

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO PRÓ-REITORIA DE PÓS-
GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS – PPGVET

SAMAR AFIF JARRAH

**ESTUDO SOROLÓGICO DE SARS-COV-2 EM CÃES, GATOS E ANIMAIS
SILVESTRES**

CUIABÁ

2024

SAMAR AFIF JARRAH

**ESTUDO SOROLÓGICO DE SARS-COV-2 EM CÃES, GATOS E ANIMAIS
SILVESTRES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Mato Grosso, para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária, na área de Concentração: Sanidade Animal

Orientadora: Prof^a Dr^a Valéria Dutra

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Nakazato

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

J37e Jarrah, Samar Afif.
Estudo sorológico de SARS-Cov-2 em cães, gatos e animais silvestres [recurso eletrônico] / Samar Afif Jarrah. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 92 f., il., pdf). -- 2024.

Orientadora: Valéria Dutra.

Coorientadora: Luciano Nakazato.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2024.

Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.

Inclui bibliografia.

1. Elisa. 2. Soroneutralização. 3. Zoonoses. 4. One-health. I. Dutra, Valéria, *orientador*. II. Nakazato, Luciano, *coorientador*. III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Estudo sorológico de SARS-CoV-2 em pets e silvestres

AUTORA: doutoranda Samar Afif Jarrah

Tese defendida e aprovada em 16 dezembro de 2024.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

1.

Doutora Valéria Dutra (Presidente Banca/Orientadora)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Doutora Rachel de Sousa Lima Pulcherio (Examinadora Externa)

Instituição: Instituto Federal de Mato Grosso - IFMT

Doutora Alessandra Tammy Hayakawa Ito de Sousa (Examinadora Externa)

Instituição: Universidade de Cuiabá - UNIC

Doutora Cristiane Silva Chitarra (Examinadora Interna)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Doutor Kledir Anderson Hofstaetter Spohr (Examinador Interno)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Doutor Richard de Campos Pacheco (Examinador Suplente)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Cuiabá, 16 de dezembro de 2024



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Tammy Hayakawa Ito de Sousa**, **Usuário Externo**, em 12/02/2025, às 12:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rachel de Sousa Lima Pulcherio**, **Usuário Externo**, em 12/02/2025, às 16:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **VALERIA DUTRA, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 13/02/2025, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Silva Chitarra, Usuário Externo**, em 13/02/2025, às 10:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **KLEDIR ANDERSON HOFSTAETTER SPOHR, Diretor(a) Geral do Hospital Veterinário - FAVET/HOVET/UFMT**, em 13/02/2025, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **7619325** e o código CRC **58293A52**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho principalmente ao maior incentivador dos meus estudos, o homem que me ensinava matemática nas horas de descanso, o homem que sempre me incentivou a estudar muito e ser muito competente, ao meu pai Afif Ahmad Jarrah (*in memoriam*), a você meu eterno amor e gratidão por ter me criado e me ensinado o valor da educação e da profissão na vida de uma pessoa – principalmente na vida da mulher nos tempos atuais.

Dedico também aos meus suportes e afagos da vida, à minha mãe Fatme Jarrah, ao meu filho Mohamad Ali, meu esposo Sajjad Shaikh, aos meus irmãos Mustafa, Ahmad e cunhadas Barbara e Bruna.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter tido a oportunidade de alcançar o doutorado.

Agradeço a todos os professores da UFMT que contribuíram para minha formação, em especial meus orientadores Prof. Valéria Dutra, Prof. Luciano Nakazato, e ao professores Richard, Edson Moleta, Jose Ricardo, Rosa Helena, entre outros, que foram tão importantes ao me ensinarem não apenas a medicina veterinária, mas também ensinamentos sobre a vida.

Agradeço ao técnico administrativo Edmilson que sempre esteve pronto para me ajudar a solucionar meus problemas administrativos, sempre com solicitude e gentileza.

Agradeço a todas as minhas amigas que percorreram comigo nessa caminhada até aqui, principalmente Naíma Mahmud, Alessandra Tammy, Sálua Omais, Fernanda Harumi, Maria Fernanda Pimentel, Rachel Pulcherio, Laila Natasha, Letícia Camara, Thalita Priscila Peres, Janaína Rosa, Mayara Vincenzi por sempre terem sido um apoio durante as conturbações da pós-graduação e por terem me ensinado tanto nos laboratórios.

RESUMO

Em dezembro de 2019 iniciava-se um processo epidemiológico que teria consequências catastróficas ao mundo. Um vírus já conhecido pela comunidade científica transpassava barreiras interespecies novamente e se adaptava a um novo hospedeiro: o ser humano. Em janeiro de 2020 a OMS declarou que um novo vírus surgia na China, de acordo com informações, o ponto em comum era mais precisamente um mercado de pescados em Wuhan onde várias espécies de animais eram comercializadas. Logo o novo vírus chamado de SARS-CoV-2 se espalhou pelo mundo devido às movimentações de pessoas. Infecções naturais e experimentais em animais começaram a ser relatadas. Esse estudo procurou entender qual a prevalência das infecções naturais em cães, gatos e animais silvestres numa região em que foram confirmados 115.853 casos em humanos numa população total de 612.574 pessoas e a taxa de mortalidade alcançou 5,8 durante o período de 2020 e 2021. Um total de 762 cães, 182 gatos e 36 animais silvestres foram testados para SARS-CoV-2 pelos testes de Elisa e soroneutralização. Em cães obtivemos 33 positivos no teste de Elisa e três na soroneutralização. Em felinos, 4 foram positivos no Elisa e 3 na soroneutralização. Em silvestres todos foram negativos nos dois testes. Baseado nos dados, concluímos que cães e gatos apresentam baixa soroprevalência em uma cidade altamente afetada pela Covid-19, são necessários mais estudos de soroprevalência em animais silvestres de vida livre para que se possa compreender sua real importância e que apesar do Elisa baseado na proteína de nucleocapsídeo N ser um bom teste de triagem, reações cruzadas com outros coronavírus caninos podem estar presentes por ser uma proteína altamente conservada entre coronavírus. A soroneutralização mostrou-se eficiente para encontrar anticorpos neutralizantes.

Palavras-chaves: Elisa. Soroneutralização. Zoonoses. *One-health*.

ABSTRACT

In December 2019, an epidemiological process started that would have catastrophic consequences for the world. A virus already known to the scientific community crossed interspecies barriers again and adapted to a new host: humans. In January 2020, the WHO declared that a new virus had emerged in China. According to information, the common point was more precisely a fish market in Wuhan where several species of animals were traded. Soon the new virus, called SARS-CoV-2, spread throughout the world due to the movement of people. Natural and experimental infections in animals have started to be reported. Our work sought to understand the prevalence of natural infections in dogs, cats and wild animals in a region with 115.853 human cases were confirmed in a total population of 612.547 and with a mortality rate of 5,8. A total of 762 dogs, 182 cats and 36 wild animals were tested for SARS-CoV-2 using ELISA and serum neutralization tests. In dogs, we obtained 33 positive results in the ELISA test and three in serum neutralization. In felines, 4 were positive in the ELISA and 3 in the serum neutralization. In wild animals, all were negative in both tests. Based on the data, we conclude that dogs and cats have low seroprevalence in a city highly affected by Covid-19. Further seroprevalence studies in wild animals are needed to understand its real importance. Although the ELISA based on the N nucleocapsid protein is a good screening test, cross reactions with other canine coronaviruses may be present because it is a highly conserved protein among coronaviruses. Serum neutralization proved to be efficient in finding neutralizing antibodies.

Key-words: Elisa. Serum neutralization. Zoonoses. One-health.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	CORONAVÍRUS	12
3.1.1	Classificação	12
3.1.2	Genoma e estrutura	12
3.1.3	Replicação viral	13
3.1.3.1	Adsorção viral	13
3.1.3.2	Replicação dentro da célula hospedeira	14
3.2	HISTÓRICO PANDÊMICO E CAPACIDADE DE ADAPTAÇÃO DOS CORONAVÍRUS	16
3.3	O MORCEGO COMO ANIMAL RESERVATÓRIO	17
3.4	SUSCEPTIBILIDADE DAS OUTRAS ESPÉCIES DE ANIMAIS	18
3.4.1	Estudos experimentais	19
3.4.2	Infecções naturais	20
3.5	COVID 19 E VISONS	21
3.6	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	22
3.6.1	Transcrição Reversa da Reação de Cadeira Polimerase RT-qPCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)	22
3.6.2	Soroneutralização convencional (cVNT – conventional Virus Neutralization Test) e Teste de Neutralização por Redução em Placas PRNT (Plaque Reduction Neutralization Test)	22
3.6.3	Teste de soroneutralização substituto - surrogate Virus Neutralization Test (sVNT)	22
3.6.4	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Elisa)	23
3.7	ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS EM CÃES E GATOS	23
3.8	STATUS ATUAL DO VÍRUS	27
3.9	VACINAÇÃO EM ANIMAIS	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	AUTORIZAÇÕES, AMOSTRAGEM E PREPARO DOS MATERIAIS	30
4.2	PREPARO DOS TESTES SOROLÓGICOS	31
4.3	CULTURA CELULAR	32
4.4	ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY (ELISA)	32
4.5	SORONEUTRALIZAÇÃO	32
5	RESULTADOS	34
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO	41
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
	APÊNDICE A - SARS-CoV-2 antibodies in dogs and cats in a highly infected area of Brazil during the pandemic	58
	APÊNDICE B - SARS-CoV-2 serosurvey study in wild animals in Brazil	86

1 INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019 iniciou-se um processo epidemiológico que deu origem a um vírus altamente contagioso e que em poucos dias se espalhou pelo mundo. A presença das pessoas infectadas em um mercado de peixes na cidade de Wuhan na província de Hubei na China era o ponto inicial e comum em todas as infecções. O local chamado de *Wuhan's Huanan Seafood Wholesale Market* (Mercado de pescados em atacado de Huanan – Wuhan) abrigava diversas espécies de animais que eram comercializadas juntas sem qualquer critério sanitário (LU; STRATTON; TANG, 2020).

O agente infeccioso foi descoberto pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças da China (CCPDC) no dia seis de janeiro de 2020 utilizando-se amostras de *swabs* de garganta (CHENG; SHAN, 2020). Descobriu-se que o novo vírus era semelhante geneticamente ao SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) e ao MERS (*Middle East Respiratory Syndrome*) em aproximadamente 80% e 50% respectivamente, ambos causaram surtos de doenças respiratórias similares em 2002 na China (SARS-CoV) e em 2012 na Arábia Saudita (MERS) (LU et al., 2020a). O novo agente isolado das amostras recebeu o nome de SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) e a doença causada por ele foi nomeada de COVID-19 (*Coronavirus Disease – 19*) pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2020).

O SARS-CoV-2 desencadeou uma preocupação mundial devido ao alto risco de disseminação entre as pessoas por ser altamente transmissível e pelo deslocamento das pessoas durante viagens regionais e internacionais, (LI et al., 2020) este cenário se tornou realidade rapidamente, logo descobriu-se o potencial de propagação desse vírus e desde então convivemos com o vírus que já causou 7.057.145 mortes até 21/08/2024 (WHO COVID-19 DASHBOARD, 2024).

Pela origem zoonótica do vírus, conhecer as espécies animais susceptíveis, os possíveis reservatórios e vias de transmissão é essencial para que a saúde humana seja preservada (MCALOOSE et al., 2020a).

O município onde as amostras foram coletadas - Cuiabá – MT - foi severamente afetada durante a pandemia, durante os anos de 2020 e 2021 (período de coleta das amostras) foram confirmados 115,853 casos de Covid-19 em uma população de

612,547 pessoas, apresentando uma taxa de mortalidade para o período de 5,8 (SECRETARIA DE SAÚDE DE MATO GROSSO, 2024), além disso, dois animais de vida livre foram encontrados positivos para SARS-Cov-2 na cidade (PEREIRA et al., 2022a, 2022c).

2 OBJETIVOS

Este estudo pesquisou a prevalência das infecções naturais em cães, gatos da região de Cuiabá e animais silvestres recolhidos por órgãos governamentais dentro da cidade ou regiões próximas em uma cidade com alta ocorrência da doença em humanos, todos atendidos pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CORONAVÍRUS

3.1.1 Classificação

A família *Coronaviridae* é uma das famílias da ordem *Nidovirales* e subordem *Cornidovirineae* que possuem 3 subfamílias: *Letovirinae*, *Orthocoronavirinae* e *Pirovirinae* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2023).

Os membros da subfamília *Orthocoronavirinae* são subdivididos em 4 gêneros: Alfacoronavírus, Betacoronavírus, Gamacoronavírus e Deltacoronavírus.(KUMAR et al., 2020). Os Alfacoronavírus e Betacoronavírus infectam animais e humanos e quatro Coronavírus são conhecidos mundialmente por um terço das gripes comuns em humanos: HCoV-229E, HCoV-NL63 (Alfacoronavírus), HCoV-OC43 e HCoV-HkU1 (Betacoronavírus) (VAN DER HOEK, 2007). Os últimos Coronavírus responsáveis pelas doenças emergentes mais recentes como mencionado anteriormente foram a SARS-Cov e a MERS e agora do SARS-CoV-2 em 2019 também são parte do gênero Betacoronavirus (LIM et al., 2016).

O gênero Gamacoronavírus já foi identificado como agente etiológico de infecções em baleias e aves e o Deltacoronavírus já foi isolado de suínos e aves (BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2017). Análises genéticas nos mostram que os gêneros Alfacoronavírus e Betacoronavírus se originaram em morcegos e roedores, já os Gamacoronavírus e Deltacoronavírus mostram-se originários de aves (GE et al., 2017).

3.1.2 Genoma e estrutura

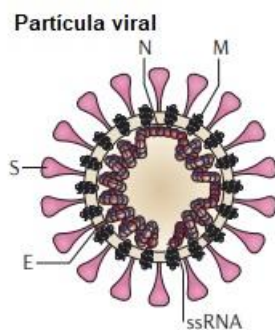
O genoma do SARS-CoV-2 é similar aos genomas do SARS-CoV e MERS-CoV em 80% e 50% aproximadamente (LU et al., 2020b). Compreende 14 *Open Reading Frames* (ORF's), que são regiões de abertura para começar a transcrição e tradução. Dois terços do genoma codificam 16 proteínas não estruturais - *non-structural proteins* - (*nsp* 1-16) que fazem parte do complexo replicase – envolvidas na replicação viral, o restante codifica nove proteínas acessórias e quatro proteínas estruturais que são: S (*Spike*), E (envelope), M (membrana) e N (nucleocapsídeo) (PERLMAN; NETLAND, 2009).

Os *Coronavírus* se apresentam com três proteínas maiores estruturando a arquitetura esférica, a glicoproteína S formando o volume pleomórfico encontrado no envelope do vírus, a glicoproteína M (a mais abundante na partícula viral e uma proteína interna fosforilada no nucleocapsídeo, chamada de N, em menor tamanho temos uma proteína de transmembrana E (MCINTOSH; PEIRIS, 2009)).

Por serem vírus envelopados, são menos estáveis no meio ambiente comparados a vírus não envelopados pela sua sensibilidade a agentes químicos, apesar disto, os Coronavírus são providos com uma bicamada lipídica que confere uma certa estabilidade no meio ambiente e são mais resistentes à degradação proteolítica possivelmente devido às glicoproteínas do envelope serem extremamente glicosiladas (BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2017).

A fita única de sentido positivo que forma o genoma do Coronavírus é a maior conhecida chegando a 30kb de comprimento (BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2017).

Figura 1 - Partícula viral com representação de suas principais glicoproteínas: S, M, E, N envolto de sua fita positiva de RNA.



Adaptado de DE WIT et al. (2016).

3.1.3 Replicação viral

3.1.3.1 Adsorção viral

A proteína *Spike* do Coronavírus é homotrimérica, dividida em duas partes distintas chamadas de subunidades 1 e 2, a superfície exposta da subunidade 1 contém o *Receptor-binding Domain* (RBD) - o domínio de ligação ao receptor, que especificamente interage com a célula do hospedeiro determinando assim o tropismo celular e a patogenicidade (V'KOVSKI et al., 2021).

