

Identificación y secuenciación de SARS-CoV-2 en una leona africana (*Panthera leo*), bajo el cuidado técnico profesional, en Colombia

Identification and genomic sequencing of SARS-CoV-2 in an African lioness (*Panthera leo*), under professional technical care in Colombia

Angela Natalia Agudelo-Suárez, Martha Isabel Murcia-Aranguren,
Juan G. Rodríguez-Castillo, Emiliano Barreto-Hernández,
Andres Pinzón-Velásquez, Catalina Rodríguez-Álvarez,
María A. Velásquez-Villamil, Angie P. Sarmiento-Hernández,
Edison Alonso Toloza, Raúl A. Gómez-Zambrano,
Paola A. Marín-Valencia y Laura V. Sánchez-Quintana

Recibido 12 noviembre 2021 / Enviado para modificación 16 febrero 2022 / Aceptado 28 febrero 2022

RESUMEN

Objetivo Identificar y caracterizar el virus SARS-CoV-2 en una leona africana (*Panthera leo*), hembra, de edad avanzada, que presentó por varios meses signos relacionados con enfermedad respiratoria atípica.

Métodos Se tomaron muestras de hisopados nasales 23 días después de haber reportado secreción nasal inicial. Se realizó la detección del virus SARS-Cov2 mediante RT-qPCR y posteriormente se caracterizó el genoma completo mediante secuencia Illumina.

Resultados Desde el punto de vista clínico, los resultados encontrados en las muestras de sangre no mostraron cambios evidentes que se pudieran relacionar con el virus o con todos los signos descritos desde el inicio del caso. Para la secuenciación genómica los análisis mostraron una alineación múltiple comparativa entre los tres genomas (muestra Leona, FIP u NC_045512 [Wu han]) por medio de Mauve, centrado en los genes Spike, E y M (archivo complementario, parte B). Se logró identificar 5 segmentos muy similares entre Leona y NC_045512 (Wuhan).

Conclusiones Es necesario adelantar más investigaciones para estandarizar el diagnóstico de esta patología en los animales. Así mismo, se requieren estudios genómicos en estas especies. Además, se evidenció con la revisión del estado de la cuestión que existen muchos vacíos del conocimiento en la implicación zoonótica de la pandemia y en el conocimiento de este virus en animales domésticos y silvestres, lo que supone un reto importante para las investigaciones de aquí en adelante.

Palabras Clave: PCR; infecciones por coronavirus; leones; animales salvajes; secuencia Illumina (*fuentes: DeCS, BIREME*).

ABSTRACT

Objective To identify and characterize the SARS-CoV-2 virus in an elderly African lioness (*Panthera leo*) that presented signs related to atypical respiratory disease for several months.

Methods Nasal swab samples were taken 23 days after infection. have reported initial nasal discharge.

Results The SARS-Cov2 virus was detected by RT-qPCR and the complete genome was subsequently characterized by Illumina sequencing. The results found in the blood samples did not show obvious changes that could be related to the virus or to the

AA: MV. M. Sc. Salud Pública. Ph. D. Salud Pública. Parque Jaime Duque-Bioparque Wakatá, Tocancipá. Cundinamarca, Colombia. naportvet@hotmail.com
MM: Bacterióloga. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina. Bogotá, Colombia. mimurciaa@unal.edu.co
JR: Biol. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina. Bogotá, Colombia. jrodriguez@unal.edu.co
EB: Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Biotecnología. Bogotá, Colombia. ebarretoh@unal.edu.co
AP: Biólogo. Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Genética. Bogotá, Colombia. ampinzonv@unal.edu.co
CR: Biol. M. Sc. Parque Jaime Duque-Bioparque Wakatá, Tocancipá. Cundinamarca, Colombia.
cata_onca@yahoo.com
MV: MV. Parque Jaime Duque-Bioparque Wakatá, Tocancipá. Cundinamarca, Colombia. mariamv.velavi@gmail.com
AS: Zoot. Parque Jaime Duque-Bioparque Wakatá, Tocancipá. Cundinamarca, Colombia. samihuerticas@gmail.com
ET: Zoot. Parque Jaime Duque-Bioparque Wakatá, Tocancipá. Cundinamarca, Colombia. edison9@hotmail.com
RG: ATV. Parque Jaime Duque-Bioparque Wakatá, Tocancipá. Cundinamarca, Colombia. raulagomez1@gmail.com
PM: ATV. Parque Jaime Duque-Bioparque Wakatá, Tocancipá. Cundinamarca, Colombia. pam_valencia9260@hotmail.com
LS: MV. Parque Jaime Duque-Bioparque Wakatá, Tocancipá. Cundinamarca, Colombia. lauravsq8@gmail.com

signs described from the beginning of the case. For genomic sequencing the analyzes showed a comparative multiple alignment between the three genomes (sample Leona, FIP or NC_045512 (Wu han)) by means of Mauve, focusing on the Spike, E and M genes (Supplementary file, part B); 5 very similar segments between Leona and NC_045512 (Wuhan) was identified.

Conclusions It is necessary to carry out more research to standardize the diagnosis of this pathology in animals and guarantee access to it. Also, genomic studies in these species. Additionally, it was evidenced with the literature review that there are many knowledge gaps in the zoonotic implication of the Pandemic and in the knowledge of this virus in domestic and wild animals, which represents an important challenge for research from now on.

Key Words: RT-qPC; coronavirus infections; lions; wild animals; Illumina sequence (source: MeSH, NLM).

El síndrome respiratorio agudo severo causado por el coronavirus tipo 2 (SARS-CoV-2), descubierto en Wuhan (China) en el 2019, culpable de la actual pandemia de COVID-19, ha causado millones de casos confirmados en humanos de todo el mundo y otros cuantos confirmados en animales tanto domésticos como silvestres (1-5). También ha generado un sin número de problemáticas sociales, económicas, culturales, etc., en todo el mundo. Por ello, es importante abordar esta problemática desde otras disciplinas que complementen el enfoque epidemiológico predominante (6).

