



INFORME SOBRE LOS ANÁLISIS DE RT-PCR REALIZADOS PARA DETERMINAR LA POSIBLE PRESENCIA DE GENOMA DEL VIRUS SARS-COV-2 EN MUESTRAS DE VISONES AMERICANOS SILVESTRES CAPTURADOS EN LA PROVINCIA DE CASTELLÓN, ESPAÑA.

(09/04/2021)

Antecedentes:

El día 23 de marzo de 2021, la autoridad veterinaria competente para Sanidad Animal de la Comunidad Autónoma Valenciana, recibe información de su homólogo del Servicio de Vida Silvestre, comunicándole la aparición de un resultado de **RT-PCR positivo a SARS-CoV-2 en muestras de ganglios mesentéricos de dos visones silvestres americanos** capturados en las cuencas de los ríos Palancia y Mijares en la provincia de Castellón los días 14 y 28 de enero de 2021. Los animales fueron capturados vivos sin que mostraran ningún tipo de síntoma clínico. Tras su sacrificio, durante la necropsia de los cadáveres no se detectaron lesiones compatibles con la infección por SARS-CoV-2 en los mismos.

Análisis de SARS-CoV-2 realizados por los laboratorios:

Los análisis habían sido realizados en el Laboratorio de la Universidad Cardenal Herrera-CEU (UCHCEU), laboratorio de investigación no acreditado para el diagnóstico de este patógeno.

Se analizaron muestras de ganglios mesentéricos (muestra no considera de elección para el diagnóstico de SARS-CoV-2, de acuerdo con la bibliografía disponible) obtenidas de 13 ejemplares de visones americanos capturados en libertad y eutanasiados por agentes medioambientales autorizados, en diferentes fechas entre el 18 de noviembre de 2020 y el 1 de febrero de 2021, que permanecían congelados desde su captura en el Centro de Recuperación de Fauna de La Granja (El Saler, Valencia). Las necropsias y la obtención de muestras se realizó el 28 de enero y se mantuvieron congeladas a -80°C hasta que se comenzó el análisis el 8 de febrero. Este laboratorio homogeneizó el órgano completo en un volumen de 200 µl de solución inactivante de virus y utilizó la totalidad del homogeneizado preparado para la extracción de ARN total, empleando un kit comercial (NZY Total RNA



Isolation kit, NZYtech, Portugal). A partir del ARN extraído, realizaron secuencialmente dos tipos de análisis dirigidos a la detección de genoma viral de SARS-CoV-2:

- Análisis RT-PCR en tiempo real, empleando Viasure RT-qPCR kit (CerTest Biotec, España), un kit que cuenta con la autorización por vía de urgencia de la FDA para el diagnóstico de SARS-CoV-2, que emplea primers/sonda dirigidos a los genes virales ORF1ab y N, así como al gen Rnasa P que sirve como control interno, **con resultado negativo en las 13 muestras de visones analizadas.**
- Preparación de un ADN complementario con NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (NZYtech, Portugal) que fue posteriormente empleado en una reacción de qPCR empleando el kit NZYSSpeedy qPCR Green Master Mix, con primers dirigidos al gen viral de la glicoproteína S del SARS-CoV-2, diseñados por los científicos de la UCHCEU autores del informe. En este segundo análisis, las muestras de **dos visones resultaron positivas, aunque con valores de Ct muy elevados (30,04 y 35,09)** y confirmaron, tanto por su tamaño en electroforesis en gel de agarosa, como posteriormente por secuenciación del amplicón, que no se trataba de una inespecificidad, puesto que la secuencia coincidía con la de SARS-CoV-2.

Todas las muestras originales de las que se obtuvieron resultados positivos por RT-PCR a SARS-CoV-2 se emplearon en la realización de otros análisis frente a diferentes patógenos de los visones, por lo que no resultó posible reproducir en el UCHCEU estos resultados en nuevos ensayos por la falta de muestra.

El informe completo de los resultados remitido por la UCHCEU se adjunta como anexo 1 a este documento y ha sido objeto de elaboración de una propuesta de publicación por parte del personal del UCHCEU, encontrándose actualmente en proceso de revisión por sus evaluadores ([First Description of Natural SARS-CoV-2 Infection in Two Wild American Minks \(Neovison vison\)\[v1\] | Preprints](#)).

El mismo día 23 de marzo la autoridad competente en Sanidad Animal de la Comunidad Valenciana realizó una toma de muestras por duplicado de hisopos orofaríngeos (muestra indicada para el diagnóstico de SARS-CoV-2) de los cadáveres de los dos visones informados con resultado positivo que permanecían congelados en las instalaciones del Centro de Recuperación de Fauna de La Granja (El Saler, Valencia), para llevar a cabo un análisis de SARS-CoV-2 en la Unidad de Análisis de Sanidad Animal (UASA), laboratorio oficial de Sanidad Animal de la Comunidad Valenciana. En este laboratorio se llevó a cabo el análisis



empleando la técnica recomendada y transferida por el Laboratorio Central de Veterinaria, que actúa a petición del MAPA como Laboratorio de Referencia para SARS-CoV-2 en muestras de animales, que consiste en una RT-PCR en tiempo real dirigida al gen viral E (altamente conservado) (*Corman et al; 2020*) y posteriormente la confirmación en muestras positivas mediante otra RT-PCR dirigida al gen N (*CDC, 2020*). **El resultado del análisis llevado a cabo en UASA fue negativo** en las muestras duplicadas de hisopos orofaríngeos obtenidos de ambos animales. Se adjunta el informe de resultados como anexo 2 a este documento.