O SARS-CoV 2 utiliza a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) como receptor celular (WRAPP et al., 2019) e a distribuição e expressão desses receptores nas células do hospedeiro vão determinar os sinais clínicos pois serão nelas os danos celulares (V'KOVSKI et al., 2021). Em humanos a ECA é expressa principalmente por células pulmonares e tecidos extrapulmonares incluindo coração, rins, endotélio vascular e intestinos (CRACKOWER et al., 2002; GU et al., 2005; HAMMING et al., 2004; ZHAO et al., 2020a).

A transmembrana da subunidade S2 media a fusão do vírus com a membrana celular através de rearranjos conformacionais (LETKO; MARZI; MUNSTER, 2020). A proteína S determina a infectividade e transmissibilidade do SARS-CoV-2 sendo o maior antígeno e alvo da vacinação (HASÖKSÜZ; KILIÇ; SARAÇ, 2020; SAMRAT et al., 2020).

3.1.3.2 Replicação dentro da célula hospedeira

Após a fusão a partir da ligação e interação do vírus com o receptor celular o vírus entra na célula por adsorção, perde seu envelope, libera seu RNA e inicia imediatamente o uso do maquinário celular do hospedeiro para a tradução de duas grandes ORF's chamadas de ORF-1a e ORF 1b (MCINTOSH; PEIRIS, 2009).

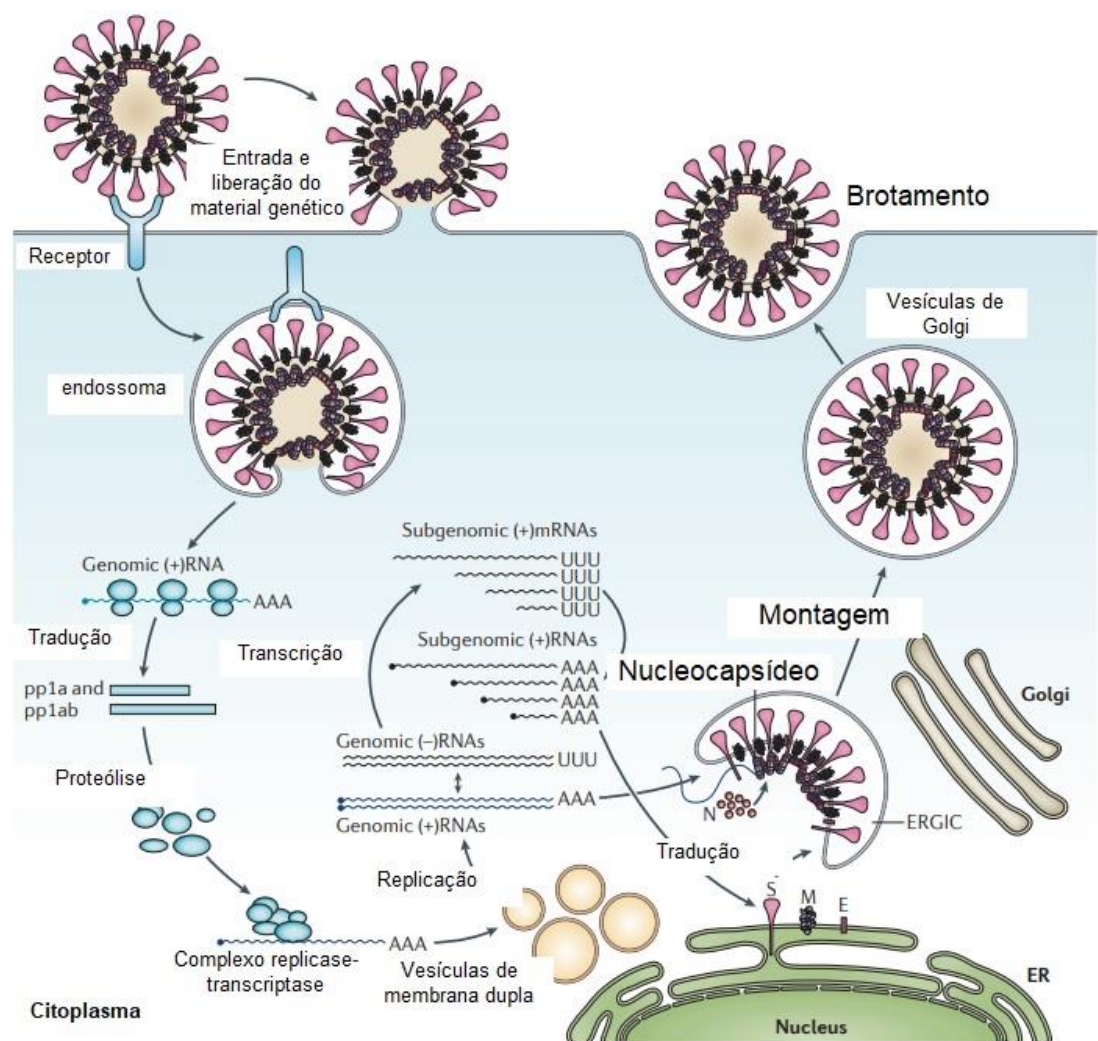
A tradução dessas regiões dá origem a duas poliproteínas chamadas de pp1a e pp1b que dão origem a proteínas não estruturais que formarão a replicação e complexo transcricional posteriormente (V'KOVSKI et al., 2021). Essas proteínas são clivadas por uma protease análoga da papaína e se montam para formar a RNA polimerase que vai transcrever todo o RNA complementar (uma fita negativa) e um conjunto alinhado de RNA's de sentido negativo que servirão como modelo para síntese do RNA mensageiro (mRNA). Todos os mRNA's, exceto os menores que codificam a proteína N, são policistrônicos, ou seja, contém sequências que codificam mais de uma proteína (MCINTOSH; PEIRIS, 2009).

As proteínas estruturais e acessórias são transcritas (N, M e E) e em seguida durante maturação e montagem do vírus essas proteínas são incorporadas ao retículo endoplasmático rugoso onde a proteína S é glicosilada. Essa glicosilação é essencial para o correto enovelamento e transporte da proteína S formando trímeros, antes de ser excretada fora do retículo endoplasmático rugoso, ela interage com as proteínas

M e E para migrar ao local de montagem viral dentro da célula juntamente com a proteína N (MASTERS, 2006).

Os nucleocapsídeos são formados a partir do encapsulamento dos genomas pela proteína N e estes coalescem com componentes ligados à membrana formando vírions num local chamado *Endoplasmic Reticulum-golgi Intermediate Compartment* (ERGIC), a partir disto os novos vírions são acumulados e exportados nas células infectadas por vesículas delicadas ou vesículas de Golgi que provavelmente se fundem com a membrana plasmática e são liberados por brotamento (MASTERS, 2006).

Figura 2 - Demonstração da replicação viral na célula do hospedeiro.



Adaptado de DE WIT et al. (2016).

3.2 HISTÓRICO PANDÊMICO E CAPACIDADE DE ADAPTAÇÃO DOS CORONAVÍRUS

Até o ano de 2019, seis espécies de Coronavírus eram conhecidas por infectar seres humanos, quatro delas são prevalentes e agentes da gripe comum: 229E, OC43, NL63 e HKU1, as outras espécies causam uma Síndrome Respiratória Aguda Severa e tiveram origem em morcegos, os vírus transpassaram barreiras interespecies possivelmente através de um hospedeiro intermediário e chegaram aos humanos (DOMENICO; DE ROSA; BOCCELLINO, 2021).

O vírus da SARS-CoV teve origem em 2002-2003 na China em Guandong, ele era facilmente transmitido entre seres humanos e rapidamente infectou mais de 8000 indivíduos com uma taxa de mortalidade por volta de 10% (PEIRIS; GUAN; YUEN, 2004). O vírus originou-se em morcegos, contudo não foi determinado ainda o hospedeiro intermediário que facilitou ou favoreceu o surgimento do vírus, pesquisas detectaram civetes e guaxinins eram infectados com genomas virais que compartilhavam similaridades, entretanto as informações obtidas não foram suficientes para definir estes animais como hospedeiro intermediário (CHAN; CHAN, 2013). As pessoas acometidas apresentavam tosse e pneumonia que poderiam levar à Síndrome Respiratória Severa Aguda (GRAHAM; DONALDSON; BARIC, 2013). Felizmente este vírus foi controlado através de estratégias eficazes de isolamento, rastreamento dos casos e quarentena (VAN DER HOEK, 2007).

O vírus da MERS teve origem na Arábia Saudita em 2012 e ao contrário do SARS-CoV que teve um espalhamento rápido, ela é geograficamente limitada (GRAHAM; DONALDSON; BARIC, 2013). Estudos sorológicos em dromedários da região suportam a hipótese de que estes animais são hospedeiros reservatórios e podem ter atuado como hospedeiros intermediários para emergência do vírus em seres humanos (DE WIT et al., 2016).

Como mencionado anteriormente, o SARS-CoV-2 originado em Wuhan, também tem como hospedeiro reservatório os morcegos. Grandes similaridades genéticas foram encontradas entre o coronavírus isolado no animal pangolin com o de seres humanos, contudo ainda não se pode afirmar se ele foi um hospedeiro

intermediário ou apenas um hospedeiro acidental que contraiu o vírus durante transporte (ZHAO; CUI; TIAN, 2020).

O genoma dos *Nidovirales* tem uma certa organização e uma fidelização na transcrição do RNA principalmente pela aquisição evolutiva das enzimas RNA 3'-5' exoribonuclease (ExoN) e possivelmente uma endoribonuclease (NendoU) (LAUBER et al., 2013), isto garantiu aos Coronavírus uma expansão de seu genoma e uma maior possibilidade de recombinações genéticas, podendo esse mecanismo contribuir de forma importante na diversidade genética dos coronavírus na natureza (BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2017).

Esta expansão do genoma propiciou ao vírus adquirir e manter genes que codificam diversas proteínas acessórias promovendo a adaptação do vírus a novos hospedeiros e muitas vezes suprimindo sua resposta imune (FORNI et al., 2017).

3.3 O MORCEGO COMO ANIMAL RESERVATÓRIO

Morcegos são mamíferos da Ordem Quiróptera considerados animais reservatórios de diversos *Coronavirus* (DREXLER; CORMAN; DROSTEN, 2014).

Vários vírus que ocasionaram surtos de doenças ao ser humano em que o morcego atuou como animal reservatório, como o surto na Malásia em (1998-1999) e Bangladesh (2001) do Nipah (NiV) vírus, na Austrália em 1994 com o Hendra vírus (HeV) ambos pertencentes à família *Paramyxoviridae* (DREXLER et al., 2012).

Os morcegos têm importante papel na natureza, a característica de voar adquirida evolutivamente faz com que eles tenham funções como polinização na agricultura, dispersão de sementes e controle de pragas (STREICKER; GILBERT, 2020).

Acredita-se que o mecanismo com o qual as células do sistema imune dos morcegos detectam RNA e DNA dos patógenos e a resposta delas a este evento, principalmente a sinalização para a produção das citocinas, seja diferente em morcegos e variem também dentro das espécies de morcegos (BANERJEE et al., 2020). Atualmente sabe-se que o desequilíbrio na liberação de citocinas (*Cytokine Storm*) causado pelo SARS-CoV-2 é perigoso pelos danos causados aos órgãos e células, muitos dos pacientes severamente afetados pela Covid-19 são justamente os que tiveram essa resposta inflamatória exacerbada. Estratégias médicas para

minimizar essa resposta infamatória que o vírus causa ao ser humano é uma das formas de prevenir a piora do quadro dos pacientes (SONG et al., 2020).

Há uma variabilidade muito grande de espécies de morcegos e diferenciações genéticas que determinam a produção dos componentes do sistema imune, além de faltarem estudos para completa compreensão de como o organismo do morcego responde as infecções virais (BANERJEE et al., 2020).

O'Shea e colaboradores (2014), propuseram que a alta temperatura e taxa metabólica dos morcegos que podem manter temperaturas maiores que 40°C (considerado febre na maioria dos mamíferos) durante o voo estimula a funcionalidade do sistema imune que predispõe a adaptação do vírus a estas condições e explica a alta patogenicidade desses vírus quando eles infectam outras espécies de animais por transpassar as barreiras interespecies (O'SHEA et al., 2014).

Estudos empíricos mais antigos demonstraram que os vírus inoculados em morcegos preferem a circulação sanguínea, que migrar para os tecidos quando em alta temperatura ambiente, houve depuração viral sem uma grande resposta de anticorpos sugerindo alguma adaptação destes animais em relação a forma do sistema imune com que se controla a infecção (SULKIN; ALLEN, 1974).

3.4 SUSCEPTIBILIDADE DAS OUTRAS ESPÉCIES DE ANIMAIS

Desde o início da pandemia a questão da susceptibilidade dos animais ao SARS-CoV-2 esteve em evidência pelo fato de ter vírus ter transpassado barreiras interespecies no mercado de peixes onde vários animais eram comercializados (CHENG; SHAN, 2020).

Os primeiros quatro casos de cães e gatos infectados foram relatados em Hong Kong e na Bélgica. Dois cães em Hong Kong, um da raça Lulu da Pomerânia e um Pastor alemão, este último convivia com outro cão sem raça definida que não testou positivo, os outros animais foram um gato na Bélgica e outro em Hong Kong novamente, ao contrário dos outros três animais que apresentaram sinais leves ou não tiveram sintomas, o gato da Bélgica apresentou diarreia, vômito e dificuldades respiratórias (PARRY, 2020).

A partir destes relatos, os médicos veterinários e o mundo voltaram a atenção aos animais que poderiam estar sendo afetados com a mesma doença. Neste

contexto, diversos pesquisadores iniciaram suas pesquisas para entendimento da susceptibilidade dos animais ao vírus.

3.4.1 Estudos experimentais

Abaixo citaremos alguns estudos experimentais realizados nos últimos anos e a susceptibilidade dos animais encontradas pelos autores.

Tabela 1 - Estudos experimentais das susceptibilidades de diferentes espécies ao SARS-CoV-2.

Espécie	Nomes científicos	Susceptibilidade	Referência
Furões	<i>Mustela putorius</i>	Sim	
Gatos	<i>Felis catus</i>	Sim	
Cães	<i>Canis lupus familiaris</i>	Sim -baixa	
Galinhas	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Não	
Patos	Família <i>Anatidae</i>	Não	(SHI et al., 2020a)
Suínos	<i>Sus scrofa domesticus</i>	Não	
Morcegos	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Sim	
Furões	<i>Mustela putorius</i>	Sim	
Suínos	<i>Sus scrofa domesticus</i>	Não	(SCHLOTTAU et al., 2020a)
Galinhas domésticas	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Não	
Cães	<i>Canis lupus familiaris</i>	Sim	(PORTER et al., 2022)
Gatos	<i>Felis catus</i>	Sim	
Macacos Rhesus	<i>Macaca mulatta</i>	Sim	
Babuínos	<i>Papio sp</i>	Sim	(SINGH et al., 2021a)
Sagui	<i>Callithrix sp</i>	Sim	
Macaco-verde-africano	<i>Chlorocebus sabaues</i>	Sim	(WOOLSEY et al., 2021a)
Hamsters sírios	<i>Mesocricetus auratus</i>	Sim	(SIA et al., 2020a)
Musaranho	<i>Tupaia belangeris</i>	Sim	(ZHAO et al., 2020b)
Guaxinim	<i>Procyon lotor</i>	Sim	(FRANCISCO et al., 2022)
Gambás	<i>Mephitis mephitis</i>	Sim	
Veados de cauda branca	<i>Odocoileus virginianus</i>	Sim	(PALMER et al., 2021)
Raposa vermelha	<i>Vulpes vulpes</i>	Sim	(PORTER et al., 2022)
Coiole	<i>Canis latrans</i>	Não	
Camundongo-veado americano	<i>Peromyscus maniculatus</i>	Sim	(GRIFFIN et al., 2021)

Ratazana	<i>Myodes glareolus</i>	Sim	(ULRICH et al., 2021)
----------	-------------------------	-----	-----------------------

Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.2 Infecções naturais

Cães e gatos são susceptíveis à infecção por Covid-19 e isso já foi comprovado em diversos estudos experimentais (BOSCO-LAUTH et al., 2020a; GAUDREULT, 2020; GAUDREULT et al., 2021; SHI et al., 2020a) e estudos sorológicos que rastreiam infecções naturais (BARROSO et al., 2022a; BARUA et al., 2021a; CALVET et al., 2021a; DILEEPAN et al., 2021a; HAMER et al., 2021a; KACZOREK-ŁUKOWSKA et al., 2022b; PATTERSON et al., 2020a; STANOJEVIC et al., 2022; YILMAZ et al., 2021; ZHANG et al., 2020c, 2020d).