Desde el inicio de la pandemia en el 2020 se sospechó de su origen zoonótico, tal como se confirmó posteriormente, pese a que aún no se tiene total claridad del papel que pueden jugar los animales silvestres y domésticos en la cadena de transmisión entre las especies animales y los seres humanos y viceversa (7,8).

Los coronavirus han sido protagonistas de otras pandemias años atrás y han representado una preocupación constante en el mundo de la salud animal por más de treinta años, durante los cuales se han llevado a cabo múltiples investigaciones para entender el comportamiento de estos virus y cómo sería el mejor manejo, tratamiento o vacuna (si es el caso). Pese a todos estos esfuerzos, muchos coronavirus no se han podido eliminar, aunque y sí se han podido controlar parcialmente (9-11), como el caso del coronavirus felino (FCoV) causante de la peritonitis infecciosa felina (PIF), una patología que no solo afecta a los felinos domésticos, sino al parecer a felinos y otros animales silvestres. Sin embargo, aún existen muchos vacíos del conocimiento respecto a esta enfermedad que se sigue investigando alrededor del mundo y los resultados que se han obtenido a través del tiempo podrían ayudar al entendimiento de los casos de SARS-CoV-2 actuales desde lo clínico (12-16).

A la fecha se han publicado más de 1000 artículos científicos sobre el SARS-CoV-2 en humanos. No obstante, aún existen varios interrogantes sobre este virus (1-16). En contraste, es mucho menor el número de publicaciones sobre el SARS-CoV-2 en animales domésticos y silvestres, lo cual constituye un reto para la salud pública.

En el caso específico de la identificación molecular de SARS-CoV-2 en animales hay muy pocas publicaciones, pese a que el virus se ha encontrado en tigres y leones (siete animales en total del Zoológico del Bronx en Nueva York), en primates no humanos, en trece gatos y en cuatro perros alrededor del mundo. Además, en estudios experimentales han resultado susceptibles los felinos, los hurones, primates y cerdos principalmente (3-11,13-15).

MÉTODOS

Descripción del caso

La identificación molecular de SARS-CoV-2 se realizó en una leona africana (*Panthera leo*), de 16 años, que vivía bajo cuidado humano en un zoológico colombiano. Los signos que podrían estar relacionados con el cuadro se reportaron en 2021 (Figuras 1 y 2).

Revisión de información

Se realizaron diferentes búsquedas en inglés y español en buscadores como SCOPUS, Medline, Scielo, BVS, PubMed y Google Académico. Los descriptores usados fueron “coronavirus”, “felinos”, “SARS-CoV-2”, “animales domésticos”, “animales silvestres”, “felinos silvestres”, “humanos”, “identificación molecular”, “COVID-19”.

Muestras clínicas

Las muestras de sangre de la leona fueron tomadas con los protocolos descritos por la medicina veterinaria para toma de muestras y se enviaron refrigeradas a un laboratorio veterinario avalado para su procesamiento.

Toma y transporte de la muestra de hisopado nasal

Las muestras de hisopado nasal se tomaron con un hisopo estéril haciendo movimiento rotatorio en cada fosa nasal, introduciendo lo más posible el hisopo. Cada hisopo fue depositado en cada medio de transporte haciendo movimientos rotatorios y dejando la punta del hisopo sumergido en cada medio de transporte viral, que se preparó en la sala de medios de cultivo del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad

Figura 1. Resumen descripción del caso de la leona africana (*Panthera leo*), 2021

26/02/21	Se reporta a la paciente con sonidos respiratorios anormales.
03/03/21	Se revisa por Médico Veterinario: Se evidencia sonido respiratorio superior y respiración agitada.
04/03/21	Inicia tratamiento con Trimetoprim sulfametoxazol.
08/03/21	Se toman muestras de sangre a voluntad por condicionamiento operante.
09/03/21	Se inicia tratamiento Biorregulador para soporte renal.
19/03/21	Se observa depresión central en la punta de la nariz.
22/03/21	Se han reducido los sonidos y se inicia nebulización.
25/03/21	Se observa mayor depresión central en la punta de la nariz y deformidad de esta.
20/04/21	Amanece muy decaída. Se está entrenando para tomar radiografía de cabeza a voluntad.
21/04/21	Se inicia tratamiento con Clembuterol.
03/05/21	Se realiza la radiografía. Se evidencia destrucción del cartílago de ambas fosas nasales.
04-23-05/21	Se suspende el tratamiento antibiótico. Se evalúa la posibilidad de imprimir unos stents nasales en material biocompatible a EEUU para colocárselos y mejorar su respiración y calidad de vida.
24/05/21	Amanece muy deprimida, débil, disnea muy marcada y secreción nasal.
25/05/21	Se realiza anestesia, toma de muestras, medicación, hidratación y profilaxis dental. Se sospecha de causa infecciosa. Se colocan stents nasales provisionales. Nota: llama la atención un marcado edema en la región faríngea y las amígdalas aumentadas de tamaño lo que no permite la intubación endotraqueal.
29/05/21	Se observa a la leona de mucho mejor ánimo y los sonidos respiratorios han desaparecido casi por completo. Todos los tratamientos se ofrecían por medio del condicionamiento operante (entrenamiento) por parte del área de salud comportamental.
10/06/21	No está respondiendo bien al entrenamiento para recibir el tratamiento. Se observa nuevamente dificultad respiratoria. Se está en proceso de mandar a imprimir los stents nasales en EEUU.
15/06/21	No ha querido comer nada desde hace más de 5 días y está respirando por la boca y no se ve bien. Por lo que es necesario anestesiarla nuevamente y tomar la mejor decisión para la paciente.
16/06/21	Se anestesia se evidencia que ha perdido alrededor de 30 kg, se observa una deshidratación de 8-10%, una CC de 1/5. Al retirar los stents provisionales y realizar palpación de los conductos nasales se evidencia que además de la destrucción del cartílago se están afectando los cornetes. Se toman muestras entre ellas para PCR de SARS-CoV-2. Se realiza la eutanasia con Euthanex® IV. Se incinera el cadáver por riesgo de salud pública.

