in Molecular Biology and Pathogenesis* (pp. 371-374). Boston, MA: Springer US.
- Laidoudi, Y., Sereme, Y., Medkour, H., Watier-Grillot, S., Scandola, P., Ginesta, J., . . . Davoust, B. (2021). SARS-CoV-2 antibodies seroprevalence in dogs from France using ELISA and an automated western blotting assay. *One Health*, 13, 100293. doi:<https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100293>
- Li, B. X., Ge, J. W., & Li, Y. J. (2007). Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology*, 365(1), 166-172. doi:10.1016/j.virol.2007.03.031
- Li, H., Liu, S.-M., Yu, X.-H., Tang, S.-L., & Tang, C.-K. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(5), 105951. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105951>
- Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., . . . Farzan, M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426(6965), 450-454. doi:10.1038/nature02145
- 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. doi:10.1016/j.bbrc.2020.03.047
- Martins, M., do Nascimento, G. M., Nooruzzaman, M., Yuan, F., Chen, C., Caserta, L. C., . . . Diel, D. G. (2022). The Omicron variant BA.1.1 presents a lower pathogenicity than B.1 D614G and Delta variants in a feline model of SARS-CoV-2 infection. *BioRxiv*. doi:10.1101/2022.06.15.496220
- Matheson, N. J., & Lehner, P. J. (2020). How does SARS-CoV-2 cause COVID-19? , 369(6503), 510-511. doi:10.1126/science.abc6156
- McIntosh, K., Dees, J. H., Becker, W. B., Kapikian, A. Z., & Chanock, R. M. (1967). Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 57(4), 933-940. doi:10.1073/pnas.57.4.933
- Mulabbi, E. N., Tweyongyere, R., & Byarugaba, D. K. (2021). The history of the emergence and transmission of human coronaviruses. *Onderstepoort J Vet Res*, 88(1), e1-e8. doi:10.4102/ojvr.v88i1.1872

- Muruato, A. E., Fontes-Garfias, C. R., Ren, P., Garcia-Blanco, M. A., Menachery, V. D., Xie, X., & Shi, P. Y. (2020). A high-throughput neutralizing antibody assay for COVID-19 diagnosis and vaccine evaluation. *Nat Commun*, *11*(1), 4059. doi:10.1038/s41467-020-17892-0
- Narayanan, K., Ramirez, S. I., Lokugamage, K. G., & Makino, S. (2015). Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression. *Virus Res*, *202*, 89-100. doi:10.1016/j.virusres.2014.11.019
- Navarro-Lopez, R., Solis-Hernandez, M., Rocha-Martinez, M. K., Eberl, S., Gomez-Romero, N., Velazquez-Salinas, L., & Estrada-Franco, J. G. (2022). Near-Full-Length Genome Sequences Representing an Event of Zooanthroponotic Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B.1.189 in Mexico during 2020. *Microbiol Resour Announc*, e0049722. doi:10.1128/mra.00497-22
- Newman, A., Smith, D., Ghai, R. R., Wallace, R. M., Torchetti, M. K., Loiacono, C., . . . Barton Behravesh, C. (2020). First Reported Cases of SARS-CoV-2 Infection in Companion Animals - New York, March-April 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, *69*(23), 710-713. doi:10.15585/mmwr.mm6923e3
- Okba, N. M. A., Müller, M. A., Li, W., Wang, C., GeurtsvanKessel, C. H., Corman, V. M., . . . Haagmans, B. L. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis*, *26*(7), 1478-1488. doi:10.3201/eid2607.200841
- Okba, N. M. A., Müller, M. A., Li, W., Wang, C., GeurtsvanKessel, C. H., Corman, V. M., . . . Haagmans, B. L. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis*, *26*(7), 1478-1488. doi:10.3201/eid2607.200841
- Oreshkova, N., Molenaar, R. J., Vreman, S., Harders, F., Oude Munnink, B. B., Hakze-van der Honing, R. W., . . . Stegeman, A. (2020). SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *25*(23), 2001005. doi:doi:<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005>
- Oudit, G. Y., & Pfeffer, M. A. (2020). Plasma angiotensin-converting enzyme 2: novel biomarker in heart failure with implications for COVID-19. *European Heart Journal*, *41*(19), 1818-1820. doi:10.1093/eurheartj/ehaa414
- Palmer, M. V., Martins, M., Falkenberg, S., Buckley, A., Caserta, L. C., Mitchell, P. K., . . . Diel, D. G. (2021). Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to SARS-CoV-2. *J Virol*, *95*(11). doi:10.1128/jvi.00083-21
- Patterson, E. I., Elia, G., Grassi, A., Giordano, A., Desario, C., Medardo, M., . . . Decaro, N. (2020). Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy. *Nat Commun*, *11*(1), 6231. doi:10.1038/s41467-020-20097-0
- Perera, R. A., Mok, C. K., Tsang, O. T., Lv, H., Ko, R. L., Wu, N. C., . . . Peiris, M. (2020). Serological assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), March 2020. *25*(16), 2000421. doi:doi:<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.16.2000421>
- Plummer, G., & Benyesh-Melnick, M. (1964). A Plaque Reduction Neutralization Test for Human Cytomegalovirus. *117*(1), 145-150. doi:10.3181/00379727-117-29520
- Prince, T., Smith, S. L., Radford, A. D., Solomon, T., Hughes, G. L., & Patterson, E. I. (2021). SARS-CoV-2 Infections in Animals: Reservoirs for Reverse Zoonosis and Models for Study. *Viruses*, *13*(3), 494. doi:10.3390/v13030494
- Raj, V. S., Mou, H., Smits, S. L., Dekkers, D. H. W., Müller, M. A., Dijkman, R., . . . Haagmans, B. L. (2013). Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*, *495*(7440), 251-254. doi:10.1038/nature12005
- Ramadan, N., & Shaib, H. (2019). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): A review. *Germs*, *9*(1), 35-42. doi:10.18683/germs.2019.1155