Animais silvestres também se mostraram susceptíveis ao vírus e diversos estudos monitorando infecções naturais foram feitos desde o início da pandemia, abaixo listamos algumas espécies susceptíveis e locais onde habitavam.

Tabela 2 - Estudos realizados sobre infecções naturais.

Espécie	Nome científico	Local	Referência
Tigres	<i>Panthera tigris</i>		
Leões	<i>Panthera leo</i>	zoológico	(MCALOOSE et al., 2020b)
Visons	<i>Mustela sp.</i>	fazendas de produção	(MOLENAAR et al., 2020; OUDE MUNNINK et al., 2021)
Furão	<i>Mustela putorius furo</i>	doméstico	(RAČNIK et al., 2021)
Veados de cauda branca	<i>Odocoileus virginianus</i>	vida livre	(HALE et al., 2022) (STOFFELLA-DUTRA et al., 2023)
Quati	<i>Nasua nasua</i>	área urbana	
Carnívoros silvestres	famílias Procyonidae e Viverridae	zoológico	(ALLENDER et al., 2022) (AGUILÓ-GISBERT et al., 2021)
Vison	<i>Neovison vison</i>	vida livre	
Hipopótamo	<i>Hippopotamus amphibius</i>	zoológico	(VERCAMMEN et al., 2023)
Sagui	<i>Mico melanurus</i>	área urbana	(PEREIRA et al., 2022a)
Tamanduá	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	vida livre	(PEREIRA et al., 2022c)
Macaco esquilo	<i>Saimiri sciureus</i>	zoológico	(YAGLOM et al., 2024)
Raposa vermelha	<i>Vulpes vulpes</i>	zoológico	(CHAN et al., 2024)
Macaco aranha	<i>Ateles fusciceps</i>	centro de reabilitação	(CARVAJAL et al., 2024)

Fonte: Elaborado pela autora.

3.5 COVID 19 E VISIONS

Na Holanda, onde visons (*Mustela* sp) são criados para produção de pele, relatou-se a contaminação e infecção de duas fazendas. Em abril de 2020 os animais apresentaram sinais respiratórios leves que se limitavam a coriza, alguns animais mostraram severo estresse respiratório. Os animais que morreram foram necropsiados e testados para alguns vírus e bactérias como *Influenza A*, *adenovírus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e SARS-CoV-2. Nas necrópsias as lesões predominantes na maioria dos animais era uma pneumonia intersticial aguda. Foram detectados RNA do SARS-CoV-2 em *swabs* retais e orais. Pessoas que trabalhavam nos locais tiveram sinais respiratório e uma delas foi hospitalizada e teve a infecção confirmada para Covid-19, os sinais da doença em humanos foram anteriores à presença da doença nos plantéis de visons. A Covid-19 foi responsável pelas mortes e infecções nas duas fazendas comprovando a susceptibilidade dos visons ao vírus. Neste mesmo estudo foram coletadas amostras sorológicas e *swabs* da orofaringe de gatos errantes que viviam nos arredores das fazendas e foi encontrado um felino positivo no RT-qPCR e sete tinham sorologia positiva para SARS-Cov-2, estes animais não adentravam as casas de pessoas, indicando que os gatos se infectaram pelo contato direto ou indireto com visons. Enquanto este estudo era realizado, outros surtos de Covid-19 ocorreram em outras nove fazendas de visons na Holanda (OUDE MUNNINK et al., 2021).

Por análises genéticas, descobriu-se que o vírus foi transmitido aos visons em fazendas de produção, sofreu mutações e infectou novamente seres humanos, o papel do vison na manutenção e se ele pode ser um possível reservatório do vírus precisa ser esclarecido (OUDE MUNNINK et al., 2021).

A preocupação no monitoramento da Covid-19 em fazendas de visons na Europa fez com que a *World Organization for Animal Health* (WOAH) lançasse orientações específicas para prevenir, monitorar, reportar e compartilhar informações inerentes à possíveis infecções de visons nos países com o intuito de se manter uma vigilância constante na criação destes animais pois já foi comprovado cientificamente que visons se infectaram contaminando-se por humanos e o SARS-CoV-2 sofreu mutações nas populações de visons e essa nova cepa voltou para o ser humano (“OIE statement on COVID-19 and mink”, 2020).

3.6 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

3.6.1 Transcrição Reversa da Reação de Cadeira Polimerase RT-qPCR

(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

No compilado de estudos que apresentamos que o RT-qPCR demonstrou ser uma ferramenta que pode ser utilizada no início da infecção do animal. Em seres humanos o teste deve ser feito o mais breve possível a partir do estabelecimento dos sintomas, pois após 10 dias do início dos sintomas o teste pode resultar em um falso negativo se for coletado das vias aéreas e orais superiores (MALLETT et al., 2020).

3.6.2 Soroneutralização convencional (cVNT – *conventional Virus*

Neutralization Test) e Teste de Neutralização por Redução em Placas PRNT (*Plaque Reduction Neutralization Test*)

Atualmente o teste padrão ouro para diagnóstico de doenças virais é a Soroneutralização, mas no caso da infecção pelo SARS-CoV-2 ele exige um laboratório de, no mínimo, nível três de biossegurança, pois há o uso de vírus vivo e células. Tal fator inviabiliza e limita seu uso para pesquisadores e clínicas que tem acesso a esse tipo de instalações (TAN et al., 2020).

3.6.3 Teste de soroneutralização substituto (sVNT - *surrogate Virus*

Neutralization Test)

Uma opção para substituir o teste convencional é o *surrogate Virus Neutralization Test* (sVNT) que consegue detectar Anticorpos Neutralizantes, mas não utiliza vírus vivo ou células e pode ser realizado em um laboratório de nível dois de biossegurança. Usa-se o Domínio de ligação ao Receptor (RBD) purificado da proteína S e o receptor celular ECA 2 designado para mimetizar a interação do vírus com o hospedeiro numa placa de Elisa. Essa interação pode ser neutralizada ou bloqueada por Anticorpos Neutralizantes presentes no soro do animal ou ser humano da mesma maneira que nos testes de Soroneutralização convencionais (TAN et al., 2020).

3.6.4 *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Elisa)*

Como as proteínas N do nucleocapsídeo e a proteína *Spike* – mais precisamente o RBD - são sabidamente os principais alvos da resposta humoral humana na Covid-19 (SHAH et al., 2020), o teste de Elisa utiliza esses antígenos para detectar anticorpos contra essas regiões do vírus. O método foi empregado também nos testes em animais, com exceção de alguns pesquisadores que fabricaram seus próprios antígenos a partir dessas duas proteínas.

3.7 ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS EM CÃES E GATOS

Diversos estudos epidemiológicos foram feitos ao redor do mundo para conhecer a prevalência da doença em animais domésticos (BARUA et al., 2021a; DILEEPAN et al., 2021a; JARRAH et al., 2022; KACZOREK-ŁUKOWSKA et al., 2022b; LAIDOUDI et al., 2021a; YILMAZ et al., 2021) e alguns relacionaram fatores de riscos (CALVET et al., 2021a; HAMER et al., 2021a; PATTERSON et al., 2020a)

Demonstraremos em uma tabela um compilado dos estudos de acordo com os países em que foram feitos, abordando o tipo de teste utilizado, as taxas de prevalência encontradas em cada espécie e se o estudo levou em consideração apenas animais que provinham de casas que tinha algum membro da família positivo para o vírus – trataremos deste último como casas positivas para Covid-19.

A maioria dos estudos utilizou um teste primário de triagem como o Elisa e um de confirmação de soroneutralização, nota-se que o segundo teste era realizado apenas nos animais que reagiam no primeiro (com exceção da pesquisadora Barua, et al, 2021 que também testou animais negativos aleatoriamente), então a prevalência calculada é em relação aos positivos no teste primário.

A tabela 3 resume os estudos citados acima e suas particularidades.

Tabela 3 – Testes usados e resultados em alguns estudos feitos ao redor do mundo.

Região - País	Gatos Prevalência em %				Cães Prevalência em %				Informações Complementares			
	n	Elisa	RT-qPCR	SN	n	Elisa	RT-qPCR	SN	Lares com Covid-19	Variação da titulação de Ac	Testes usados	Referência
Texas - EUA	17 RT-qPCR / 16 SN ¹	-	17,6	43,8	59		1,7	11,9	Sim	1:16 - 1:128 (geral)	RT-qPCR e SN	(HAMER et al., 2021a)
Minnesota - EUA	239	N: 7,9 / RBD: 36,8 ²			510	N: 1% RBD: 0 ³			Não	Gatos: 1:20-1:120 ⁴	proteína N e RBD (ele fabricou)	(DILEEPAN et al., 2021a)
Itália	316		0	5,8 ⁴	603		0	3,3 ⁴	Ambos	cães: 1:20-1:160 / gatos: 1:40-1:1280	RT-qPCR e SN (PRNT)	(PATTERSON et al., 2020a)
Wuhan - China	-				910	1,75	0	1,09	Ambos	1:20-1:180	RBD- Elisa, AWB e SN (PRNT)	(ZHAO et al., 2022)
Wuhan - China	102	14,7		73,3	0				Ambos	1:20-1:1080 ⁵ 1:20-1:80 ⁶	RBD Elisa e SN (VNT)	(ZHANG et al., 2020e)
França	-				453	5,5			Não		N Elisa e AWB	(LAIDOUDI et al., 2021a)
Cuiabá - Brasil	182	2,2		1,64	762	4,3		0,39	Não	cães: 1:20-1:40 gatos: 1:40-1:320	N Elisa e SN (VNT)	Jarrah et al., 2023
Rio de Janeiro - Brasil	10		40	20	29		28	3,44	Sim	s/i	RT-qPCR e SN (PRNT)	(CALVET et al., 2021a)
Portugal	69	21,74			148	4,73			Ambos		RBD- Elisa	(BARROSO et al., 2022a)

48 estados - EUA	956	N: 0,62	1336	N: 0,37	27,27 7	Não	1:32-1:256	N Elisa e SN e sVNT	(BARUA et al., 2021a)
Polônia	243	RBD: 18,9	388	RBD: 16		Não		RBD Elisa e IFI	(KACZOREK- ŁUKOWSKA et al., 2022b)
Turquia	155	S: 26,45 / RBD: 28,38	8,82 ⁸			Não	s/i	S Elisa, RBD Elisa e SN (sVNT)	(YILMAZ et al., 2021)

Elaborado pela autora.

- ¹ - Apenas 16 Soros foram testados, pois uma amostra não tinha soro suficiente.
- ² – Testou-se apenas os soros positivos no Elisa baseado na proteína N (19 amostras).
- ³ – Testou-se 28 cães incluindo os cinco positivos no Elisa baseado na proteína N.
- ⁴ – Considerou-se a prevalência encontrada sem distinção do *status* da família em relação ao COVID-19.
- ⁵ – Titulação das amostras que provinham de lares positivos para Covid-19.
- ⁶ – Titulação das amostras que não provinham de lares positivos
- ⁷ – A autora testou os 11 positivos no Elisa e encontrou três positivos, não detalhando quantos cães e gatos positivos no sVNT, ela testou aleatoriamente 434 amostras e encontrou mais uma positiva, essas quatro positivas também foram positivas no VNT
- ⁸ - o autor testou as amostras que foram positivas em ambos Elisa's

Pelos dados citados percebe-se que ainda não há um padrão de testes utilizados entre os pesquisadores, cada pesquisador usou um tipo de teste de acordo com a disponibilidade e alguns produziram seus próprios testes a partir de recombinação de partículas virais (DILEEPAN et al., 2021a).

A possibilidade de reações cruzadas fora relatada nos estudos de Dileepan et al. (2021), Laidoudi et al. (2021) e Yilmaz et al. (2021), todos eles utilizaram o antígeno N como base para o teste de triagem Elisa (DILEEPAN et al., 2021a; LAIDOUDI et al., 2021a; YILMAZ et al., 2021).

Apenas o estudo de Patterson et al. (2020) no Norte da Itália encontrou uma soroprevalência em cães (12,8%) maior que em gatos (4,5%), demonstrando que cães podem ser susceptíveis como gatos (PATTERSON et al., 2020a).

A prevalência de felinos domésticos positivos é quase sempre maior e suas titulações de anticorpos são mais altas quando comparados com caninos (BARROSO et al., 2022a; BARUA et al., 2021a; DILEEPAN et al., 2021a; HAMER et al., 2021a; KACZOREK-ŁUKOWSKA et al., 2022b), e ambas espécies sempre tiveram maior prevalência quando provenientes de casas positivas para Covid-19 (BARROSO et al., 2022a; CALVET et al., 2021a; HAMER et al., 2021a) que aquelas onde não se sabia o *status* familiar em relação a doença (BARUA et al., 2021a; DILEEPAN et al., 2021a; JARRAH et al., 2022; KACZOREK-ŁUKOWSKA et al., 2022b; LAIDOUDI et al., 2021a; YILMAZ et al., 2021), confirmando que o contato com uma pessoa infectada é o principal fator de risco para que se ocorra a contaminação e infecção dos animais domésticos (BARROSO et al., 2022a; CALVET et al., 2021a; HAMER et al., 2021a).

3.8 STATUS ATUAL DO VÍRUS

Mundialmente, a última atualização da OMS em relação ao vírus foi dia 07/08/2024 e estava em 775.917.102 casos confirmados e 7.058.381 mortes, sendo 903 nos últimos sete dias anteriores (WHO COVID-19 DASHBOARD, 2024).

Em Mato Grosso, o número de casos até então em 2024 é de 41.515 (acesso em 03/09/2024). (SECRETARIA DE SAÚDE DE MATO GROSSO, 2024).

Em cinco de Maio de 2023 a Organização Mundial da Saúde (OMS) retirou o status de emergência em saúde pública de preocupação mundial da Covid-19 em sua 15ª reunião sobre o tema desde o início da pandemia, após três anos e cinco meses

convivendo com a emergência sanitária e 765.222.932 casos incluindo 6.921.614 mortes pela doença (COVID-19 DASHBOARD, 2024). Como o conhecimento total da doença ainda é incerto, a OMS aconselhou a transição para um gerenciamento a longo termo da doença nos países. Enquanto o risco global ainda é alto, há evidências da redução dos riscos para saúde humana principalmente pela imunidade adquirida pelas populações seja pelas infecções ou vacinação, além da virulência das sublinhagens da cepa Omicron que circulam atualmente ser menor e o gerenciamento de casos ter melhorado, de acordo com esses fatores houve redução no número de mortes, hospitalizações e admissões às UTI's relacionadas à Covid-19, apesar do SARS-CoV-2 continuar evoluindo, as variantes atuais não parecem ser tão severas quanto às do início da Pandemia (WHO, 2023).

Atualmente, as variantes do vírus são agrupadas em três grupos chamados Variantes de preocupação – “VOC – *Variants of Concern*”, Variantes de Interesse – VOI – “*Variants of Interest*” e Variantes sob Monitoramento – “*Variants under Monitoring*” – de acordo com o potencial de expansão em relação às variantes anteriores, potencial de causar novas ondas e a necessidade de se realizar ajustamentos nas ações de saúde pública (WHO, 2024)

3.9 VACINAÇÃO EM ANIMAIS

Para combater as ameaças de transmissões de Covid-19 de animais para humanos ou o surgimento de variantes provenientes de mutações em animais, pesquisadores russos do Serviço Federal de Vigilância Veterinária e Fitossanitária desenvolveram a primeira vacina designada apenas para animais carnívoros chamada de Carnivac-Cov ou Karnivak-Kov. Ela usa o vírus inativado por meios químicos, temperatura ou radiação e se mostrou eficaz e segura, sendo capaz de produzir imunidade em todos os animais testados garantindo uma proteção de ao menos 6 meses após a vacinação. (CHAVDA; FEEHAN; APOSTOLOPOULOS, 2021).