Fuente: historia clínica de la leona.

Figura 2. Radiografía lateral de cabeza de la leona africana (*Panthera leo*), 2021



Se indica el cartílago nasal completamente destruido y deformado. Fuente: historia clínica de la leona.

Nacional de Colombia, de acuerdo con el protocolo suministrado por el Instituto Nacional de Salud. Brevemente, para 400 ml de Caldo BH1, se agregaron 27 ml de albúmina bovina fracción V (7,5%), 4 ml de penicilina 10,000 unidades/ml y 3,2 ml de anfotericina B 250 ug/ml. Una vez depositados los hisopos en los medios de transporte correspondientes y se llevó bajo refrigeración de inmediato al laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

Extracción de ARN viral del SARS-Cov2

El kit empleado para la extracción del ARN viral fue *MGIEasy Nucleic Acid Extraction Kit* (39), el cual hace uso de la tecnología de perlas supermagnéticas que se unen a los ácidos nucleicos. Inicialmente se empleó un tampón de lisis para romper las células y la cápsula viral, seguido de una separación magnética del ADN/ARN. Luego se hicieron tres lavados antes de eluir el ADN/ARN en agua libre de RNAasas. A continuación, se llevó a cabo el protocolo resumido, seguido de las instrucciones del fabricante: se agregaron 200 μ L de muestra a la mezcla de tampón de lisis preparada previamente (perlas supermagnéticas, proteinasa K, etanol y solución MLB, como lo indica el fabricante), y se realizó vórtex durante 1 min. Seguidamente se centrifugó a 11000 rpm por 1 min e inmediatamente se colocó en el soporte magnético durante 1 min. Después de que el líquido aclaró, se desechó el líquido sobrenadante. Se añadieron 500 μ L de tampón MW1 y se retiró el tubo del soporte magnético; luego se mezcló bien durante 5-10 s. El tubo de centrifuga se colocó de nuevo en el soporte magnético durante 1 min. Una vez que el líquido quedó completamente claro, se desechó el sobrenadante. Luego se añadieron 500 μ L

de tampón MW2. Se retiró el tubo del soporte magnético y se mezcló bien durante 5-10 s. Se colocó el tubo de centrifuga en el soporte magnético durante 1 min y se desechó el sobrenadante como se indicó anteriormente. El siguiente paso fue agregar 600 μ L de etanol absoluto y se retiró el tubo de centrifuga del soporte magnético. Se mezcló bien durante 5-10 s y se colocó de nuevo en el soporte magnético durante 1 min. Una vez que el líquido quedó completamente claro, se desechó el sobrenadante. Luego se incubó a 56°C hasta que se evaporó todo el etanol. Luego se retiró el tubo de centrifuga del soporte magnético y se adicionaron 50 μ L de agua libre de RNasa. Se mezcló y se incubó a 56°C, 1200 rpm durante 3 min. Después de los 3 min, se colocó el tubo de centrifuga en el soporte magnético. Después de que el líquido quedó completamente transparente, se transfirió con cuidado 47 μ L de la solución de ARN a un tubo de 1,5 ml. Se etiquetó y se almacenó a -25 °C.

Detección de los genes E y RdRp del virus SARS-Cov2 mediante tiempo real RT-qPCR

Se empleó la tecnología TaqMan estandarizada por el grupo de virología de Charité-Berlin (40) con algunas modificaciones. Los iniciadores y sonda utilizados para la detección de los genes E y RdRp fueron los diseñados por el mismo grupo de virología de Charité-Berlin para la detección del ARN viral (17). Como control de la extracción para detectar falsos negativos debido a inhibidores de la muestra, se empleó el gen humano de la ribonucleasa P (RNasa P), cuya detección fue estandarizada por el Grupo de Biología Molecular de la Secretaría de Salud de Bogotá (comunicación personal). Los iniciadores y sondas de los genes analizados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Iniciadores y sondas empleadas en la detección de SARS-Cov1

Nombre del primer sonda	Secuencia de los primers/Sondas 5'-3'
RNAse P For.	AGATTTGGACCTGCGAGCG
RNAse P Rev.	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT
RNAse P Pro1	FAM-TTCTGACCT-Nova-GAAGGCTCTGCGCG-BHQ-1
RdRp_SARSr-F2	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
RdRp_SARSr-R1	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA
RdRp SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGCGAGATGC-BHQ-1
E-Sarbeco-F1	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
E-Sarbeco-R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA
E-Sarbeco-P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ-1

Se empleó la mezcla Luna Universal Probe One Step (New England Biolabs) para la amplificación. La concentración de reacción de los iniciadores para los genes E y RdRp es de 0,4 μ M y de la sonda de 0,2 μ M. Para el gen RNAasaP, la concentración de los iniciadores es de

0,2 μ M y la sonda de 0,15 μ M. El volumen de la reacción de amplificación fue de 20 μ L, de los cuales 5 μ L corresponden al ARN extraído. Posteriormente se colocó en el termociclador y el programa de ciclaje fue el siguiente: 50°C 15' (obtención del cDNA), seguido de 40 ciclos de

95°C5', 60°C45"; la captura de la fluorescencia se realiza en el paso de extensión, es decir, durante los 60°C 45". Las sondas E y RdRp son detectadas en el canal FAM y la sonda de RNasa P es detectada en el canal HEX. Las muestras fueron consideradas positivas cuando la fluorescencia sobrepasa el umbral de detección en un Ct menor a 38. De lo contrario, fueron consideradas negativas.