- REED, L. J., & MUENCH, H. (1938). A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS¹². *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493-497. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408 %J American Journal of Epidemiology
- Renu, K., Prasanna, P. L., & Valsala Gopalakrishnan, A. (2020). Coronaviruses pathogenesis, comorbidities and multi-organ damage – A review. *Life Sciences*, 255, 117839. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117839>
- Rockx, B., Kuiken, T., Herfst, S., Bestebroer, T., Lamers, M. M., Oude Munnink, B. B., . . . Haagmans, B. L. (2020). Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science*, 368(6494), 1012-1015. doi:10.1126/science.abb7314
- Saif, L. J. (2010). Bovine Respiratory Coronavirus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26(2), 349-364. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.005>
- Salamanna, F., Maglio, M., Landini, M. P., & Fini, M. (2020). Body Localization of ACE-2: On the Trail of the Keyhole of SARS-CoV-2. *Frontiers in Medicine*, 7. doi:10.3389/fmed.2020.594495
- Salje, H., Rodríguez-Barraquer, I., Rainwater-Lovett, K., Nisalak, A., Thaisomboonsuk, B., Thomas, S. J., . . . Cummings, D. A. T. (2014). Variability in Dengue Titer Estimates from Plaque Reduction Neutralization Tests Poses a Challenge to Epidemiological Studies and Vaccine Development. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(6), e2952. doi:10.1371/journal.pntd.0002952
- Schlottau, K., Rissmann, M., Graaf, A., Schön, J., Sehl, J., Wylezich, C., . . . Beer, M. (2020). SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. *The Lancet Microbe*, 1(5), e218-e225. doi:10.1016/S2666-5247(20)30089-6
- Schultze, B., Enjuanes, L., Cavanagh, D., & Herrler, G. (1993). N-Acetylneuraminic Acid Plays a Critical Role for the Haemagglutinating Activity of Avian Infectious Bronchitis Virus and Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus. In H. Laude & J.-F. Vautherot (Eds.), *Coronaviruses: Molecular Biology and Virus-Host Interactions* (pp. 305-310). Boston, MA: Springer US.
- Schultze, B., & Herrler, G. (1992). Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells. 73(4), 901-906. doi:<https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-4-901>
- Schultze, B., Krempl, C., Ballesteros, M. L., Shaw, L., Schauer, R., Enjuanes, L., & Herrler, G. (1996). Transmissible gastroenteritis coronavirus, but not the related porcine respiratory coronavirus, has a sialic acid (N-glycolylneuraminic acid) binding activity. 70(8), 5634-5637. doi:10.1128/jvi.70.8.5634-5637.1996
- Schultze, B., Wahn, K., Klenk, H.-D., & Herrler, G. (1991). Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-destroying and receptor-binding activity. *Virology*, 180(1), 221-228. doi:[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90026-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90026-8)
- Segalés, J., Puig, M., Rodon, J., Avila-Nieto, C., Carrillo, J., Cantero, G., . . . Vergara-Alert, J. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in a cat owned by a COVID-19-affected patient in Spain. 117(40), 24790-24793. doi:10.1073/pnas.2010817117
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. 117(21), 11727-11734. doi:10.1073/pnas.2003138117
- Sharun, K., Tiwari, R., Patel, S. K., Karthik, K., Iqbal Yattoo, M., Malik, Y. S., . . . Dhama, K. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in domestic animals and wildlife: advances and prospects in the development of animal models for vaccine and therapeutic research. *Hum Vaccin Immunother*, 16(12), 3043-3054. doi:10.1080/21645515.2020.1807802
- Sheward, D. J., Kim, C., Ehling, R. A., Pankow, A., Castro Dopico, X., Dyrdak, R., . . . Murrell, B. (2022). Neutralisation sensitivity of the SARS-CoV-2 omicron (B.1.1.529) variant: a cross-sectional