Uma parceria entre a Applied DNA Sciences dos Estados Unidos e a EvviVax da Itália também está desenvolvendo uma vacina para felinos domésticos, as empresas já receberam a aprovação do órgão regulatório dos Estados Unidos – Departamento de Agricultura e a análise preliminar mostra que a vacina é bem

tolerada e garante títulos altos de anticorpos em gatos. (APPLIED DNA SCIENCES, 2021).

A empresa Zoetis desenvolveu uma vacina recombinante baseada na expressão celular eucariótica da proteína spike do SARS-CoV-2 inicialmente para visons e foi autorizada para uso experimental em zoológicos, conservatórios nos Estados Unidos e em alguns países para vacinar várias espécies de mamíferos incluindo tigres, leões, primatas, entre outros (ZOETIS INC., 2021). O primeiro zoológico que recebeu as vacinas experimentais foi o Zoologico de Oakland (GREENBERG, 2021) . Esta vacina da Zoetis foi testada em gatos experimentalmente por Morozov e colaboradores (2023) conferindo altos títulos de anticorpos neutralizantes e significativa redução da eliminação viral após exposição ao vírus intranasal (MOROZOV et al., 2023).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AUTORIZAÇÕES, AMOSTRAGEM E PREPARO DOS MATERIAIS

Este projeto foi autorizado pela Comissão de Ética de Uso de Animais (Ceua) na Universidade Federal de Mato Grosso com o número de protocolo: 23108.043344/2020-62) e um termo de consentimento foi obtido dos tutores dos animais que participaram do estudo.

O primeiro estudo utilizou amostras de soros de caninos e felinos atendidos no Hospital Veterinário da UFMT entre novembro de 2020 e julho de 2021. Os animais eram provenientes principalmente de Cuiabá. Não houve restrições na amostragem e não foram considerados histórico médico, vacinação, idade, raça ou a presença ou não de pessoas infectadas com Covid-19 na casa em que vivia o pet. Após os resultados, os tutores dos *pets* positivos na soroneutralização foram contactados por telefone para informações sobre seus próprios estados de saúde no momento em que levaram seus animais para atendimento no hospital veterinário.

Foram coletadas 762 amostras sanguíneas de cães (296 em novembro e dezembro de 2020 e 466 de Janeiro a julho de 2021) e 182 amostras de gatos (68 em novembro e dezembro de 2020 e 114 de janeiro a março de 2021), posteriormente foram feitas as separações dos soros. As amostras sorológicas foram acondicionadas em criotubos conservadas em gelo seco e enviadas para o Departamento de Medicina Veterinária na Universidade de Bari em Valenzano e para o Instituto Zooprofilatico Experimental dell’Abruzzo e del Molise “G. Caporale” em Teramo, ambos na Itália, para detecção de anticorpos contra a SARS-CoV-2.

O segundo estudo testou 36 soros de animais silvestres recolhidos por organizações governamentais para o hospital veterinário da UFMT para atendimento médico durante o período de agosto de 2020 a abril de 2021 e também encaminhadas para os mesmos locais na Itália. A proporção das espécies de animais está demonstrada abaixo numa tabela.

Tabela 4 - Proporção das espécies recolhidas por órgãos governamentais que tiveram os soros testados para o estudo.

Espécie	Nome popular	Quantidade de animais testados
<i>Panthera onca</i>	Onça pintada	8
<i>Alouatta caraya</i>	Sagui	4
<i>Puma concolor</i>	Onça parda	3
<i>Ateles spp.</i>	Macaco-aranha	4
<i>Nasua nasua</i>	Quati	1
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	8
<i>Tapirus terrestris</i>	Anta brasileira	3
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguaritica	2
<i>Sapajus spp.</i>	Macaco-prego	2
<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-mato	1

Elaborado pela autora.

4.2 PREPARO DOS TESTES SOROLÓGICOS

As amostras sorológicas foram analisadas pelo teste de Elisa para detectar anticorpos contra a proteína N do nucleocapsídeo e a soroneutralização foi realizada para acessar a presença de anticorpos neutralizantes contra a SARS-CoV-2. Um controle positivo e um negativo foram cedidos pelo Instituto Nacional de Doenças Infecciosas “Lazzaro Spallanzani” em Roma – Itália e foram incluídos nos ensaios. A cepa viral de linhagem B.1 foi extraída, isolada de um *swab* da nasofaringe de um ser humano (virus name: hCoV-19/Italy/ABRIZSGCTE46419/2020, ID de acesso: EPI_ISL_529023) (DANZETTA et al., 2020b) e identificada por RT-qPCR. Foi realizado um sequenciamento para obtenção do genoma da cepa (LORUSSO et al., 2021b). Este isolado foi usado como referência e os títulos virais do estoque foram determinados por ensaio TCID₅₀ como descrito anteriormente (VALLERIANI et al., 2021b).

O isolamento viral foi feito em células VERO E6 sob condições de biossegurança de nível três. A cepa B.1 foi propagada nas células VERO E6 usando meio suplementado com soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum* – FBS) a 10%. As células foram semeadas em frascos de 175 cm² a 10⁶ células/mL e após 24 horas foram infectadas com cinco mL de uma suspensão viral a 0,01 multiplicidade de infecção (*Multiplicity of infection* – MOI). Os frascos foram incubados a 37°C em atmosfera umidificada de 5% CO₂ e observados diariamente sob microscópio óptico invertido. Quando o efeito citopático (*Cytophatic effect* - CPE) afetou 80-90% da

monocamada celular, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 4°C a 2.000 rpm por 10 min para remover o *pellet* celular. Em seguida, o sobrenadante foi aliqotado e armazenado a -80°C. Antes do uso, o vírus foi titulado em diluições seriais de 1 log (de 1 log a 8 log) em placas de cultura de 96 poços de células Vero E6 para determinar a dose infecciosa de 50% da cultura de tecidos (TCID₅₀). Placas foram incubadas a 37°C e verificadas todos os dias para identificar o CPE através k,.ol,mmde um microscópio óptico invertido. Os títulos finais foram calculados de acordo com o método de Reed e Muench com base em 10 réplicas para titulação (RAMAKRISHNAN, 2016a).

4.3 CULTURA CELULAR

As células epiteliais renais de macacos (*Cercopithecus aethiops*) Vero E6 (C1008) foram cedidas pelo Instituto Nacional de Doenças Infecciosas e mantidas em Meio Mínimo Essencial (MEM), suplementadas com FBS, ambos da Sigma Aldrich, Merck Life Science S.r.l., Milão – Itália, com penicilina, estreptomicina nistatina e gentamicina. As células foram regularmente checadas para contaminação por Micoplasma e sua ausência confirmada através de PCR (*Mycoplasma detection testing*, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA).

4.4 ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY (ELISA)

Um teste de Elisa para detecção de anticorpos contra a proteína N foi usado nas amostras de soro (ERADIKIT COVID19-IgG (cat 26867-02; In3diagnostic, Turin, Itália). Os resultados foram baseados na seguinte fórmula e descritos em porcentagem: $PR (\%) = (OD - (Optic\ Density - Densidade\ ótica)\ da\ amostra - OD\ do\ controle\ negativo) / (OD\ do\ controle\ positivo - OD\ do\ controle\ negativo)$. Valores maiores ou iguais a 40% foram consideradas positivos para presença de anticorpos.

4.5 SORONEUTRALIZAÇÃO

Como descrito anteriormente, ensaios de SN (VALLERIANI et al., 2021b) foram aplicados para acessar a presença de anticorpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 nas amostras sorológicas de cães e gatos. Antes da testagem, os soros foram inativados por calor a 56°C por 30 minutos. Uma diluição dupla seriada de 1:10 a

1:1280 das amostras testadas e dos controles positivos e negativos foram preparadas em placas de 96 poços usando o Meio Mínimo Essencial - MME suplementado com 2% de FBS. Os controles negativos e positivos incluídos nesta análise foram de origem humana, canina e felina, uma para cada espécie (coletadas antes da pandemia). As amostras sorológicas dos controles negativos e positivos de cães e gatos testaram negativo para *Alphacoronavirus* neste ensaio de neutralização. Subsequentemente um volume igual de 100 TCID₅₀/mL de vírus isolado foi adicionado às amostras diluídas e as placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C em 5% de CO₂. Após a incubação, a solução contendo os soros e vírus foram transferidas para placas de 96 poços contendo células Vero E6 semeadas no dia anterior. Essas placas foram incubadas por 72 horas a 37°C em 5% de CO₂ e observadas usando um microscópio invertido para detecção de qualquer CPE. Os títulos da neutralização foram definidos como a maior diluição sem qualquer CPE nos poços e um limite positivo foi determinado em 1:10.

5 RESULTADOS

O teste de Elisa foi positivo em 4,3% dos cães (33 de 762) e em 2,2% dos gatos (quatro de 182 gatos), enquanto o teste de soroneutralização foi positivo em 0,39% em cães (3/762) e 1,64% em gatos (3/182 gatos).

Os títulos de anticorpos em cães variaram entre 1:20 a 1:40 e em gatos de 1:40 a 1:320. Todos os animais que obtiveram resultados positivos na soroneutralização tinham seus tutores com COVID-19 confirmados ou sintomas da doença alguns meses antes da data da coleta de sangue em seus animais, conforme tabela a seguir que reúne os dados coletados sobre os animais positivos.

Tabela 4 - Informações dos animais positivos na soroneutralização do estudo.

Tabela 4 - Informações dos animais positivos na soroneutralização do estudo.

Espécie	Sexo	Raça	Idade	Data da coleta	Histórico	Elisa	SN	Acesso a rua	COVID-19 status
Canino	F	Basset	3 A	25 Maio 2021	Epilepsia idiopática	24.00%	1:20	Não	Sim, Janeiro 2021
Canino	F	Shih tzu	11 M	28 Jan 2021	Espirros, secreção nasal	33.81%	1:10	Sim	Sim, Novembro 2021
Canino	M	Shih tzu	7 A	20 Maio 2021	Insuficiência Renal aguda	40.0%	1:40	Não	Sim, Abril 2021
Felino	M	SRD	8 M	16 Dez 2020	êmese, intensa desidratação, disquesia, disúria, anorexia, perda de peso	41,60%	1:320	Sim	Teve sintomas mas não confirmou a COVID-19
Felino	F	Siamese	4 A	Fev 2021	Infecção urinária	55,19%	1:80	Não	Sim, meados de 2020
Felino	F	SRD	1 A	11 Abril 2021	Fratura	45.00%	1:40	Sim	Sim, data não definida

Elaborado pela autora.

No segundo estudo de animais silvestres todos os animais foram negativos em ambos os testes.

6 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que anticorpos contra SARS-CoV-2 estavam circulantes em amostras de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFMT. Vários estudos ao redor do mundo também têm demonstrado uma soroprevalência baixa em seus respectivos locais de realização (BARUA et al., 2021a; CALVET et al., 2021a; CHIBA et al., 2021a; DILEEPAN et al., 2021a; FRITZ et al., 2021a; HAMER et al., 2021a; JARRAH et al., 2022; KACZOREK-ŁUKOWSKA et al., 2022b; LAIDOUDI et al., 2021a; PATTERSON et al., 2020a; YILMAZ et al., 2021).

A maioria dos estudos usou teste de Elisa como triagem em estudos sorológicos (BARUA et al., 2021a; DILEEPAN et al., 2021a; LAIDOUDI et al., 2021a; STEVANOVIC et al., 2021a) e a diferença encontrada neste presente estudo entre os testes de Elisa e SN em cães pode ser atribuída a reações cruzadas entre outros coronavírus caninos endêmicos (BARUA et al., 2021a; LAIDOUDI et al., 2021a). Três dos 33 caninos com sorologia positiva no Elisa tinham anticorpos neutralizantes contra a SARS-CoV-2. A proteína N do SARS-CoV-2 tem sido associada com reações cruzadas com outros coronavírus de animais como o vírus da PIF e o coronavírus canino (CCoV), ela compartilha epítomos antigênicos em comum por ser uma proteína viral conservada (BARUA et al., 2021a). Estudos anteriores mostraram que a infecção pelo SARS-CoV-2 não provocou uma resposta muito eficiente de anticorpos contra a proteína N e que em geral para testes sorológicos em *pets* a melhor opção seria Elisa baseado na proteína S, porém mais estudos são necessários para determinação do valor *cutt-off* neste método (DIEZMA-DÍAZ et al., 2023a). A diferença entre os dois testes pode ser explicada também por uma infecção mais leve em cães comparados com gatos (BOSCO-LAUTH et al., 2020a; STEVANOVIC et al., 2021a). Este estudo foi limitado ao ensaio de Elisa baseado na proteína N, estudos futuros devem considerar incluir pelo menos uma proteína maior de superfície como a *Spike* ou o RBD como sugerido por Diezma-Diaz e colaboradores (2023) em seu estudo mais recente em que conclui que há reações cruzadas entre Coronavirus de animais quando se usa testes de Elisa baseados na proteína N (DIEZMA-DÍAZ et al., 2023a).

Títulos de anticorpos em humanos altos estão relacionados à gravidade da doença (ZHANG et al., 2020b). Em contraste com o observado em cães, os soros felinos tiveram maior concordância entre os resultados de Elisa e SN, três dos quatro

positivos no Elisa também foram positivos na SN. Estes resultados corroboram com outros estudos em que há maiores taxas de soropositividade e títulos de anticorpos maiores em gatos que em cães (BARROSO et al., 2022a; BOSCO-LAUTH et al., 2020a; FRITZ et al., 2021a).

Uma alta soropositividade foi reportada em um estudo na Polônia utilizando-se amostras coletadas de três clínicas veterinárias, os resultados foram 73/388 (18,8%) gatos positivos e 39/243 (16%) cães. Esta alta positividade provavelmente foi encontrada pelas coletas serem provenientes de cães e gatos cujos tutores tinham mais cuidados veterinários e devido a alta taxa de infecção na população humana durante a quarta onda de Covid-19 na Polônia (KACZOREK-ŁUKOWSKA et al., 2022b). Neste presente estudo as amostras foram coletadas durante um longo período e provavelmente abordando diferentes variantes de SARS-CoV-2 e situações epidemiológicas que podem ter influenciado a soropositividade dos tutores e seus animais.

O gráfico abaixo mostra a situação epidemiológica durante os anos de 2020 e 2021, podemos perceber que no período de coleta das amostras de cães (novembro -2020 a julho 2021) e gatos (novembro – 2020 a março – 2021) foi um período que precedeu a segunda onda de casos em humanos com alguns picos de casos em janeiro de 2021. No período de coleta dos animais silvestres (agosto – 2020 a abril 2021) também está no período que precede a segunda onda que se inicia por volta de março segundo o gráfico.

Gráfico 2 – Distribuição de casos em humanos no período de abril/2020 a outubro/2021



SECRETARIA DE SAÚDE DE MATO GROSSO, 2024

Cães e gatos dividindo a mesma casa que tutores infectados foram encontrados em maior risco de contrair a infecção em estudos prévios (FRITZ et al., 2021a). Todos os animais que apresentaram anticorpos neutralizantes neste estudo estavam em casas potencialmente positivas para Covid-19, isto confirma que os tutores positivos são um fator de risco para infecção em seus animais.

O primeiro estudo mostrou que cães e gatos em áreas de alta transmissão em humanos de Covid-19 apresentam baixas taxas de soroprevalência. Considerando que cães e gatos positivos estavam convivendo com tutores infectados, pessoas doentes devem tomar as mesmas precauções em relação aos seus animais de estimação em relação ao isolamento. O estudo presente foi o primeiro estudo sorológico de larga-escala de SARS-CoV-2 em animais domésticos no centro-oeste do Brasil e foi conduzido em uma área com a segunda maior taxa de mortalidade pela doença no país.

Apesar dos resultados negativos no segundo estudo que envolve animais silvestres, há evidências de infecções naturais detectadas (PEREIRA et al., 2022a, 2022c) e em parques zoológicos (FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2021; MCALOOSE et al., 2020b). A revisão bibliográfica demonstrada nesta tese mostrou as susceptibilidades de vários animais silvestres, alguns autores levantaram a hipótese

de alguns animais servirem como reservatórios do vírus na natureza (FREULING et al., 2020; PALMER et al., 2021; ZHAO et al., 2020c).