Secuenciación del genoma

La biblioteca de secuenciación de Nanopore se preparó de acuerdo con el protocolo de secuenciación ARTIC nCoV-2019 v3 (LoCost) (<https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-v3-locost-bh42j8ye>).

La muestra se transcribió inversamente con el kit LunaScript® RT SuperMix (New England BioLabs), y los 2 grupos de amplicones de virus de PCR se prepararon con paneles de cebadores IDT ARTIC nCoV-2019 V3. Se utilizaron el kit EXP-NBD196-Oxford Nanopore y el kit SQK-LSK109-XL-Oxford Nanopore para el código de barras y la ligadura, respectivamente. Se usaron perlas magnéticas Ampure XP (Angencourt Bioscience Corporation, MA, EE. UU.) en los pasos de limpieza, y se usó el kit de ADN Qubit HS (Thermo Fisher Scientific Inc.) para las cuantificaciones de grupos y bibliotecas. La biblioteca se cargó y secuenció en un secuenciador MinION Mk1C (Oxford Nanopore), usando una celda de flujo FLO-MIN-106D. MinKNOW, versión 21.05.8 realizó la amplificación de bases rápidas y demultiplexación en vivo.

Análisis bioinformático

Las lecturas obtenidas fueron preprocesadas, ensambladas y analizadas por medio de la canalización

Viralrecon (18). Brevemente, la calidad de la secuencia se determinó utilizando PycoQC. Luego se procesó posteriormente con el software Guppyplex y Artic Minion. Las métricas de alineación se obtuvieron utilizando SAMtools y Mosdepth. El análisis posterior para la determinación de variantes y la clasificación taxonómica se realizó con BCFtools, snpEff, Pangolin 3.1.16 y Nextclade 1.7.0. La implementación del algoritmo BLAST de NCBI y el software MAUVE también se utilizaron para análisis comparativos del genoma (19).

RESULTADOS

Revisión de información

Con los descriptores mencionados en el apartado de metodología, se obtuvieron más de 2 000 artículos discriminados de la siguiente manera:

- Para descriptores como SARS-CoV-2, COVID-19 en humanos: más de 1 000
- Para descriptores como SARS-CoV-2 en felinos y animales silvestres: 90
- Para descriptores como coronavirus en felinos: más de 1000
- Para descriptores como SARS-CoV-2 y zoonosis: 300

Luego de la lectura de los artículos, se escogieron —de acuerdo con su pertinencia y calidad— solo 140 para el desarrollo de este artículo.

Muestras clínicas

Los resultados obtenidos de las muestras de sangre se muestran de manera comparativa en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados comparativos de las muestras de sangre en una leona africana (*Panthera leo*), 2021

Parámetro	Resultado F1*	Resultado F2**	Resultado F3***	Unidad	Valor normal ****
Hematocrito	44	38	42,8	%	(24-51,5)
Hemoglobina	16,9	13,2	12,5	gr/dl	(11-17,7)
Eritrocitos	12,3	8,7	8,42	$\times 10^6$ cel/ μ l	(6,2-15)
VCM	46	43,7	50,8	fl	(37-58)
HCM	13,8	11	14,8	pg	(15-17)
Leucocitos	9,4	14,9	21,1	$\times 10^3$ cel/ μ l	(5-19,9)
Neutrófilos Relativo	80	65	56	%	(47-87)
Neutrófilos Absoluto	7,5	9,6	11,8	$\times 10^3$ cel/ μ l	(0,01-15,2)
Linfocitos Relativo	20	15	25	%	(8-36)
Linfocitos Absoluto	2	2,2	5,2	$\times 10^3$ cel/ μ l	(0-3,85)
Eosinófilos Relativo	0	0	5	%	(0-9)
Eosinófilos Absoluto	0	0	1,05	$\times 10^3$ cel/ μ l	(0,06-1,2)
Monocitos Relativo	0	14	14	%	(1-11,6)
Monocitos Absoluto	0	2,0	2,95	$\times 10^3$ cel/ μ l	(0-1)
Plaquetas	536	464	488	$\times 10^3$ cel/ μ l	(150-500)
Proteínas totales	8	6,6	7,8	gr/dl	(6,8-8,7)
Albumina	-	3,2	-	gr/dl	(3-4,4)
Globulina	-	3,4	-	gr/dl	(3-4,4)
Creatinina	3,6	2,3	3,1	mg/dl	(1,8-3,6)
Nitrógeno ureico	35	23	21,2	mg/dl	(19,4-51,4)
ALT	36	51	23	U/L	(25-98)
AST	34	54	39	U/L	(17-59)
FeCoV ELISA	-	Negativo	-	-	-
Observaciones al Cuadro Hemático	No	No	Neutrófilos tóxicos (30%) y abundantes agregados plaquetarios		

Fuente: Historia clínica, Zims: 2021. F1: 08/03/21 * Bajo condicionamiento operante a voluntad; F2: 25/05/21 ** Primera anestesia; F3: 16/06/21 *** Segunda anestesia. **** Valores de referencia tomados de Zims medical para Panthera leo: 2021.

Extracción de ARN viral del SARS-Cov2

Se extrajo ARN viral compatible con SARS-Cov2 de las muestras de hisopada nasal de la leona (*Panthera leo*).