- study. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(6), 813-820. doi:[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00129-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00129-3)
- Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., . . . Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*, 368(6494), 1016-1020. doi:10.1126/science.abb7015
- Sia, S. F., Yan, L. M., Chin, A. W. H., Fung, K., Choy, K. T., Wong, A. Y. L., . . . Yen, H. L. (2020). Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*, 583(7818), 834-838. doi:10.1038/s41586-020-2342-5
- Sit, T. H. C., Brackman, C. J., Ip, S. M., Tam, K. W. S., Law, P. Y. T., To, E. M. W., . . . Peiris, M. (2020). Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature*, 586(7831), 776-778. doi:10.1038/s41586-020-2334-5
- Sit, T. H. C., Brackman, C. J., Ip, S. M., Tam, K. W. S., Law, P. Y. T., To, E. M. W., . . . Peiris, M. (2020). Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature*, 586(7831), 776-778. doi:10.1038/s41586-020-2334-5
- Song, D., Moon, H., & Kang, B. (2015). Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin Exp Vaccine Res*, 4(2), 166-176.
- SS-México. (2021a). Covid-19 México. Retrieved from <https://datos.covid-19.conacyt.mx>
- SS-México. (2021b). Covid-19 México. Retrieved from <https://datos.covid-19.conacyt.mx>
- Stevanovic, V., Vilibic-Cavlek, T., Tabain, I., Benven, I., Kovac, S., Hruskar, Z., . . . Barbic, L. (2021). Seroprevalence of SARS-CoV-2 infection among pet animals in Croatia and potential public health impact. *Transbound Emerg Dis*, 68(4), 1767-1773. doi:10.1111/tbed.13924
- Szczepanski, A., Owczarek, K., Bzowska, M., Gula, K., Drebot, I., Ochman, M., . . . Pyrc, K. (2019). Canine Respiratory Coronavirus, Bovine Coronavirus, and Human Coronavirus OC43: Receptors and Attachment Factors. *Viruses*, 11(4). doi:10.3390/v11040328
- Tresnan, D. B., Levis, R., & Holmes, K. V. (1996). Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *70*(12), 8669-8674. doi:10.1128/jvi.70.12.8669-8674.1996
- Tyrrell, D. A. J., & Bynoe, M. L. (1966). CULTIVATION OF VIRUSES FROM A HIGH PROPORTION OF PATIENTS WITH COLDS. *The Lancet*, 287(7428), 76-77. doi:10.1016/S0140-6736(66)92364-6
- Udom, K., Jairak, W., Chamsai, E., Charoenkul, K., Boonyapisitsopa, S., Bunpapong, N., . . . Amonsin, A. (2021). Serological survey of antibodies against SARS-CoV-2 in dogs and cats, Thailand. *Transbound Emerg Dis*, n/a(n/a). doi:<https://doi.org/10.1111/tbed.14208>
- van der Hoek, L. (2007). Human coronaviruses: what do they cause? *Antivir Ther*, 12(4 Pt B), 651-658.
- Wang, K., Gheblawi, M., & Oudit, G. Y. (2020). Angiotensin Converting Enzyme 2. *Circulation*, 142(5), 426-428. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047049
- Wang, M.-Y., Zhao, R., Gao, L.-J., Gao, X.-F., Wang, D.-P., & Cao, J.-M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *10*. doi:10.3389/fcimb.2020.587269
- WHO. (12 January 2020). Novel Coronavirus – China. Retrieved from <https://www.who.int/csr/don/12-january-2020-novel-coronavirus-china/en/>
- Widagdo, W., Okba, N. M. A., Stalin Raj, V., & Haagmans, B. L. (2017). MERS-coronavirus: From discovery to intervention. *One Health*, 3, 11-16. doi:10.1016/j.onehlt.2016.12.001
- Williams, E., Carter, A., Rendle, J., & Ward, S. (2021). Impacts of COVID-19 on animals in zoos: a longitudinal multi-species analysis. *2*(2), 130-145.