Até a presente data, poucos estudos foram conduzidos abordando animais silvestres de vida livre e os existentes abordaram uma única espécie de animal ou um certo grupo da mesma ordem. Nos EUA a soroprevalência de veados de cauda branca foi de 40% em um estudo realizado em 2021 destacando a necessidade de vigilância constante dos animais nos ambientes silvestres (CHANDLER et al., 2023). Um estudo de larga escala na Europa testou 1,237 roedores e pequenos mamíferos e encontrou todos os animais negativos para anticorpos contra SARS-CoV-2 (BOURRET et al., 2022). Na Espanha um estudo que procurou anticorpos contra o SARS-CoV-2 em animais de cativeiro e de vida livre obteve oito positivos de 137 animais testados no Elisa, usou-se anticorpos contra o receptor de domínio de ligação e/ou contra o nucleocapsídeo viral, mas no RT-qPCR nenhum animal foi positivo (FERNÁNDEZ-BASTIT et al., 2024). Na Suíça, uma investigação encontrou uma soroprevalência de 3,1%, 2,2% e 4,2% em raposas vermelhas suíças, lincos e gatos selvagens europeus, respectivamente, neste estudo não foi possível encontrar evidências de que estas espécies poderiam estar atuando como reservatório na vida selvagem do local (KUHN et al., 2024).

Ambos os estudos na Espanha e na Suíça que encontraram alguns animais positivos foram conduzidos em um período maior (2020-2023) que o presente estudo, isto pode ter aumentado as chances de os animais silvestres terem entrado em contato com o vírus. Os animais do presente estudo podem não ter tido contato com seres humanos ou ambientes contaminados, pois as amostras foram coletadas em um período de declínio nos casos em seres humanos e início da segunda onda na cidade (SECRETARIA DE SAÚDE DE MATO GROSSO, 2023). Apesar de serem as possíveis razões para os resultados negativos, mais estudos em animais silvestres de vida livre são necessários para compreender a real ameaça da manutenção deste vírus na natureza e quais animais podem servir de reservatório. Este foi o primeiro estudo sorológico em animais silvestres de vida livre abordando diversas espécies realizado no Brasil.

7 CONCLUSÃO

Ainda que numa soroprevalência baixa, animais são susceptíveis à infecção por SARS-CoV-2, seus tutores devem se afastar dos animais enquanto estiverem doentes para evitar o contágio de seus cães e gatos pela doença.

Para estudos epidemiológicos de soroprevalência em animais, recomenda-se sempre utilizar um teste padrão ouro como a soroneutralização.

No presente estudo não foi encontrado nenhum animal silvestre de vida livre com anticorpos contra o SARS-Cov-2, não descartando a possibilidade de servirem como reservatórios do vírus na natureza levantada por pesquisadores, mas incentivando a realização de outros estudos epidemiológicos acerca destes animais em ambientes de vida livre.

Uma abordagem baseada em “*One-health*” que monitora várias áreas de controle ambiental e de várias espécies de animais precisa ser planejada e realizada para se conhecer melhor o risco de adaptação e reemergência do vírus da natureza para os seres humanos no futuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOPIAN, Rafael G. et al. First reported cases of SARS-CoV-2 infection in pets in São Paulo, Brazil. **Veterinary World**, [S. l.], p. 2593–2596, 2022. DOI: 10.14202/VETWORLD.2022.2593-2596.

AGUILÓ-GISBERT, Jordi; PADILLA-BLANCO, Miguel; LIZANA, Victor; MAIQUES, Elisa; MUÑOZ-BAQUERO, Marta; CHILLIDA-MARTÍNEZ, Eva; CARDELLS, Jesús; RUBIO-GUERRI, Consuelo. First description of sars-cov-2 infection in two feral American mink (*Neovison vison*) caught in the wild. **Animals**, [S. l.], v. 11, n. 5, 2021. DOI: 10.3390/ani11051422.

ALLENDER, Matthew C. et al. Multi-species outbreak of SARS-CoV-2 Delta variant in a zoological institution, with the detection in two new families of carnivores. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S. l.], v. 69, n. 5, p. e3060–e3075, 2022. DOI: 10.1111/tbed.14662.

ANKA, Abubakar Umar; TAHIR, Mohammed Ibrahim; ABUBAKAR, Sharafudeen Dahiru; ALSABBAGH, Mohamed; ZIAN, Zeineb; HAMEDIFAR, Haleh; SABZEVARI, Araz; AZIZI, Gholamreza. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. **Scandinavian journal of immunology**, [S. l.], v. 93, n. 4, p. e12998–e12998, 2021. DOI: 10.1111/sji.12998.

APPLIED DNA SCIENCES. **Applied DNA and Evvivax Announce Positive Preliminary Results of Phase I Clinical Trial for LinearDNA™ COVID-19 Vaccine Candidate in Felines**. 2021.

BANERJEE, Arinjay; BAKER, Michelle L.; KULCSAR, Kirsten; MISRA, Vikram; PLOWRIGHT, Raina; MOSSMAN, Karen. **Novel Insights Into Immune Systems of Bats**. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00026.

BARROSO, Ricardo; VIEIRA-PIRES, Alexandre; ANTUNES, Agostinho; FIDALGO-CARVALHO, Isabel. Susceptibility of Pets to SARS-CoV-2 Infection: Lessons from a Seroepidemiologic Survey of Cats and Dogs in Portugal. **Microorganisms**, [S. l.], v. 10, n. 2, 2022. a. DOI: 10.3390/microorganisms10020345.

BARROSO, Ricardo; VIEIRA-PIRES, Alexandre; ANTUNES, Agostinho; FIDALGO-CARVALHO, Isabel. Susceptibility of Pets to SARS-CoV-2 Infection: Lessons from a Seroepidemiologic Survey of Cats and Dogs in Portugal. **Microorganisms**, [S. l.], v. 10, n. 2, 2022. b. DOI: 10.3390/microorganisms10020345.

BARUA, Subarna; HOQUE, Monirul; ADEKANMBI, Folasade; KELLY, Patrick; JENKINS-MOORE, Melinda; TORCHETTI, Mia Kim; CHENOWETH, Kelly; WOOD, Theresa; WANG, Chengming. Antibodies to SARS-CoV-2 in dogs and cats, USA.

Emerging Microbes and Infections, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1669–1674, 2021. a. DOI: 10.1080/22221751.2021.1967101.

BARUA, Subarna; HOQUE, Monirul; ADEKANMBI, Folasade; KELLY, Patrick; JENKINS-MOORE, Melinda; TORCHETTI, Mia Kim; CHENOWETH, Kelly; WOOD, Theresa; WANG, Chengming. Antibodies to SARS-CoV-2 in dogs and cats, USA. **Emerging microbes & infections**, United States, v. 10, n. 1, p. 1669–1674, 2021. b. DOI: 10.1080/22221751.2021.1967101.

BESSIÈRE, Pierre; VERGNE, Timothée; BATTINI, Matéo; BRUN, Jessie; AVERSO, Julien; JOLY, Etienne; GUÉRIN, Jean-Luc; CADIERGUES, Marie-Christine. SARS-CoV-2 Infection in Companion Animals: Prospective Serological Survey and Risk Factor Analysis in France. **Viruses**, Switzerland, v. 14, n. 6, 2022. DOI: 10.3390/v14061178.

BOSCO-LAUTH, Angela M. et al. 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 of the United States of America**, [S. l.], v. 117, n. 42, p. 26382–26388, 2020. a. DOI: 10.1073/pnas.2013102117.

BOSCO-LAUTH, Angela M. et al. 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**, [S. l.], v. 117, n. 42, p. 26382 LP – 26388, 2020. b. DOI: 10.1073/pnas.2013102117.

BOURRET, Vincent et al. Serologic Surveillance for SARS-CoV-2 Infection among Wild Rodents, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 28, n. 12, 2022. DOI: 10.3201/eid2812.221235.

BURRELL, Christopher J.; HOWARD, Colin R.; MURPHY, Frederick A. Coronaviruses. *Em: Fenner and White's Medical Virology*. [s.l.] : Elsevier, 2017. p. 437–446. DOI: 10.1016/B978-0-12-375156-0.00031-X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012375156000031X>.

CALVET, Guilherme Amaral et al. Investigation of SARS-CoV-2 infection in dogs and cats of humans diagnosed with COVID-19 in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 16, n. 4 April 2021, p. 1–21, 2021. a. DOI: 10.1371/journal.pone.0250853.

CALVET, Guilherme Amaral et al. Investigation of SARS-CoV-2 infection in dogs and cats of humans diagnosed with COVID-19 in Rio de Janeiro, Brazil. **PloS one**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. e0250853, 2021. b. DOI: 10.1371/journal.pone.0250853.

CARVAJAL, Mateo et al. SARS-CoV-2 infection in brown-headed spider monkeys (*Ateles fusciceps*) at a wildlife rescue center on the coast of Ecuador—South America. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 12, n. 4, 2024. DOI: 10.1128/spectrum.02741-23.

CHAN, Paul K. S.; CHAN, Martin C. W. **Tracing the SARS-coronavirus**. **Journal of Thoracic Disease** Pioneer Bioscience Publishing, , 2013. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.06.19.

CHAN, Tatjana et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA in a Zoo-Kept Red Fox (*Vulpes vulpes*). **Viruses**, [S. l.], v. 16, n. 4, 2024. DOI: 10.3390/v16040521.

CHANDLER, Jeffrey C. et al. SARS-CoV-2 exposure in wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). [S. l.], 2023. DOI: 10.1073/pnas.2114828118/-/DCSupplemental. Disponível em: <https://promedmail.org/promed-post/?id=20201213.8015608>.

CHAVDA, Vivek P.; FEEHAN, Jack; APOSTOLOPOULOS, Vasso. A Veterinary Vaccine for SARS-CoV-2: The First COVID-19 Vaccine for Animals. **Vaccines**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 631, 2021. DOI: 10.3390/vaccines9060631.

CHENG, Zhangkai J.; SHAN, Jing. 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know. **Infection**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 155–163, 2020. DOI: 10.1007/s15010-020-01401-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01401-y>.

CHIBA, Shiho; HALFMANN, Peter J.; HATTA, Masato; MAEMURA, Tadashi; FAN, Shufang; ARMBRUST, Tammy; SWARTLEY, Olivia M.; CRAWFORD, Latasha K.; KAWAOKA, Yoshihiro. Protective Immunity and Persistent Lung Sequelae in Domestic Cats after SARS-CoV-2 Infection. [S. l.], v. 27, n. 2, p. 660–663, 2021. a.

CHIBA, Shiho; HALFMANN, Peter J.; HATTA, Masato; MAEMURA, Tadashi; FAN, Shufang; ARMBRUST, Tammy; SWARTLEY, Olivia M.; CRAWFORD, LaTasha K.; KAWAOKA, Yoshihiro. Protective Immunity and Persistent Lung Sequelae in Domestic Cats after SARS-CoV-2 Infection. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 27, n. 2, 2021. b. DOI: 10.3201/eid2702.203884.

Coronavírus Brasil. [s.d.]. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 29 nov. 2022.

COVID-19 - Painel COVID-19 - Estado de Mato Grosso. [s.d.]. Disponível em: <http://www.saude.mt.gov.br/painelcovidmt/>. Acesso em: 29 nov. 2022.

COVID-19 dashboard. 2024. Disponível em: <https://covid19.who.int/?mapFilter=deaths>. Acesso em: 5 maio. 2023.

CRACKOWER, Michael A. et al. **Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: www.nature.com/nature.

DANZETTA, Maria Luisa et al. SARS-CoV-2 RNA Persistence in Naso-Pharyngeal Swabs. **Microorganisms**, Switzerland, v. 8, n. 8, 2020. a. DOI: 10.3390/microorganisms8081124.

DANZETTA, Maria Luisa et al. SARS-CoV-2 RNA Persistence in Naso-Pharyngeal Swabs. **Microorganisms**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 1124, 2020. b. DOI: 10.3390/microorganisms8081124.

DE MORAIS, Helio Autran; DOS SANTOS, Andrea Pires; DO NASCIMENTO, Naila Cannes; KMETIUK, Louise Bach; BARBOSA, David Soeiro; BRANDÃO, Paulo Eduardo; GUIMARÃES, Ana Marcia Sá; PETTAN-BREWER, Christina; BIONDO, Alexander Welker. **Natural Infection by SARS-CoV-2 in Companion Animals: A Review of Case Reports and Current Evidence of Their Role in the Epidemiology of COVID-19**. **Frontiers in Veterinary Science**, 2020.

DE SOUZA BARBOSA, Altina Bruna et al. Infection of SARS-CoV-2 in domestic dogs associated with owner viral load. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 153, p. 61–65, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.10.006>.

DE WIT, Emmie; VAN DOREMALEN, Neeltje; FALZARANO, Darryl; MUNSTER, Vincent J. **SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses.** **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, , 2016. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.81.

DECARO, Nicola et al. Long-term persistence of neutralizing SARS-CoV-2 antibodies in pets. **Transboundary and emerging diseases**, Germany, v. 69, n. 5, p. 3073–3076, 2022. DOI: 10.1111/tbed.14308.

DIEZMA-DÍAZ, Carlos et al. A comparative study of eight serological methods shows that spike protein-based ELISAs are the most accurate tests for serodiagnosing SARS-CoV-2 infections in cats and dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, [S. l.], v. 10, 2023. a. DOI: 10.3389/fvets.2023.1121935.

DIEZMA-DÍAZ, Carlos et al. A comparative study of eight serological methods shows that spike protein-based ELISAs are the most accurate tests for serodiagnosing SARS-CoV-2 infections in cats and dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, [S. l.], v. 10, p. 42, 2023. b. DOI: 10.3389/FVETS.2023.1121935.

DILEEPAN, Mythili; DI, Da; HUANG, Qinfeng; AHMED, Shamim; HEINRICH, Daniel; LY, Hinh; LIANG, Yuying. Seroprevalence of SARS-CoV-2 (COVID-19) exposure in pet cats and dogs in Minnesota, USA. **Virulence**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1597–1609, 2021. a. DOI: 10.1080/21505594.2021.1936433.

DILEEPAN, Mythili; DI, Da; HUANG, Qinfeng; AHMED, Shamim; HEINRICH, Daniel; LY, Hinh; LIANG, Yuying. Seroprevalence of SARS-CoV-2 (COVID-19) exposure in pet cats and dogs in Minnesota, USA. **Virulence**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1597–1609, 2021. b. DOI: 10.1080/21505594.2021.1936433.

DOMENICO, Marina Di; DE ROSA, Alfredo; BOCCELLINO, Mariarosaria. diagnostics Detection of SARS-COV-2 Proteins Using an ELISA Test. [S. l.], 2021. DOI: 10.3390/diagnostics. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/diagnostics>.

DREXLER, Jan Felix et al. Bats host major mammalian paramyxoviruses. **Nature Communications**, [S. l.], v. 3, 2012. DOI: 10.1038/ncomms1796.

DREXLER, Jan Felix; CORMAN, Victor Max; DROSTEN, Christian. **Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. Antiviral Research**, 2014. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.10.013.

DUTRA, Valéria et al. Persistent SARS-CoV-2 antigen presence in multiple organs of a naturally infected cat from Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 28, 2022. DOI: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2021-0074.

EPIFANIO, Ivyson da Silva et al. First report of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection in two asymptomatic cats in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Veterinary world**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 2839–2842, 2021. DOI: 10.14202/vetworld.2021.2839-2842.

FERNÁNDEZ-BELLON, Hugo et al. Monitoring natural SARS-CoV-2 infection in lions (*Panthera leo*) at the Barcelona zoo: Viral dynamics and host responses. **Viruses**, [S. l.], v. 13, n. 9, 2021. DOI: 10.3390/v13091683.

FORNI, Diego; CAGLIANI, Rachele; CLERICI, Mario; SIRONI, Manuela. **Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. Trends in Microbiology** Elsevier Ltd, , 2017. DOI: 10.1016/j.tim.2016.09.001.

FRANCISCO, Raquel; HERNANDEZ, Sonia M.; MEAD, Daniel G.; ADCOCK, Kayla G.; BURKE, Sydney C.; NEMETH, Nicole M.; YABSLEY, Michael J. Experimental Susceptibility of North American Raccoons (*Procyon lotor*) and Striped Skunks (*Mephitis mephitis*) to SARS-CoV-2. **Frontiers in Veterinary Science**, [S. l.], v. 8, 2022. DOI: 10.3389/fvets.2021.715307.