Ante la discrepancia de los resultados y puesto que los resultados de ambos laboratorios no habían sido obtenidos en el mismo tipo de muestra, se solicitó muestra a la UCHCEU, por parte de la Autoridad Competente de la Comunidad Valenciana, pero no fue posible obtenerla ya que la habían agotado por completo durante sus análisis.

Por ello se decidió realizar una nueva toma de muestras desde los dos cadáveres que se mantenían congelados, incluyendo en esta ocasión muestras de hisopos orofaríngeos, hisopos rectales, tejido pulmonar y epitelio y cartílago nasal (muestras consideradas de elección para el diagnóstico de SARS-CoV-2), así como de ganglio mesentérico (debido a que es la muestra en la que se obtuvo resultado positivo a SARS-CoV-2 en el UCHCEU). Las muestras se tomaron el día 30 de marzo y se remitieron para su **análisis al LCV**, donde llegaron el día 31 de marzo y fueron analizadas el mismo día, **resultando en todos los casos negativas para la presencia de genoma de SARS-CoV-2**, en reacciones con controles positivos y negativos que garantizan el correcto funcionamiento de la técnica. La técnica de RT-PCR en tiempo real utilizada por el LCV, tanto la dirigida al gen E (*Corman et al; 2020*) como la de confirmación dirigida al gen N (*CDC; 2020*), están validadas y acreditadas conforme a la norma ISO17025 desde 9 de junio de 2020. Cabe resaltar que ambas RT-PCRs incluyen primers/sonda para la detección del gen de la B-actina (control interno endógeno) (*Wernike et al., 2011*), para el cual se han obtenido los valores de Ct esperados, lo que permite garantizar el correcto funcionamiento del procedimiento desde el paso de extracción y descartar la presencia de inhibidores que pudieran afectar a la reacción. Asimismo, señalar que estas RT-PCRs son las empleadas en el Programa Nacional de vigilancia de SARS-CoV-2 en explotaciones de visones, que hasta el momento ha permitido detectar la circulación del virus en 3 explotaciones de visones en España. Se adjunta el informe de resultados como anexo 3 a este documento.



Conclusiones:

- El Laboratorio de la Universidad Cardenal Herrera-CEU (UCHCEU), dentro de un proyecto de investigación, ha obtenido un resultado positivo a SARS-CoV-2 mediante una RT-PCR diseñada por el propio laboratorio en muestras de visones americanos silvestres no consideradas de elección para diagnóstico de este virus (ganglios mesentéricos). Los animales se capturaron en el medio sin que se detectaran en los mismos síntomas o lesiones compatibles con una infección por SARS-CoV-2.
- Estas mismas muestras resultaron previamente negativas a SARS-CoV-2 empleando un kit de PCR comercial.
- Debido a haberse agotado la muestra original, no ha sido posible reproducir estos resultados positivos ni en el UCHCEU ni en los laboratorios de diagnóstico oficial en España (el Laboratorio de Sanidad Animal de la Comunidad Valenciana-UASA y el LCV de Algete, Laboratorio Nacional de Referencia para el diagnóstico del SARS-CoV-2 en animales).
- Nuevas muestras tomadas a partir de los dos animales sospechosos que habían sufrido tres procesos de congelación/descongelación, tanto muestras consideradas de elección para la detección de SARS-CoV-2, como de los mismos tejidos a partir de los cuales se obtuvo resultado positivo en el UCHCEU, y analizadas en dos laboratorios de diagnóstico oficial en España (UASA y LCV), han resultado negativas por RT-PCR a SARS-CoV-2, empleando técnicas acreditadas.

Por todo ello, podemos concluir que **no se ha podido confirmar la presencia del SARS-CoV-2 en ninguna muestra de los visones silvestres analizados en España.**

Referencias:

Corman, V.M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D.K.W., Bleicker, T., Brunink, S., Schneider, J., Schmidt, M.L., Mulders, D.G.J.C., Haagmans, van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.L., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., Goossens, H., Reusken, C., Koopmans, M.P.G. and Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* 2020, 25 (3), 23-30.

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf>.



Wernike, K., Hoffmann, B., Kalthoff, D., König, P., Beer, M., (2011). Development and validation of a triplex real-time PCR assay for the rapid detection and differentiation of wild-type and glycoprotein E-deleted vaccine strains of Bovine herpesvirus type 1. *J. Virol. Methods* 174, 77–84.

ANEXOS:

- Anexo 1: Informe resultados UCHCEU (BOLETÍN DE RESULTADOS DE DIAGNÓSTICO SARS2 EN Neovison vison EN VALENCIA.pdf)
- Anexo 2: Informe resultados UASA (analisPCRvisonescoronavirus (UASA).pdf)
- Anexo 3: Informe resultados LCV (R-000975-21l.pdf)