- Williams, R. K., Jiang, G. S., & Holmes, K. V. (1991). Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *88*(13), 5533-5536. doi:doi:10.1073/pnas.88.13.5533
- Windsor, I. W., Tong, P., Lavidor, O., Sanjari Moghaddam, A., McKay, L. G. A., Gautam, A., . . . Harrison, S. C. (2022). Antibodies induced by ancestral SARS-CoV-2 strain that cross-neutralize variants from Alpha to Omicron BA.1. *Sci Immunol*, eabo3425. doi:10.1126/sciimmunol.abo3425
- Woo, P. C., Lau, S. K., Chu, C. M., Chan, K. H., Tsoi, H. W., Huang, Y., . . . Yuen, K. Y. (2005). Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol*, *79*(2), 884-895. doi:10.1128/jvi.79.2.884-895.2005
- Wu, K., Li, W., Peng, G., & Li, F. (2009). Crystal structure of NL63 respiratory coronavirus receptor-binding domain complexed with its human receptor. *106*(47), 19970-19974. doi:doi:10.1073/pnas.0908837106
- Yang, Y., Xiao, Z., Ye, K., He, X., Sun, B., Qin, Z., . . . Zhao, W. (2020). SARS-CoV-2: characteristics and current advances in research. *Virology Journal*, *17*(1), 117. doi:10.1186/s12985-020-01369-z
- Yeager, C. L., Ashmun, R. A., Williams, R. K., Cardellichio, C. B., Shapiro, L. H., Look, A. T., & Holmes, K. V. (1992). Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*, *357*(6377), 420-422. doi:10.1038/357420a0
- Zhang, Q., Zhang, H., Huang, K., Yang, Y., Hui, X., Gao, J., . . . Jin, M. (2020). SARS-CoV-2 neutralizing serum antibodies in cats: a serological investigation. In: bioRxiv.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., . . . Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, *382*(8), 727-733. doi:10.1056/NEJMoa2001017

Figure legends

Figure 1. Map of Mexico with the distribution of Sars-CoV-2 -positive dog and cat samples by MN and PRNT90. The illustration of dogs and cats represents the locations of the samples, the red color represents the states with positive samples, and the blue color represents the states with negative samples identified in this study.

Figure 2. Pearson correlation between PRNT90 vs. MN. a. Pearson correlation was performed between PRNT90 and MN using positive samples from dogs (n = 30) and cats (n = 9). PRNT90: plaque reduction neutralization test; MN: microneutralization. **b.** Pearson correlation was performed for results obtained with the PRNT90 Ómicron variant (BA.1) and PRNT90 Wuhan variant (B.1.189) using positive samples from dogs (n = 1052) and cats (n

= 59). PRNT90: plaque reduction neutralization test; 33.3%. **c.** Pearson correlation was performed for results obtained with the MN Ómicron variant (BA.1) and MN Wuhan variant (B.1.189) using samples from dogs (n = 1052) and cats (n = 59). MN: microneutralization.