Detección de los genes E y RdRp del virus SARS-Cov2 y del gen RNasa P mediante tiempo real RT-qPCR

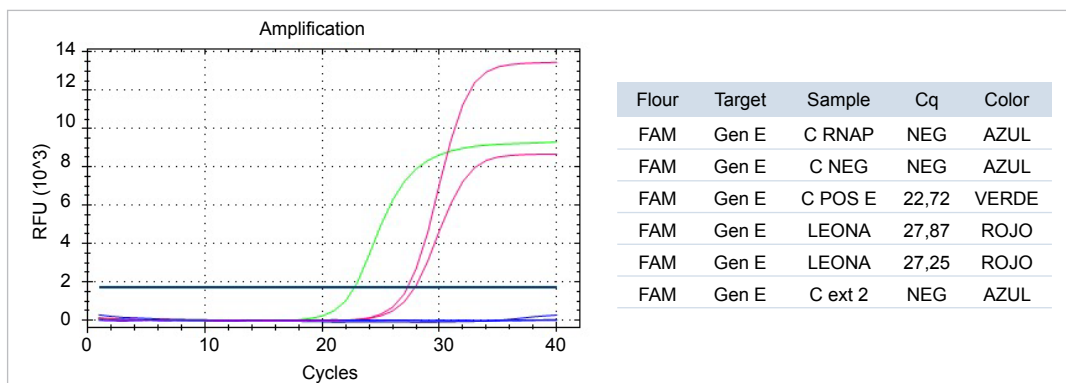
Se logró amplificar el gen E y el gen RdRp del virus SARS-Cov2 de la muestra obtenida de la leona, como se observa en las Figuras 3A y 3B, respectivamente. Igualmente, se logró detectar el gen *RNasaP* en el control positivo, indicando la ausencia de inhibidores de la PCR (Figura 3C).

Como control positivo para el gen E se empleó una muestra humana positiva para SARS-Cov2 y cuya curva se observa en la gráfica de color verde. El control negativo se observa en la gráfica de color azul.

es la mezcla de PCR sin adición de cDNA (curva de amplificación de color azul). El control de extracción (C ext 2) es una muestra humana negativa para SARS-Cov2 (curva de amplificación azul). La muestra de la leona se extrajo por duplicado y se obtuvieron, en ambos casos, un resultado positivo representado por las curvas de amplificación de color rojo.

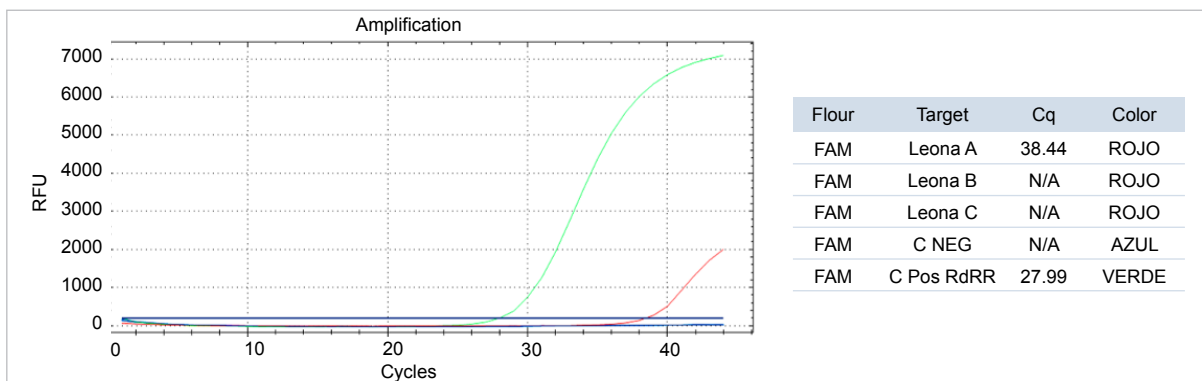
Como control positivo para el gen RdRp, se empleó una muestra humana positiva para SARS-Cov2, y cuya curva se observa en la gráfica de color verde. El control negativo es la mezcla de PCR sin adición de cDNA (curva de amplificación de color azul). La muestra de la leona se corrió por triplicado y en una de las corridas se obtuvo una curva de amplificación positiva en el límite de detección (curva de color rojo).

Figura 3A. Detección del gen E del virus SARS-Cov2 mediante tiempo real RT-qPCR de la muestra de hisopado nasal de la leona (*Panthera leo*), 2021



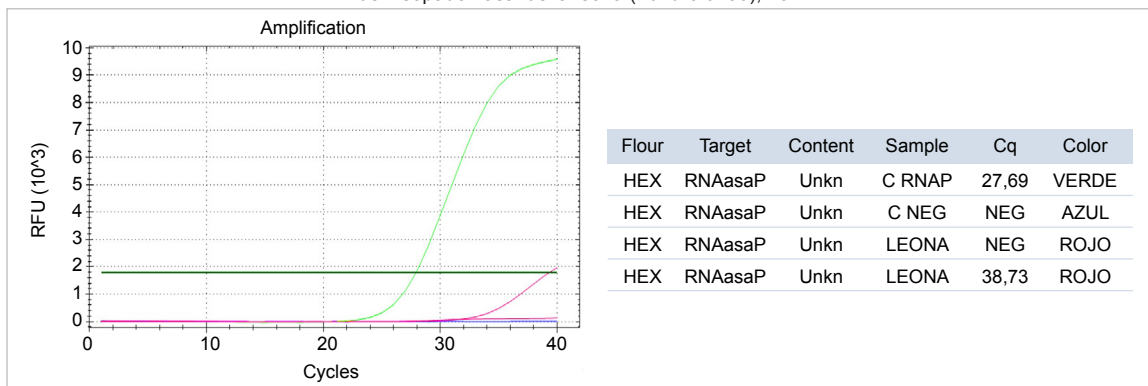
Fuente: Laboratorio de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia, 2021.