FREULING, Conrad M. et al. Susceptibility of Raccoon Dogs for Experimental SARS-CoV-2 Infection. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 26, n. 12, p. 2982–2985, 2020. DOI: 10.3201/eid2612.203733.

FRITZ, Matthieu et al. High prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in pets from COVID-19+ households. **One Health**, [S. l.], v. 11, n. November, p. 0–4, 2021. a. DOI: 10.1016/j.onehlt.2020.100192.

FRITZ, Matthieu et al. High prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in pets from COVID-19+ households. **One health (Amsterdam, Netherlands)**, [S. l.], v. 11, p. 100192, 2021. b. DOI: 10.1016/j.onehlt.2020.100192.

GAUDREAULT, Natasha. SARS-CoV-2 infection, disease and transmission in domestic cats. [S. l.], p. 1–37, 2020.

GAUDREAULT, Natasha N. et al. SARS-CoV-2 infection, disease and transmission in domestic cats. **Emerging microbes & infections**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 2322–2332, 2020. DOI: 10.1080/22221751.2020.1833687.

GAUDREAULT, Natasha N. et al. Experimental re-infected cats do not transmit SARS-CoV-2. **Emerging Microbes and Infections**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 638–650, 2021. DOI: 10.1080/22221751.2021.1902753.

GE, Xing Yi; YANG, Wei Hong; ZHOU, Ji Hua; LI, Bei; ZHANG, Wei; SHI, Zheng Li; ZHANG, Yun Zhi. Detection of alpha- and betacoronaviruses in rodents from Yunnan, China. **Virology Journal**, [S. l.], v. 14, n. 1, 2017. DOI: 10.1186/s12985-017-0766-9.

GRAHAM, Rachel L.; DONALDSON, Eric F.; BARIC, Ralph S. **A decade after SARS: Strategies for controlling emerging coronaviruses**. **Nature Reviews Microbiology**, 2013. DOI: 10.1038/nrmicro3143.

GREENBERG, Alissa. **Oakland Zoo vaccinates its animals against Covid-19**. 2021.

GRIFFIN, Bryan D. et al. SARS-CoV-2 infection and transmission in the North American deer mouse. **Nature Communications**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 3612, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-23848-9.

GRUELL, Henning; VANSHYLLA, Kanika; WEBER, Timm; BARNES, Christopher O.; KREER, Christoph; KLEIN, Florian. Antibody-mediated neutralization of SARS-CoV-2. **Immunity**, United States, v. 55, n. 6, p. 925–944, 2022. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.05.005.

GU, Jiang et al. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 202, n. 3, p. 415–424, 2005. DOI: 10.1084/jem.20050828.

HALE, Vanessa L. et al. SARS-CoV-2 infection in free-ranging white-tailed deer. **Nature**, [S. l.], v. 602, n. 7897, p. 481–486, 2022. DOI: 10.1038/s41586-021-04353-x.

HAMER, Sarah A. et al. SARS-CoV-2 infections and viral isolations among serially tested cats and dogs in households with infected owners in Texas, USA. **Viruses**, [S. l.], v. 13, n. 5, 2021. a. DOI: 10.3390/v13050938.

HAMER, Sarah A. et al. SARS-CoV-2 Infections and Viral Isolations among Serially Tested Cats and Dogs in Households with Infected Owners in Texas, USA. **Viruses**, [S. l.], v. 13, n. 5, 2021. b. DOI: 10.3390/V13050938.

HAMMING, I.; TIMENS, W.; BULTHUIS, M. L. C.; LELY, A. T.; NAVIS, G. J.; VAN GOOR, H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **Journal of Pathology**, [S. l.], v. 203, n. 2, p. 631–637, 2004. DOI: 10.1002/path.1570.

HASÖKSÜZ, Mustafa; KILIÇ, Selcuk; SARAÇ, Fahriye. **Coronaviruses and sars-cov-2. Turkish Journal of Medical Sciences** Türkiye Klinikleri, , 2020. DOI: 10.3906/sag-2004-127.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Current ICTV Taxonomy Release**. 2023. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy>. Acesso em: 9 jul. 2023.

JARRAH, Samar Afif et al. Persistent SARS-CoV-2 antigen presence in multiple organs of a naturally infected cat from Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 28, n. August 2021, p. 1–6, 2022. DOI: 10.1590/1678-9199-jvatitd-2021-0074.

KACZOREK-ŁUKOWSKA, Edyta; WERNIKE, Kerstin; BEER, Martin; WRÓBEL, Małgorzata; MAŁACZEWSKA, Joanna; MIKULSKA-SKUPIEŃ, Elżbieta; MALEWSKA, Karolina; MIELCZARSKA, Izabela; SIWICKI, Andrzej Krzysztof. High Seroprevalence against SARS-CoV-2 among Dogs and Cats, Poland, 2021/2022. **Animals : an open access journal from MDPI**, Switzerland, v. 12, n. 16, 2022. a. DOI: 10.3390/ani12162016.

KACZOREK-ŁUKOWSKA, Edyta; WERNIKE, Kerstin; BEER, Martin; WRÓBEL, Małgorzata; MAŁACZEWSKA, Joanna; MIKULSKA-SKUPIEŃ, Elżbieta; MALEWSKA, Karolina; MIELCZARSKA, Izabela; SIWICKI, Andrzej Krzysztof. High Seroprevalence against SARS-CoV-2 among Dogs and Cats, Poland, 2021/2022. **Animals**, [S. l.], v. 12, n. 16, 2022. b. DOI: 10.3390/ani12162016.

KUMAR, Swatantra; NYODU, Rajni; MAURYA, Vimal K.; SAXENA, Shailendra K. Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Em*: [s.l: s.n.]. p. 23–31. DOI: 10.1007/978-981-15-4814-7_3.

LAI DOUDI, Younes et al. SARS-CoV-2 antibodies seroprevalence in dogs from France using ELISA and an automated western blotting assay. **One Health**, [S. l.], v. 13, n. March, p. 19–21, 2021. a. DOI: 10.1016/j.onehlt.2021.100293.

LAI DOUDI, Younes et al. SARS-CoV-2 antibodies seroprevalence in dogs from France using ELISA and an automated western blotting assay. **One health (Amsterdam, Netherlands)**, Netherlands, v. 13, p. 100293, 2021. b. DOI: 10.1016/j.onehlt.2021.100293.

LAM, Tommy Tsan Yuk et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. **Nature 2020 583:7815**, [S. l.], v. 583, n. 7815, p. 282–285, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2169-0.

LAUBER, Chris; GOEMAN, Jelle J.; DE PARQUET, Marial Carmen; THI NGA, Phan; SNIJDER, Eric J.; MORITA, Kouichi; GORBALENYA, Alexander E. The Footprint of Genome Architecture in the Largest Genome Expansion in RNA Viruses. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 9, n. 7, 2013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003500.

LETKO, Michael; MARZI, Andrea; MUNSTER, Vincent. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. **Nature Microbiology**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 562–569, 2020. DOI: 10.1038/s41564-020-0688-y.

LI, Qun et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2001316. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2001316>.

LIM, Yvonne; NG, Yan; TAM, James; LIU, Ding. Human Coronaviruses: A Review of Virus–Host Interactions. **Diseases**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 26, 2016. DOI: 10.3390/diseases4030026.

LORUSSO, Alessio; CALISTRI, Paolo; SAVINI, Giovanni; MORELLI, Daniela; AMBROSIJ, Lucio; MIGLIORATI, Giacomo; D’ALTERIO, Nicola. **Novel SARS-CoV-2 Variants in Italy: The Role of Veterinary Public Health Institutes. Viruses** Switzerland, 2021. a. DOI: 10.3390/v13040549.

LORUSSO, Alessio; CALISTRI, Paolo; SAVINI, Giovanni; MORELLI, Daniela; AMBROSIJ, Lucio; MIGLIORATI, Giacomo; D’ALTERIO, Nicola. Novel SARS-CoV-2 Variants in Italy: The Role of Veterinary Public Health Institutes. **Viruses**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 549, 2021. b. DOI: 10.3390/v13040549.

LU, Hongzhou; STRATTON, Charles W.; TANG, Yi Wei. **Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. Journal of Medical Virology** John Wiley and Sons Inc., , 2020. DOI: 10.1002/jmv.25678.

LU, Roujian et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, [S. l.], v. 395, n. 10224, p. 565–574, 2020. a. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.

LU, Roujian et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, [S. l.], v. 395, n. 10224, p. 565–574, 2020. b. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.

MALLETT, Sue et al. At what times during infection is SARS-CoV-2 detectable and no longer detectable using RT-PCR-based tests? A systematic review of individual participant data. **BMC Medicine**, [S. l.], v. 18, n. 1, 2020. DOI: 10.1186/s12916-020-01810-8.

MASTERS, Paul S. **The Molecular Biology of Coronaviruses. Advances in Virus Research**, 2006. DOI: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3.

MCALOOSE, Denise et al. From people to panthera: Natural sars-cov-2 infection in tigers and lions at the bronx zoo. **mBio**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 1–13, 2020. a. DOI: 10.1128/mBio.02220-20.

MCALOOSE, Denise et al. From people to panthera: Natural sars-cov-2 infection in tigers and lions at the bronx zoo. **mBio**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 1–13, 2020. b. DOI: 10.1128/mBio.02220-20.

MCINTOSH, Kenneth; PEIRIS, J. S. M. Coronaviruses. *Em: Clinical Virology*. [s.l.] : Wiley, 2009. p. 1155–1171. DOI: 10.1128/9781555815981.ch51.

MOLENAAR, Robert Jan et al. Clinical and Pathological Findings in SARS-CoV-2 Disease Outbreaks in Farmed Mink (*Neovison vison*). **Veterinary Pathology**, [S. l.], v. 57, n. 5, p. 653–657, 2020. DOI: 10.1177/0300985820943535.

MOROZOV, Igor et al. Preliminary Study on the Efficacy of a Recombinant, Subunit SARS-CoV-2 Animal Vaccine against Virulent SARS-CoV-2 Challenge in Cats. **Vaccines**, [S. l.], v. 11, n. 12, 2023. DOI: 10.3390/vaccines11121831.

MUNSTER, Vincent J. et al. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. **Nature**, [S. l.], v. 585, n. 7824, p. 268–272, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2324-7.

OIE statement on COVID-19 and mink. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.woah.org/en/oie-statement-on-covid-19-and-mink/>. Acesso em: 5 maio. 2023.

O'SHEA, Thomas J.; CRYAN, Paul M.; CUNNINGHAM, Andrew A.; FOOKS, Anthony R.; HAYMAN, David T. S.; LUIS, Angela D.; PEEL, Alison J.; PLOWRIGHT, Raina K.; WOOD, James L. N. Bat Flight and Zoonotic Viruses. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 741–745, 2014. DOI: 10.3201/eid2005.130539.

OUDE MUNNINK, Bas B. et al. **Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.science.org>.

PALMER, Mitchell V. et al. Susceptibility of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) to SARS-CoV-2. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 95, n. 11, 2021. DOI: 10.1128/jvi.00083-21.

PARRY, Nicola M. A. Forensic Science International : Reports COVID-19 and pets : When pandemic meets panic. **Forensic Science International: Reports**, [S. l.], n. April, p. 100090, 2020. DOI: 10.1016/j.fsir.2020.100090. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsir.2020.100090>.

PATTERSON, E. I. et al. Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–5, 2020. a. DOI: 10.1038/s41467-020-20097-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-20097-0>.

PATTERSON, E. I. et al. Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 6231, 2020. b. DOI: 10.1038/s41467-020-20097-0.

PEIRIS, J. S. M.; GUAN, Y.; YUEN, K. Y. **Severe acute respiratory syndrome**. **Nature Medicine**, 2004. DOI: 10.1038/nm1143.

PEREIRA, Asheley H. B. et al. ScienceDirect Natural SARS-CoV-2 Infection in a Free-Ranging Black-Tailed Marmoset (*Mico melanurus*) from an Urban Area in Mid-West Brazil. [S. l.], v. 194, p. 22–27, 2022. a. DOI: 10.1016/j.jcpa.2022.03.005.

PEREIRA, Asheley Hb et al. Natural SARS-CoV-2 Infection in a Free-Ranging Black-Tailed Marmoset (*Mico melanurus*) from an Urban Area in Mid-West Brazil. **Journal of comparative pathology**, England, v. 194, p. 22–27, 2022. b. DOI: 10.1016/j.jcpa.2022.03.005.

PEREIRA, Asheley Henrique Barbosa et al. A Novel Host of an Emerging Disease: SARS-CoV-2 Infection in a Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) Kept Under Clinical Care in Brazil. **EcoHealth**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 458–462, 2022. c. DOI: 10.1007/s10393-022-01623-6.

PERLMAN, Stanley; NETLAND, Jason. **Coronaviruses post-SARS: Update on replication and pathogenesis.** *Nature Reviews Microbiology*, 2009. DOI: 10.1038/nrmicro2147.

PORTER, Stephanie M.; HARTWIG, Airn E.; BIELEFELDT-OHMANN, Helle; BOSCO-LAUTH, Angela M.; ROOT, J. Jeffrey. Susceptibility of Wild Canids to SARS-CoV-2. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 28, n. 9, p. 1852–1855, 2022. DOI: 10.3201/eid2809.220223.

RAČNIK, Jožko et al. Transmission of SARS-CoV-2 from human to domestic ferret. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 27, n. 9, p. 2450–2453, 2021. DOI: 10.3201/eid2709.210774.

RAMAKRISHNAN, Muthannan Andavar. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. **World Journal of Virology**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 85, 2016. a. DOI: 10.5501/wjv.v5.i2.85.

RAMAKRISHNAN, Muthannan Andavar. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. [S. l.], 2016. b. DOI: 10.5501/wjv.v5.i2.85.

ROCKX, Barry et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. **Science (New York, N.Y.)**, United States, v. 368, n. 6494, p. 1012–1015, 2020. DOI: 10.1126/science.abb7314.

SAIED, AbdulRahman A.; METWALLY, Asmaa A. SARS-CoV-2 variants of concerns in animals: An unmonitored rising health threat. **Virusdisease**, India, v. 33, n. 4, p. 466–476, 2022. DOI: 10.1007/s13337-022-00794-8.

SAIED, AbdulRahman A.; METWALLY, Asmaa A.; MOHAMED, Hams M. A.; HARIDY, Mohie A. M. The contribution of bovines to human health against viral infections. **Environmental science and pollution research international**, Germany, v. 28, n. 34, p. 46999–47023, 2021. DOI: 10.1007/s11356-021-14941-z.

SAMRAT, Subodh Kumar; THARAPPEL, Anil M.; LI, Zhong; LI, Hongmin. **Prospect of SARS-CoV-2 spike protein: Potential role in vaccine and therapeutic development.** *Virus Research* Elsevier B.V., , 2020. DOI: 10.1016/j.virusres.2020.198141.

SCHLOTTAU, Kore et al. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. **The Lancet Microbe**, [S. l.], v. 1, n. 5, p. e218–e225, 2020. a. DOI: 10.1016/S2666-5247(20)30089-6.

SCHLOTTAU, Kore et al. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. **The Lancet. Microbe**, England, v. 1, n. 5, p. e218–e225, 2020. b. DOI: 10.1016/S2666-5247(20)30089-6.

SECRETARIA DE SAÚDE DE MATO GROSSO. COVID-19 Painel. [S. l.], 2024. Disponível em: <http://www.saude.mt.gov.br/painelcovidmt2/>.

SHAH, Vibhuti Kumar; FIRMAL, Priyanka; ALAM, Aftab; GANGULY, Dipyaman; CHATTOPADHYAY, Samit. **Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past.** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01949.

SHI, Jianzhong et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. **Science**, [S. l.], v. 368, n. 6494, p. 1016–1020, 2020. a. DOI: 10.1126/science.abb7015.

SHI, Jianzhong et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. **Science**, [S. l.], p. eabb7015, 2020. b. DOI: 10.1126/science.abb7015.

SIA, Sin Fun et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. **Nature**, [S. l.], v. 583, n. 7818, p. 834–838, 2020. a. DOI: 10.1038/s41586-020-2342-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2342-5>.