Table 1. Dog and cat serum sample characteristics

Source	Cats (n)	Dogs (n)	State of origin
Household	9	264	Coahuila, Chihuahua, México City, Durango, Estado de México, Michoacán, Nuevo León, Puebla, Yucatán and Jalisco.
Urban free-ranging	13	142	Chihuahua, México City, Guerrero, Estado de México, Nuevo León, Puebla, Quintana Roo and Yucatán.
Shelter	6	118	Estado de México, México City, Puebla and Yucatán.
Federal border inspection agencies	0	50	Aguas Calientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Colima, Chiapas, Chihuahua, México City, Durango, Jalisco, Estado de México, Nuevo León, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Yucatán and Zacatecas.
Deidentified serum samples	31	478	Sonora.

Table 2. Seroprevalence of neutralizing antibodies in cats

ID	Origin	State	Health history	PRNT90 Wuhan (B.1.189)	MN Wuhan (B.1.189)	PRNT90 Ómicron (BA.1)	MN Ómicron (BA.1)
546	Household	Puebla	Healthy	1:320	1:320	1:160	1:40
547	Household	Puebla	Healthy	1:640	1:80	1:320	1:40
548	Household	Puebla	Healthy	1:160	1:160	1:80	1:20
476	Shelter	Estado de Mexico	Healthy	1:40	1:20	1:40	1:10
608	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:40	1:10	1:10	negative
615	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:160	1:40	1:40	1:10

620	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:40	1:10	1:10	negative
626	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:40	1:20	1:20	1:10
1049	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:40	1:10	1:20	negative

Table 3. Seroprevalence of neutralizing antibodies in dogs

ID	Source	State of origin	Health history	PRNT90 Wuhan (B.1.189)	MN Wuhan (B.1.189)	PRNT90 Ómicron (BA.1)	MN Ómicron (BA.1)
545	Household	Puebla	Healthy	1:40	1:10	negative	negative
549	Household	Puebla	Severe disease	1:20	1:10	negative	negative
539	Urban free-ranging	Mexico City	Healthy	1:80	1:20	1:40	1:10
538	Urban free-ranging	Puebla	Healthy	1:40	1:20	1:10	negative
483	Shelter	Estado de Mexico	Moderately ill	1:40	1:10	1:10	negative
688	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:640	1:320	1:320	1:160
698	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:40	1:10	1:20	1:10
709	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:40	1:10	1:10	negative
758	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:160	1:40	1:40	1:10
763	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:40	1:20	1:20	1:10
767	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:40	1:10	1:10	negative
774	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:20	1:10	negative	negative
785	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:40	1:10	1:20	1:10
873	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:40	1:20	1:20	1:10
874	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:20	1:10	negative	negative
875	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:20	1:10	negative	negative
885	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:20	1:10	negative	negative
888	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:40	1:20	1:10	1:10
892	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:320	1:80	1:160	1:40
904	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:20	1:10	negative	negative
907	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:80	1:20	1:40	1:20
964	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:40	1:10	1:40	1:10

992	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:20	1:10	negative	negative
1028	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:40	1:10	1:10	negative
1041	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:40	1:10	1:10	negative
1043	Deidentified serum samples	Sonora	Unknow	1:40	1:20	1:40	1:10
540	Federal border inspection agencies	Chiapas	Healthy	1:80	1:40	1:40	1:20
1075	Federal border inspection agencies	Mexico City	Moderately ill	1:40	1:10	1:20	1:10
1092	Federal border inspection agencies	Quintana Roo	Moderately ill	1:40	1:40	1:40	1:20
1106	Federal border inspection agencies	Chiapas	Healthy	1:40	1:10	1:20	1:10

Table 4. Neutralizing antibodies aganits Ancestral strain and Ómicron BA.1 subvariant in the positive control samples

Positive controls	Antisera origin	PRNT90 Ancestral strain	MN Ancestral strain	PRNT90 Ómicron (BA.1)	MN Ómicron (BA.1)
CPALBS32021014	Ancestral strain	1:40	1:20	1:20	1:10
CPALBS32022011	Ómicron (BA.1)	1:80	1:40	1:80	1:40
CPALBS32021014	Ancestral strain	1:20	1:20	1:20	1:10
CPALBS32022011	Ómicron (BA.1)	1:40	1:20	1:40	1:20
CPALBS32021014	Ancestral strain	1:40	1:20	1:20	1:10
CPALBS32022011	Ómicron (BA.1)	1:80	1:40	1:80	1:40
CPALBS32021014	Ancestral strain	1:40	1:20	1:20	1:10
CPALBS32022011	Ómicron (BA.1)	1:80	1:40	1:80	1:40
CPALBS32021014	Ancestral strain	1:20	1:10	1:20	1:10
CPALBS32022011	Ómicron (BA.1)	1:80	1:40	1:80	1:40