Figura 3B. Detección del gen RdRp del virus SARS-Cov-2 mediante tiempo real RT-qPCR de la muestra de hisopado nasal de la leona (*Panthera leo*), 2021



Fuente: Laboratorio de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia, 2021.

Figura 3C. Detección del gen humano RNasa P mediante tiempo real RT-qPCR de la muestra de hisopado nasal de la leona (*Panthera leo*), 2021



Fuente: Laboratorio de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, 2021.

El control positivo para el gen *RNasaP* es una muestra humana, cuyo resultado fue positivo confirmado por la presencia de la curva de amplificación de color verde. Este resultado indica que no se encontraron inhibidores de la PCR en esta muestra control. En la muestra de la leona el resultado fue negativo (curvas de amplificación de color rojo). Sin embargo, fue positiva para el gen E (Figura 4A), indicando que no hubo presencia de inhibidores de la PCR.

Análisis bioinformático

Para evaluar el origen taxonómico del ARN muestreado, se usaron dos genomas diferentes como referencia para el ensamblaje. El primero fue el aislamiento del coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo Wuhan-Hu-1 (número de identificación NC_045512.2 en la base de datos refseq del NCBI). El segundo fue el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIP) (número de identificación NC_002306.3 en la base de datos refseq del NCBI), un coronavirus que provoca una infección mortal en los felinos (20,21). El ensamblaje del genoma contra la referencia FIP no superó los requisitos mínimos de cobertura de Viralrecon y, por lo tanto, no pudo ser utilizado para un análisis posterior.

Con respecto al ensamblaje del genoma de Wuhan-Hu-1, el contenido general de N en el genoma secuenciado fue del 64%, lo que llevó a Pangolin a rechazar cualquier clasificación. Sin embargo, Nextclade pudo clasificar la secuencia del genoma como perteneciente al clado 20C e identificó las siguientes 4 mutaciones en los genes que codifican las proteínas Spike, ORF1b y ORF3a: C14408T, C23604A, G24410A y G25563T, correspondientes a las sustituciones de aminoácidos: S:P681H, S :D950N, ORF1b:P314L y ORF3a:Q57H respectivamente (20,21).

Para comprender las diferencias entre el ARN de la leona muestreado y ensamblado, el genoma de FIP y el genoma de referencia de Wuhan, se realizaron análisis

adicionales entre estos tres. Los análisis BLAST se realizaron entre FIP y el genoma ensamblado de la leona, así como entre este último y el genoma de referencia de Wuhan (NC_045512.2).

La alineación general de la leona vs. FIP mostró una cobertura total del 5%, con un 68,48% de identidad (archivo complementario X, parte A), localizada en una región específica entre las posiciones ~ 15000-210000 pb en FIP. La alineación entre la leona y NC_045512.2 mostró una cobertura del 35% con una identidad del 100%, distribuida de principio a fin de ambas secuencias (archivo complementario X, parte A). La alineación entre FIP y NC_045512 mostró una cobertura del 25%, con una identidad del 63,34% en una región localizada entre las posiciones ~ 10500-23000bp en el genoma de referencia de NC_045512 (archivo complementario X, parte A).

Se realizó una alineación múltiple comparativa entre los tres genomas por medio de Mauve (21), centrándose en los genes Spike, E y M (archivo complementario, parte B). Como se esperaba del análisis BLAST anterior, la FIP general parece estar más distante (en términos de similitud de secuencia) de NC_045512 y el genoma de la leona. Con respecto al gen de codificación de Spike, se logró identificar 5 segmentos muy similares entre la leona y NC_045512, y un segmento similar de bajo nivel entre la región de inicio de la región S, así como otros 3 segmentos de bajo nivel en la región central de la misma región S entre los tres genomas. En cuanto al gen E, no se encontró similitud entre los tres genomas, pero sí entre los genomas de leonas y NC_45512. Una situación similar se observó para el gen M.

DISCUSIÓN

El objetivo fue identificar SARS-CoV-2 en una leona africana (*Panthera leo*), hembra de edad avanzada, que

presentó por varios meses signos de enfermedad respiratoria atípica.

La brecha que existe entre las publicaciones de humanos y animales relacionadas con la pandemia es muy amplia (1,3-11,13-15,22-24) y esto evidencia, por un lado, que la preocupación por la supervivencia de la humanidad es de vital importancia, pero, por otro lado, sigue evidenciando la falta de articulación interinstitucional e interdisciplinaria para el entendimiento y afrontamiento de enfermedades como estas, que son catalogadas como zoonosis (25,26), y el enfoque predominante epidemiológico a nivel mundial para responder a estos problemas de salud pública (6).

Lo anterior se convierte en una limitación importante para lograr una comprensión integral de la problemática actual y, al mismo tiempo, aumenta los vacíos del conocimiento en la relación salud animal-humana, atrasando el diagnóstico oportuno en el caso de los animales domésticos y silvestres y en la formulación de planes de control más eficaces para la humanidad.

Pasando a la descripción del caso de la leona, cabe resaltar que luego de la revisión de los artículos publicados sobre SARS-CoV-2 en animales domésticos y silvestres, se puede decir que la paciente presentó cambios descritos en publicaciones como el aumento de tamaño de las amígdalas y secreción nasal y los cambios iniciales del cuadro hemático que podrían o no presentarse o estar relacionados con otras patologías (3-11,13-15).