SIA, Sin Fun; YAH, Li-Meng; CHIN, Alex WH; FUND, Kevin; POON, Leon LM; NICHOLLS, John M.; PEIRIS, Malik; YEN, Hui-Ling. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 virus in golden syrian hamsters. **PREPRINT (Version 1) available at Research Square**, [S. l.], 2020. b. DOI: 10.21203/rs.3.rs-20774/v1.

SINGH, Dhiraj Kumar et al. in the lungs of rhesus macaques , baboons and marmosets. **Nature Microbiology**, [S. l.], v. 6, n. January, 2021. a. DOI: 10.1038/s41564-020-00841-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-020-00841-4>.

SINGH, Dhiraj Kumar et al. Responses to acute infection with SARS-CoV-2 in the lungs of rhesus macaques, baboons and marmosets. **Nature Microbiology**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 73–86, 2021. b. DOI: 10.1038/s41564-020-00841-4.

SONG, Peipei; LI, Wei; XIE, Jianqin; HOU, Yanlong; YOU, Chongge. **Cytokine storm induced by SARS-CoV-2.** *Clinica Chimica Acta* Elsevier B.V., , 2020. DOI: 10.1016/j.cca.2020.06.017.

STANOJEVIC, Slavoljub; RADOJICIC, Sonja; MISIC, Dusan; SREJIĆ, Damjan; VASILJEVIC, Dragan V.; PROKIC, Kristina; ILIĆ, Nevenka. Seroprevalence of SARS-CoV-2 in Dogs and Cats: Results of a Retrospective Serological Survey of Infection in Dogs and Cats in Šumadija District, Serbia. **SSRN Electronic Journal**, [S. l.], 2022. DOI: 10.2139/ssrn.4060891.

STEVANOVIC, Vladimir et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 infection among pet animals in Croatia and potential public health impact. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S. l.], v. 68, n. 4, p. 1767–1773, 2021. a. DOI: 10.1111/tbed.13924.

STEVANOVIC, Vladimir et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 infection among pet animals in Croatia and potential public health impact. **Transboundary and emerging diseases**, Germany, v. 68, n. 4, p. 1767–1773, 2021. b. DOI: 10.1111/tbed.13924.

STOFFELLA-DUTRA, Ana Gabriella et al. SARS-CoV-2 Spillback to Wild Coatis in Sylvatic–Urban Hotspot, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 664–667, 2023. DOI: 10.3201/eid2903.221339.

STREICKER, Daniel G.; GILBERT, Amy T. **Contextualizing bats as viral reservoirs.** **Science**American Association for the Advancement of Science, , 2020. DOI: 10.1126/science.abd4559.

SULKIN, S. E.; ALLEN, R. **Virus Infections in Bats.** [s.l.] : S.Karger AG, 1974. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-04030-2>. Acesso em: 15 maio. 2023.

TAN, Chee Wah et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 38, n. 9, p. 1073–1078, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0631-z.

ULRICH, Lorenz; MICHELITSCH, Anna; HALWE, Nico; WERNIKE, Kerstin; HOFFMANN, Donata; BEER, Martin. Experimental SARS-CoV-2 Infection of Bank Voles. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 1193–1195, 2021. DOI: 10.3201/eid2704.204945.

VALLERIANI, Fabrizia et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Variants by Serum from BNT162b2 Vaccine Recipients. **Viruses**, Switzerland, v. 13, n. 10, 2021. a. DOI: 10.3390/v13102011.

VALLERIANI, Fabrizia et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Variants by Serum from BNT162b2 Vaccine Recipients. **Viruses**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 2011, 2021. b. DOI: 10.3390/v13102011.

VAN DEN BRAND, J. M. A.; L.HAAGMANS, B.; LEIJTEN, L.; VAN RIEL, D.; E.MARTINA, B. E.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; KUIKEN, T. Pathology of experimental SARS coronavirus infection in cats and ferrets. **Veterinary Pathology**, [S. l.], v. 45, n. 4, p. 551–562, 2008. DOI: 10.1354/vp.45-4-551.

VAN DER HOEK, Lia. **SARS-CoV, human coronavirus NL63 (HCoV-NL63) and HCoV-HKU1 were first described Human coronaviruses: what do they cause?** [s.l: s.n.].

VERCAMMEN, Francis et al. SARS-CoV-2 Infection in Captive Hippos (*Hippopotamus amphibius*), Belgium. **Animals**, [S. l.], v. 13, n. 2, 2023. DOI: 10.3390/ani13020316.

V'KOVSKI, Philip; KRATZEL, Annika; STEINER, Silvio; STALDER, Hanspeter; THIEL, Volker. **Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2.** **Nature Reviews Microbiology** Nature Research, , 2021. DOI: 10.1038/s41579-020-00468-6.

WHO. **WHO.** 2020. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>. Acesso em: 28 maio. 2023.

WHO. **Determines that COVID-19 is now an established and ongoing health issue which no longer constitutes a public health emergency of international concern (PHEIC).** 2023. Disponível em: [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic). Acesso em: 4 maio. 2023.

WHO. **WHO COVID-19 dashboard.** 2024.

WHO **Covid-19 Dashboard.** 2024. Disponível em: <https://covid19.who.int/?mapFilter=deaths>. Acesso em: 28 maio. 2023.

WOOLSEY, Courtney et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19 and protection against re-infection. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 86–98, 2021. a. DOI: 10.1038/s41590-020-00835-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-020-00835-8>.

WOOLSEY, Courtney et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19 and protection against re-infection. **Nature immunology**, United States, v. 22, n. 1, p. 86–98, 2021. b. DOI: 10.1038/s41590-020-00835-8.

WRAPP, Daniel; WANG, Nianshuang; CORBETT, Kizzmekia S.; GOLDSMITH, Jory A.; HSIEH, Ching-Lin; ABIONA, Olubukola; GRAHAM, Barney S.; MCLELLAN, Jason S. **Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.science.org>.

YAGLOM, Hayley D. et al. DETECTION OF SARS-COV-2 IN A SQUIRREL MONKEY (SAIMIRI SCIUREUS): A ONE HEALTH INVESTIGATION AND RESPONSE. **Journal**

of **Zoo and Wildlife Medicine**, [S. l.], v. 55, n. 2, p. 471–478, 2024. DOI: 10.1638/2023-0052.

YILMAZ, Aysun et al. Presence of Antibodies to SARS-CoV-2 in Domestic Cats in Istanbul, Turkey, Before and After COVID-19 Pandemic. **Frontiers in Veterinary Science**, [S. l.], v. 8, 2021. DOI: 10.3389/fvets.2021.707368.

ZHANG, Bicheng et al. Immune Phenotyping Based on the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and IgG Level Predicts Disease Severity and Outcome for Patients With COVID-19. **Frontiers in molecular biosciences**, Switzerland, v. 7, p. 157, 2020. a. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00157.

ZHANG, Bicheng et al. Immune Phenotyping Based on the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and IgG Level Predicts Disease Severity and Outcome for Patients With COVID-19. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [S. l.], v. 7, 2020. b. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00157.

ZHANG, Qiang et al. SARS-CoV-2 neutralizing serum antibodies in cats: a serological investigation. **bioRxiv**, [S. l.], p. 2020.04.01.021196, 2020. c. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.01.021196v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.01.021196v1.abstract>.

ZHANG, Qiang et al. SARS-CoV-2 neutralizing serum antibodies in cats: a serological investigation. **bioRxiv**, [S. l.], p. 2020.04.01.021196, 2020. d. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.01.021196v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.01.021196v1.abstract>.

ZHANG, Qiang et al. A serological survey of SARS-CoV-2 in cat in Wuhan. **Emerging Microbes and Infections**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 2013–2019, 2020. e. DOI: 10.1080/22221751.2020.1817796.

ZHAO, Jie; CUI, Wei; TIAN, Bao Ping. **The Potential Intermediate Hosts for SARS-CoV-2**. **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., , 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.580137.

ZHAO, Ya et al. A serological survey of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in dogs in Wuhan. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S. l.], v. 69, n. 2, p. 591–597, 2022. DOI: 10.1111/tbed.14024.

ZHAO, Yu; ZHAO, Zixian; WANG, Yujia; ZHOU, Yueqing; MA, Yu; ZUO, Wei. zhaosingle cell rna expression profiling of ace 2 the receptor of sars cov 2. **BioRxiv**, [S. l.], 2020. a.

ZHAO, Yuan et al. Susceptibility of tree shrew to SARS-CoV-2 infection. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2020. b. DOI: 10.1038/s41598-020-72563-w.

ZHAO, Yuan et al. Susceptibility of tree shrew to SARS-CoV-2 infection. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2020. c. DOI: 10.1038/s41598-020-72563-w.

ZHOU, Peng et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, [S. l.], v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.

ZOETIS INC. **Zoetis Donates COVID-19 Vaccines to Help Support the Health of Zoo Animals**. 2021.

APÊNDICE A - SARS-CoV-2 antibodies in dogs and cats in a highly infected area of Brazil during the pandemic

SARS-CoV-2 antibodies in dogs and cats in a highly infected area of Brazil during the pandemic

Samar Afif Jarrah¹, Louise Bach Kmetiuk², Fabrizia Valleriani³, Barbara Bonfini³, Alessio Lorusso³, Violetta Vasinioti⁴, Nicola Decaro⁴, Marco Tulio dos Santos¹, Kledir Anderson Hofstaetter Spohr¹, Annamaria Pratelli⁴, Anna Serroni³, Sara Capista³, Valéria Regia Franco Sousa¹, Alexander Welker Biondo², Luciano Nakazato¹, Valéria Dutra¹

¹Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, MT, 78060-900, Brazil.

²Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, 80035-050, Brazil.

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise “G. Caporale”, Teramo, TE, 64100, Italy.

⁴Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Valenzano, BA, 70010, Italy.

*** Correspondence:**

Valéria Dutra

valeriadutra.dutra@gmail.com

Keywords: Brazil, companion animals, pets, SARS-CoV-2, serosurvey.

Abstract

SARS-CoV-2 was a worldwide threat during the COVID-19 pandemic, and the state of Mato Grosso had the second highest mortality rate in Brazil, with 427.4 deaths/100,000 inhabitants. However, no large-scale study among dogs and cats in such highly infected areas of Brazil has so far been conducted. Accordingly, the present study reports on a serosurvey among dogs and cats in Cuiabá, capital of Mato Grosso from November 2020 to July 2021, where the human mortality rate was 605/100,000 at that time. Overall, 33/762 dogs (4.3%) and 4/182 cats (2.2%) were found to be seropositive for SARS-CoV-2 through ELISA, and 3/762 dogs (0.4%) and 3/182 cats (1.6%) were seropositive through the serum neutralization test. Cats presented higher seroprevalence with higher titers of neutralizing antibodies. Although N-protein based ELISA may be a good screening test, cross-reactivity with other canine coronaviruses may impair its diagnostic use among dogs.

Introduction

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was identified in Wuhan, China, at the end of 2019, as the cause of the coronavirus disease 2019 (COVID-19), which led to a pandemic scenario in early 2020 (ZHOU et al., 2020). Pneumonia and acute respiratory distress syndrome were the main clinical human signs of COVID-19 (ANKA et al., 2021).

As the pandemic spread, reports of dogs and cats that were naturally infected by SARS-CoV-2 soon emerged worldwide. These animals were generally asymptomatic and their cases were associated with infected owners (DE MORAIS et al., 2020). Investigations on animal susceptibility to SARS-CoV-2 showed that cats intranasally inoculated with high doses of SARS-CoV-2 were able to infect other cats by means of airborne aerosols. Infected cats presented neutralizing antibodies and lesions in their respiratory tract but no clinical signs. They were more susceptible to SARS-CoV-2 infection than dogs (SHI et al., 2020b). These findings have highlighted the reverse zoonotic potential of the disease cycle between owners and their pets, considering that outdoor access may have exposed dogs and cats to a contaminated environment. Several reports on experimental and natural infection with SARS-CoV-2 among animals have been published, with confirmation of these animals' susceptibility, regarding dogs (BOSCO-LAUTH et al., 2020b; DE SOUZA BARBOSA et al., 2022; SHI et al., 2020b), cats (AGOPIAN et al., 2022; CHIBA et al., 2021b; DE SOUZA BARBOSA et al., 2022; DUTRA et al., 2022; EPIFANIO et al., 2021; GAUDREAUULT et al., 2020; SHI et al., 2020b; VAN DEN BRAND et al., 2008), ferrets (BOSCO-LAUTH et al., 2020b; SHI et al., 2020b; VAN DEN BRAND et al., 2008), hamsters (SIA et al., 2020b), non-human primates (MUNSTER et al., 2020; ROCKX et al., 2020; SINGH et al., 2021b; WOOLSEY et al., 2021b) and bats (SCHLOTTAU et al., 2020b).

Cuiaba, the capital of the state of Mato Grosso, in central Brazil, has been severely affected by the COVID-19 pandemic. There were 48,152 confirmed cases in 2020, 67,548 in 2021 and 132,667 up to May 2022, out of a total population of 612,547 inhabitants. This

state presented the second highest nationwide COVID-19 mortality rate, with 427.4 deaths/100,000 inhabitants. In the state capital, the rate was 605 deaths/100,000 inhabitants (CORONAVÍRUS BRASIL, [s.d.]; COVID-19 - PAINEL COVID-19 - ESTADO DE MATO GROSSO, [s.d.]). The first report from Brazil of a pet infected with SARS-CoV-2 also came from Cuiabá (DUTRA et al., 2022). Furthermore, also in Mato Grosso, a free-ranging black-tailed marmoset (*Mico melanurus*) that had been hit by a car was also found to be infected with this virus (PEREIRA et al., 2022b). These reports thus showed the impact of this highly contaminated environment on natural infection among domestic and wild animal species.

The first large-scale study on companion animals anywhere in the world was conducted in Italy and showed that 15/451 dogs (3.3%) and 11/191 cats (5.8%) presented SARS-CoV-2 neutralizing antibodies, but that there were no RT-PCR positive samples (PATTERSON et al., 2020b). Another study conducted in Texas, USA, showed that 3/17 cats (17.6%) and 1/59 dogs (1.7%) were positive for SARS-CoV-2 through RT-PCR and that 7/16 cats (43.8%) and 7/59 dogs (11.9%) presented neutralizing antibodies (HAMER et al., 2021b). Recently, 9/29 cats (31.0%) and 4/10 dogs (40.0%) in Rio de Janeiro were found to be positive through RT-PCR or serum neutralization (CALVET et al., 2021b). Higher prevalence was observed among pets whose owners were positive for COVID-19, which suggested that human contact may be a determining factor for infections among dogs and cats (CALVET et al., 2021b; FRITZ et al., 2021b; HAMER et al., 2021b; LAIDOUDI et al., 2021b).

Despite the worldwide threat posed by SARS-CoV-2 during the pandemic, in which the state of Mato Grosso had the second highest mortality rate in Brazil, no large-scale study on dogs and cats in highly infected areas of Brazil has so far been conducted. Accordingly, the present study reports on a serosurvey among dogs and cats in Cuiabá, the state capital of Mato Grosso, from November 2020 to July 2021, where the human COVID-19 mortality rate was very high at that time.

Method

Sampling

This study was based on blood sampling collected according to convenience at the Veterinary Teaching Hospital (VTH) of the Federal University of Mato Grosso, in central Brazil, between November 2020 and July 2021. The animals brought to the VTH for attendance were mostly from the cities of Cuiaba and Varzea Grande. No restrictions were imposed on the sampling, with regard to medical history, age, breed, vaccination status, owner medical history or reason for attendance. After serological results, owners of seropositive pets were contacted about their SARS-CoV-2 infection status at the time of sampling.