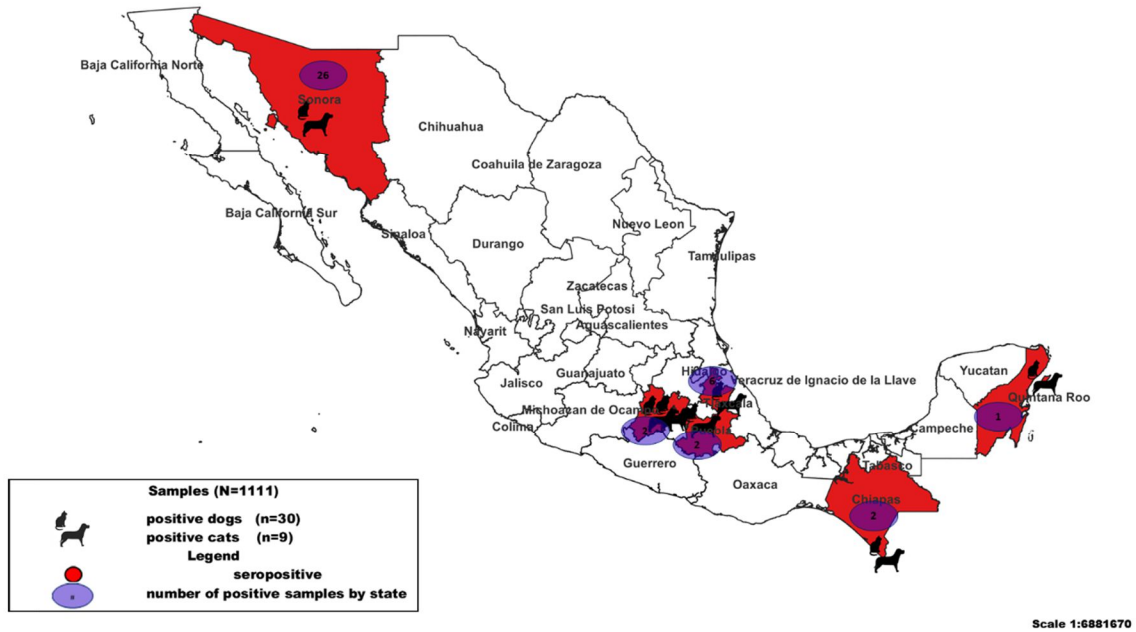
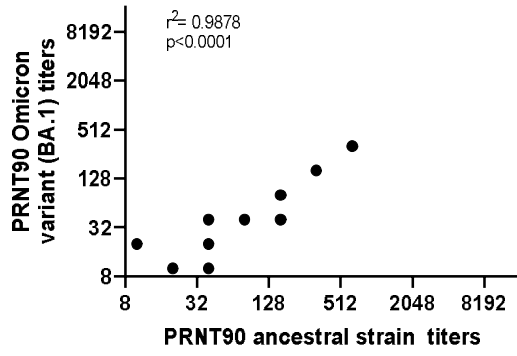
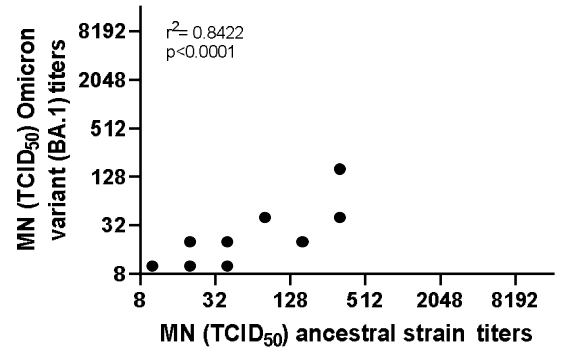


Figure 1.

A

B**C****Figure 2.**