Sin embargo, otros signos descritos en el caso (como los cambios estructurales en el cartílago nasal, la depresión central en la punta de la nariz, la afectación de los cornetes, sonidos respiratorios superiores y disnea) no se han descrito en las publicaciones existentes y no es posible establecer la relación de estos signos con el SARS-CoV-2. Por lo anterior, es necesario adelantar más estudios que permitan profundizar esta información en animales, sobre todo en felinos silvestres. Cabe resaltar que una de las teorías iniciales (al momento de la presentación de la depresión central en la punta de la nariz y la observación de la destrucción de los cartílagos nasales en la radiografía, luego de descartar el origen traumático) fue el posible acenso de bacterias de cavidad oral que llegaron al cartílago nasal, provocando esta destrucción (27,28). Cabe mencionar que durante el desarrollo del caso se realizó un ELISA para la detección de coronavirus felino (FeCoV) y esta salió negativa, como sucedió en ocasiones anteriores a lo largo de su vida, como se evidenció en su historia clínica.

Se logró la identificación molecular del virus de SARS-CoV-2 en esta paciente, a partir de muestras de hisopados nasales, con la técnica utilizada para el diagnóstico en humanos (descrita en la metodología) por

el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Esto muestra, por un lado, que los protocolos y técnicas de diagnóstico para SARS-CoV-2 desarrolladas en humanos son aplicables en animales domésticos y silvestres como lo muestran los pocos estudios existentes (7-9,11,29-30) y en el caso colombiano, específicamente, es fundamental realizar más estudios para estandarizar el diagnóstico en animales y generar acceso a estos procesos desde la salud animal.

Con respecto a la secuenciación genómica, el hecho de que con la base de las pipetas utilizadas no pudiera obtener una alineación factible cuando se usó el genoma de FIP como referencia (pese a que pudo obtenerla cuando se usó NC_045512 como referencia) sugiere que el ARN muestreado está más cerca del genoma de referencia de Wuhan que del coronavirus causante de FIP.

Esta sugerencia también es compatible con la mayor similitud entre la región del gen codificante Spike del genoma ensamblado entre NC_045512.2 y el genoma ensamblado, así como la ausencia total de similitud entre los genes E y M, entre NC_045512.2 y el genoma ensamblado de Leona, en comparación al genoma de FIP.

La baja similitud general entre NC_045512 y el genoma ensamblado, que también mostró un patrón cíclico de alineación seguido de una desalineación de principio a fin en ambos genomas, no permitió evaluar qué tan relacionados estaban ambos genomas. Por ello, se sospecha que una combinación de varios factores, como cebado, cobertura y mutaciones, son la causa de este patrón de ensamblaje.

Sin embargo, el genoma secuenciado por la presente fue clasificado como perteneciente al clado 20C del software Nextstrain, particularmente debido a las sustituciones identificadas P681H y D950N.

Por todo lo anterior, es preciso adelantar más investigaciones para entender las dinámicas de transmisión y patogénesis de esta infección en los animales domésticos y silvestres, y el rol que juegan para el entendimiento y la transmisión de este virus a los humanos (31-39) ♦

Agradecimientos: Agradecemos a todo el personal de ambas instituciones que apoyaron el seguimiento de este caso, a todas y cada una de las personas que aportaron para el desarrollo del caso, diagnóstico y seguimiento y un especial agradecimiento a la Dra. Martha Murcia por hacer parte de esta investigación.

REFERENCIAS

1. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res.* 24:91-8. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>.
2. Caraza JA, Quijano IS, Barbosa AB, Victoria JM, Jaramillo P. Acciones en atención clínica de perros y gatos durante la pandemia del SARS-

- COV-2 (COVID-19). COVID REMEVET. [Internet] 2020; 4(3):117-22. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/109007>.
3. Pedraza N, Zambrano D, Jaramillo DA, SARS-CoV-2 Lo Existente al Respecto de la Interrelación entre Animales y Humanos. Academia Colombiana de Ciencias Veterinarias [Internet]. 2020 [cited 2021 Oct 1]; 8(2):64-70. <https://bit.ly/3JogOw7>.
 4. Fuentes G, Ramírez LM. SARS-CoV-2: ¿Qué pasa en animales domésticos y silvestres? Rarió Guendarutubi. 2020; 3(9):112-30.
 5. Yáñez A, Ortuño D. Coronaviriosis: signos y síntomas con un enfoque en SARS CoV-2. Una revisión comparativa entre especies. Revista Bio Ciencias. 2020; 7:1-25. <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e1050>.
 6. Khan M, Adil SF, Alkhatlan HZ, Tahir MN, Saif S, Khan M, et al. CO-VID-19: A global challenge with old history, epidemiology and progress so far. Molecules. 2020; 26(1):39. <https://doi.org/10.3390/molecules26010039>.
 7. Huang X, Zhang C, Pearce R, Omenn GS, Zhang Y. Identifying the Zoonotic Origin of SARS-CoV-2 by Modeling the Binding Affinity between the Spike Receptor-Binding Domain and Host ACE2. J Proteome Res. 2020; 19(12):4844-56. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00717>.
 8. Ravelomanantsoa NA, Guth S, Andrianiana A, Andry S, Gentles A, Ranaivoson HC. The zoonotic potential of bat-borne coronaviruses. Emerg Top Life Sci. 2020; 4(4):353-69. <https://doi.org/10.1042/ETLS20200097>.
 9. Kiss I, Kecskeméti S, Tanyi J, Klingeborn B, Belák S. Prevalence and genetic pattern of feline coronaviruses in urban cat populations. Vet J. 2000; 159(1):64-70. <https://doi.org/10.1053/vtjl.1999.0402>.
 10. Stout AE, André NM, Whittaker GR. Feline coronavirus and feline infectious peritonitis in nondomestic felid species. J Zoo Wildl Med. 2021; 52(1):14-27. <https://doi.org/10.1638/2020-0134>.
 11. Zhang G, Li B, Yoo D, Qin T, Zhang X, Jia Y, et al. Animal coronaviruses and SARS-CoV-2. Transboundary and emerging diseases. 2021; 68(3):1097-110. <https://doi.org/10.1111/tbed.13791>.
 12. Perera KD, Galasiti Kankanamalage AC, Rathnayake AD, Honeyfield A, Groutas W, Chang KO, et al. Protease inhibitors broadly effective against feline, ferret and mink coronaviruses. Antiviral research. 2018;160:79-86. <https://doi.org/10.1016%2Fj.antiviral.2018.10.015>.
 13. Paltrinieri S, Rossi G, Giordano A. Relationship between rate of infection and markers of inflammation/immunity in Holy Birman cats with feline coronavirus. Research in Veterinary Science. 2014; 97(2):263-70.
 14. Bálint Á, Farsang A, Szeredi L, Zádori Z, Belák S. Recombinant feline coronaviruses as vaccine candidates confer protection in SPF but not in conventional cats. Vet Microbiol. 2014; 169(3-4):154-62. <https://doi.org/10.1016%2Fj.vetmic.2013.10.015>.
 15. Chang HW, de Groot RJ, Egberink HF, Rottier PJ. Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. J Gen Virol. 2010; 91(Pt 2):415-20. <https://doi.org/10.1099/vir.0.016485-0>.
 16. Bell ET, Malik R, Norris JM. The relationship between the feline coronavirus antibody titre and the age, breed, gender and health status of Australian cats. Aus Vet J. 2006; 84(1-2):2-7. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2006.tb13114.x>.
 17. MGIEasy Nucleic Acid Extraction Kit User Manual. Version A2.
 18. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020; 25(3):2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.
 19. Ewels P, Peltzer A, Fillinger S, Patel H, Alneberg J, Wilm A, et al. The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. Nat Biotechnol. 2020; 38:276-8. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0439-x>.
 20. Altschul S, Gish W, Miller W, Myers W, Lipman J. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990; 215:403-10.
 21. Jaimes J, Whittaker G. Feline coronavirus: Insights into viral pathogenesis based on the spike protein structure and function. Virology. 2018; 517:108-21. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.027>.
 22. Vuong W, Khan M, Fischer C, Arutyunova E, Lamer T, Shields J, et al. Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication. Nat Commun. 2020; 11(1):4282. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18096-2>.
 23. Darling A, Mau B, Blattner F, Perna N. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. Genome Res. 2004; 14(7):1394-403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>.
 24. Peltzer A, Fillinger S, Patel H, Alneberg J, Wilm A, Garcia MU, et al. The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. Nat Biotechnol 2020. <https://10.1038/s41587-020-0439-x>.
 25. Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. Nat Med. 2020; 26(5):681-7. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0868-6>.
 26. Serrano PJ, Estivill G, Cabezu P, Reyes J, Ciano N, Aguilar M, et al. Impact of SARS-CoV-2 infection on neurodegenerative and neuropsychiatric diseases: a delayed pandemic. Neurologia (Engl Ed). 2020; 35(4):245-51. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2020.04.002>.
 27. Sanz P, Arguedas L, Mostacero S, Cabrera T, Jose J, Domingo S. Involvement of the digestive system in covid-19. A review. Gastroenterol Hepatol 2020; 43(8):464-71. <https://doi.org/10.1016%2Fj.gastrohep.2020.06.004>.
 28. Agudelo AN, Villamil LC. Políticas públicas de zoonosis en Colombia. 1975-2014. Un abordaje desde la ciencia política y la salud pública. Rev. Salud Pública (Bogotá). 2017; 19(6):787-94. <https://doi.org/10.15446/rsap.v19n6.72109>.
 29. Agudelo AN, Villamil LC. Políticas de zoonosis en Colombia: del Código Sanitario a la salud ambiental. Rev. Salud Pública (Bogotá). 2018; 20(1):34-44. <https://doi.org/10.15446/rsap.v20n1.72816>.
 30. McFadden T, Marretta SM. Consequences of Untreated Periodontal Disease in Dogs and Cats. J Vet Dent. 2013; 30(4):266-75. <https://doi.org/10.1177/089875641303000413>.
 31. Harvey C. Management of periodontal disease: understanding the options. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2005; 35(4):819-36. <https://doi.org/10.1016/j.cvs.2005.03.002>.
 32. Temma S, Barbarino A, Maso D, Behillil S, Enouf V, Houn C, et al. Absence of SARS-CoV-2 infection in cats and dogs in close contact with a cluster of COVID-19 patients in a veterinary campus. One health. 2020; 10:1-4. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100164>.
 33. Chaves A, Montecino L. Wildlife rehabilitation centers as a potential source of transmission of SARS-CoV-2 into native wildlife of Latin America. Biotropica. 2021; 53(4):987-93.
 34. Gonçalves A, Maisonnasse P, Donati F, Behillil S, Contreras V, Naninck T, et al. SARS-CoV-2 viral dynamics in non-human primates. Plos Comput Biol. 2021; 17(3):e1008785. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008785>.
 35. Seema S, Vineet D. The search for a COVID-19 animal model. Science. 2020; 368:942-3. <https://doi.org/10.1126/science.abc6141>.
 36. Medina G. Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres. Arch. med. vet. 2010; 42(1):11-24. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2010000100003>.
 37. Tobajas J. Riesgos genéticos y sanitarios asociados al gato asilvestrado (*Felis silvestris catus*): el caso de los felinos salvajes de la península ibérica. Chronica naturae. 2016; 6:63-82.
 38. Cabello C, Cabello F. Zoonosis con reservorios silvestres: Amenazas a la salud pública y a la economía. Rev Méd Chile. 2008; (136):385-93. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872008000300016>.
 39. Monsalve S, Mattar S, González M. Zoonosis transmitidas por animales silvestres y su impacto en las enfermedades emergentes y reemergentes. Rev. MVZ Córdoba. 2009; (2):1762-73.