In total, serum samples from 762 dogs (296 in November-December 2020 and 466 in January-July 2021) and 182 cats (68 in November-December 2020 and 114 in January-March 2021) were collected. These were placed in cryovial tubes and were immediately sent in dry ice to the Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Valenzano, Italy, and to the Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo, Italy, for detection of SARS-CoV-2 antibodies. Serum samples were analyzed by means of ELISA to detect antibodies against the SARS-CoV-2 nucleocapsid (N) protein, and through the serum neutralization (SN) assay to assess presence of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. One positive and one negative control serum sample were kindly provided by the Istituto Nazionale Malattie Infettive "Lazzaro Spallanzani" (INMI, Rome, Italy) and were included in the assays. The B.1 SARS-CoV-2 isolate was used as the reference strain, and the viral titer of the stock was determined by means of the TCID₅₀ assay, as previously described (VALLERIANI et al., 2021a). The B.1 lineage strain (virus name: hCoV-19/Italy/ABR-IZSGC-TE46419/2020, accession ID: EPI_ISL_529023) has been a human isolate adapted on VERO E6 cells (fourth passage), first identified by qRT-PCR on human nasopharyngeal swab (DANZETTA et al., 2020a), and then by high-throughput sequencing to obtain the whole genome sequence (LORUSSO et al., 2021a). Viral isolation was performed on VERO E6 cells under biosafety level 3 (BSL-3) conditions. The B.1 strain was propagated into VERO E6 cells using MEM supplemented with 10% FBS. Cells were seeded in 175 cm² flasks at 106

cells/mL and after 24 h were infected with 5 mL of a viral suspension at 0.01 multiplicity of infection. The flasks were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and observed daily under an inverted optical microscope. When cytopathic effect (CPE) affected 80–90% of the cell monolayer, the supernatant was collected and centrifuged at 4 °C 2000 rpm for 10 min to remove the cellular pellet. Then, the supernatant was aliquoted and stored at –80 °C. Before use, the virus was titrated in serial 1 log dilutions (from 1 log to 8 log) in 96-well culture plates of Vero E6 cells to determine the 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀). Plates were incubated at 37 °C and checked every day to identify CPE using an inverted optical microscope. The endpoint titers were calculated according to the Reed and Muench method based on 10 replicates for titration (RAMAKRISHNAN, 2016b).

Cell Culture

The grivet monkey (*Cercopithecus aethiops*) kidney epithelial cell line Vero E6 (C1008) was kindly provided by the INMI. The cells were maintained in minimal essential medium (MEM, Sigma Aldrich, Merck Life Science S.r.l., Milan, Italy), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma Aldrich, Merck Life Science S.r.l., Milan, Italy), 106 IU/L of penicillin, 10 g/L of streptomycin, 5 × 10⁶ IU/L of nystatin and 125 mg/L of gentamicin (IZSAM). The cell line was regularly checked for mycoplasma contamination, and its absence was verified through PCR (Mycoplasma Detection Testing, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

A double-antigen ELISA kit was used for detection of specific antibodies against the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in animal serum samples. Specific IgG antibodies binding to the SARS-CoV-2 N protein were determined using ERADIKIT COVID19-IgG (cat: 26867-02; In3diagnostic, Turin, Italy). The results were defined based on the calculated ratio described in the following formula and were expressed as percentages: $PR (\%) = (OD \text{ test sample} - OD \text{ negative control}) / (OD \text{ positive control} - OD \text{ negative control})$

control). Values $\geq 40\%$ were considered positive for the presence of antibodies against SARS-CoV-2.

Serum Neutralization Assay

A previously described SN assay (VALLERIANI et al., 2021a) was applied to assess the presence of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 in dog and cat serum samples. Before testing, the serum samples were inactivated by heating at 56 °C for 30 min. Twofold serial dilutions (from 1:10 to 1:1280) of the tested samples and the positive and negative control samples were prepared in 96-well plates using MEM supplemented with 2% FBS. Negative control serum samples included in the analysis were of human and canine/feline origin, one for each species and collected before SARS-CoV-2 emergence. Positive serum samples were of human and canine/feline origin as previously described (DECARO et al., 2022; DILEEPAN et al., 2021b). Serum samples from dogs and cats tested negative also for alphacoronaviruses by neutralization assays. Subsequently, an equal volume of 100 TCID₅₀/mL of viral isolate was added to the diluted serum samples, and the plates were incubated for 30 min at 37 °C in 5% CO₂. After incubation, the serum-virus solutions were transferred to 96-well plates containing confluent Vero E6 cells that had been seeded on the previous day. These plates were incubated for 72 h at 37 °C in 5% CO₂ and were observed using an inverted microscope for detection of any virus-specific cytopathic effect (CPE). The neutralization titer was defined as the reciprocal of the highest dilution without any CPE in the wells, and the positive threshold was set at 1:10.

Ethics statement

This project was approved by the Ethics Committee on Animal Use at the Federal University of Mato Grosso (protocol number 23108.043344/2020-62).

Results

Overall, the ELISA test revealed that samples from 33/762 dogs (4.3%) dogs and 4/182 cats (2.2%) were seropositive, while the SN assay showed that samples from 3/762 dogs (0.39%) (SN titers ranging from 1:20 to 1:40) and 3/182 cats (1.64%) (SN titers ranging from 1:40 to 1:320) were seropositive. Information on all the SN-positive pets was gathered and is presented in Table 1. The cat owners did not always provide information about when their own SARS-CoV-2 infection started. Only one dog (ID 418) presented a history of respiratory disorder. All the seropositive pets were from households in which the owner was positive for SARS-CoV-2 at the time of sampling. The dog owner with the highest neutralizing antibody titer reported having contracted SARS-CoV-2 infection one month before the dog was sampled.

Discussion

This study showed that SARS-CoV-2 antibodies were present in serum samples from dogs and cats attended at the Veterinary Teaching Hospital, in the same way as reported previously in several other studies worldwide (BARUA et al., 2021b; BESSIÈRE et al., 2022; BOSCO-LAUTH et al., 2020b; CALVET et al., 2021b; CHIBA et al., 2021b; FRITZ et al., 2021b; HAMER et al., 2021b; KACZOREK-ŁUKOWSKA et al., 2022a; PATTERSON et al., 2020b; SHI et al., 2020b). In brief, these studies were conducted during the pandemic and reported occurrences of infection among cats and dogs through positive PCR test results, sometimes in the presence of clinical signs, along with presence of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. These previous results were obtained both from owned pets that had been kept indoors and from stray animals.

Since most previous studies also used ELISA as the screening test in serological surveys (BARUA et al., 2021b; DILEEPAN et al., 2021b; LAIDOUDI et al., 2021b; STEVANOVIC et al., 2021b), the discrepancy found in the present study between ELISA and SN findings from dogs may have been due to cross-reactions with other endemic coronaviruses (BARUA et al., 2021b; LAIDOUDI et al., 2021b). Only 3 out of 33 ELISA-positive canine serum samples were also positive through SN. Not surprisingly, the SARS-CoV-2 N protein has been associated with cross-reactions with other animal

coronaviruses such as the feline coronavirus (FCoV) and the canine coronavirus (CCoV). Moreover, the N protein has been considered to be a conserved viral protein, sharing common antigenic epitopes related to SARS-CoV-2 (BARUA et al., 2021b). In addition, previous studies have suggested that SARS-CoV-2 infection was not very efficient to elicit N protein specific antibodies (DIEZMA-DÍAZ et al., 2023b). Lastly, the high proportion of SN-negative dogs that tested positive through ELISA may be explained by a milder course of infection, compared with cats (BOSCO-LAUTH et al., 2020b; LAM et al., 2020). As the study herein was limited to only an ELISA assay detecting N-protein, future studies should include at least one major surface protein, such as receptor binding site, spike protein, or trimeric spike proteins. Accordingly, higher human levels of neutralizing antibodies have been correlated with severe illness (ZHANG et al., 2020a). In contrast to what was observed in the dogs of the present study, feline serum samples displayed higher agreement between ELISA and SN results, since out of four cat samples that were positive through ELISA, three of them also tested positive through SN. These results corroborated the results from previous studies on cats, in which higher seropositivity rates were observed and higher neutralizing antibody titers were developed than among dogs (BARROSO et al., 2022b; BOSCO-LAUTH et al., 2020b; DILEEPAN et al., 2021b; FRITZ et al., 2021b).

A SARS-CoV-2 serosurvey study in France showed that only 5/449 dogs (1.1%) tested positive through ELISA before the emergence of the virus, while 25/443 dogs (5.5%) displayed antibodies during the COVID-19 pandemic. Seroconversion was observed in the cases of at least 8/218 dogs (3.7%) that were sampled twice during the survey period (LAIDOUDI et al., 2021b). Also in that study, dogs showed low susceptibility to SARS-CoV-2, such that viral transmission from and between dogs was weak or absent. However, comparative high seropositivity to SARS-CoV-2 was reported in 73/388 (18.9%) cats and 39/243 (16.0%) dogs from three veterinary clinics of Poland (KACZOREK-ŁUKOWSKA et al., 2022a). This seropositivity was probably biased due to sampling dogs and cats with owner concerns and veterinary care and high infection rate in human population during the fourth SARS-CoV-2 wave in Poland (KACZOREK-ŁUKOWSKA et

al., 2022a). In the present study, samples were collected over a long period of time with different SARS-CoV-2 strains and epidemiological situations, which may have influenced both owner and pet seropositivity.

Lastly, pets sharing the household with a SARS-CoV-2-infected owner were found to present higher risk of infection in a previous study (FRITZ et al., 2021b). All the pets presenting neutralizing antibodies in the present study were living in COVID-19-positive households. This confirms that pet owners constitute an associated risk factor for infection among their pets. As previously suggested, omicron transmission may occur by back-and-forth, and thus human re-infection with other novel viral strains detected in animals should be considered (SAIED et al., 2021; SAIED; METWALLY, 2022). In such scenario, SARS-CoV-2 infection in humans and animals should always include sequencing to identify novel strains for passive and active immunotherapy development (GRUELL et al., 2022; SAIED et al., 2021; SAIED; METWALLY, 2022).

The present study showed that dogs and cats in areas of widespread human COVID-19 presented low rates of occurrence of SARS-CoV-2 antibodies. Positive pets mostly displayed nonspecific mild clinical signs. Considering that positive pets were associated with COVID-19-positive households, infected owners should take the same precautions regarding isolation from their pets as they should do in relation to other people. The present study was the first large-scale serological survey on SARS-CoV-2 among pets carried out in central Brazil and was conducted in the area with the second highest COVID-19 human mortality rate nationwide.

Conflict of Interest

The authors declare that this research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

LN and VD contributed to the conception and design of the study. SAJ, MTS, KAHS, AP, VRFS, AWB, LN, VD performed field work and sample processing. FV, AS, SC, BB, AL, VV and ND performed serological analyses. SAJ, LBK, AWB, LN and VD wrote the first draft of the manuscript. SAJ, LBK, FV, BB, AL, VV, ND, MTS, KAHS, AS, SC, AP, VRFS, AWB, LN and VD wrote sections of the manuscript. All authors contributed to the manuscript revision and read and approved the submitted version.

Funding

This research was partially funded by ERAnet ICRAD—project Musecov: “Multi-scale Eco-evolution of Coronaviruses: from surveillance toward emergence prediction” (Nicola Decaro); Ricerca Corrente IZSPB 01/20, project “Valutazione della circolazione di SARS-CoV-2 e di altri coronavirus nel cane e nel gatto (CoronaPets)” (Nicola Decaro); Ricerca Corrente 2020, project PanCO “Epidemiologia e Patogenesi dei coronavirus umani ed animali” (Alessio Lorusso); Ricerca Strategica 2020 project, “Susceptibilità dei mammiferi a SARS-CoV-2: rischi di zoonosi inversa e possibilità in medicina traslazionale” (Alessio Lorusso); European Union’s Horizon 2020 Research and Innovation programme (One Health European Joint Programme under grant agreement No 773830, Alessio Lorusso). AB and VD was funded through the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (2020-1/402341).

Acknowledgements

The authors kindly thank all Veterinary Teaching Hospital professionals who helped in the attendance of dogs and cats during the survey period. They also thank all contributors involved in research institutions in Brazil and Italy for their full support, which made it possible to conduct this research. The authors are grateful to Eleonora Lorusso and Costantina Desario, University of Bari, Italy.

References

AGOPIAN, Rafael G. et al. First reported cases of SARS-CoV-2 infection in pets in São Paulo, Brazil. **Veterinary World**, [S. l.], p. 2593–2596, 2022. DOI: 10.14202/VETWORLD.2022.2593-2596.

AGUILÓ-GISBERT, Jordi; PADILLA-BLANCO, Miguel; LIZANA, Victor; MAIQUES, Elisa; MUÑOZ-BAQUERO, Marta; CHILLIDA-MARTÍNEZ, Eva; CARDELLS, Jesús; RUBIO-GUERRI, Consuelo. First description of sars-cov-2 infection in two feral American mink (*Neovison vison*) caught in the wild. **Animals**, [S. l.], v. 11, n. 5, 2021. DOI: 10.3390/ani11051422.

ALLENDER, Matthew C. et al. Multi-species outbreak of SARS-CoV-2 Delta variant in a zoological institution, with the detection in two new families of carnivores. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S. l.], v. 69, n. 5, p. e3060–e3075, 2022. DOI: 10.1111/tbed.14662.

ANKA, Abubakar Umar; TAHIR, Mohammed Ibrahim; ABUBAKAR, Sharafudeen Dahiru; ALSABBAGH, Mohamed; ZIAN, Zeineb; HAMEDIFAR, Haleh; SABZEVARI, Araz; AZIZI, Gholamreza. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. **Scandinavian journal of immunology**, [S. l.], v. 93, n. 4, p. e12998–e12998, 2021. DOI: 10.1111/sji.12998.

APPLIED DNA SCIENCES. **Applied DNA and Evvixax Announce Positive Preliminary Results of Phase I Clinical Trial for LinearDNA™ COVID-19 Vaccine Candidate in Felines**. 2021.

BANERJEE, Arinjay; BAKER, Michelle L.; KULCSAR, Kirsten; MISRA, Vikram; PLOWRIGHT, Raina; MOSSMAN, Karen. **Novel Insights Into Immune Systems of Bats**. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00026.

BARROSO, Ricardo; VIEIRA-PIRES, Alexandre; ANTUNES, Agostinho; FIDALGO-CARVALHO, Isabel. Susceptibility of Pets to SARS-CoV-2 Infection: Lessons from a Seroepidemiologic Survey of Cats and Dogs in Portugal. **Microorganisms**, [S. l.], v. 10, n. 2, 2022. a. DOI: 10.3390/microorganisms10020345.

BARROSO, Ricardo; VIEIRA-PIRES, Alexandre; ANTUNES, Agostinho; FIDALGO-CARVALHO, Isabel. Susceptibility of Pets to SARS-CoV-2 Infection: Lessons from a Seroepidemiologic Survey of Cats and Dogs in Portugal. **Microorganisms**, [S. l.], v. 10, n. 2, 2022. b. DOI: 10.3390/microorganisms10020345.

BARUA, Subarna; HOQUE, Monirul; ADEKANMBI, Folasade; KELLY, Patrick; JENKINS-MOORE, Melinda; TORCHETTI, Mia Kim; CHENOWETH, Kelly; WOOD, Theresa; WANG, Chengming. Antibodies to SARS-CoV-2 in dogs and cats, USA. **Emerging Microbes and Infections**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1669–1674, 2021. a. DOI: 10.1080/22221751.2021.1967101.

BARUA, Subarna; HOQUE, Monirul; ADEKANMBI, Folasade; KELLY, Patrick; JENKINS-MOORE, Melinda; TORCHETTI, Mia Kim; CHENOWETH, Kelly; WOOD, Theresa; WANG, Chengming. Antibodies to SARS-CoV-2 in dogs and cats, USA. **Emerging microbes & infections**, United States, v. 10, n. 1, p. 1669–1674, 2021. b. DOI: 10.1080/22221751.2021.1967101.

BESSIÈRE, Pierre; VERGNE, Timothée; BATTINI, Matéo; BRUN, Jessie; AVERSO, Julien; JOLY, Etienne; GUÉRIN, Jean-Luc; CADIERGUES, Marie-Christine. SARS-CoV-2 Infection in Companion Animals: Prospective Serological Survey and Risk Factor Analysis in France. **Viruses**, Switzerland, v. 14, n. 6, 2022. DOI: 10.3390/v14061178.

BOSCO-LAUTH, Angela M. et al. 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 of the United States of America**, [S. l.], v. 117, n. 42, p. 26382–26388, 2020. a. DOI: 10.1073/pnas.2013102117.

BOSCO-LAUTH, Angela M. et al. 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**, [S. l.], v. 117, n. 42, p. 26382 LP – 26388, 2020. b. DOI: 10.1073/pnas.2013102117.

BOURRET, Vincent et al. Serologic Surveillance for SARS-CoV-2 Infection among Wild Rodents, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 28, n. 12, 2022. DOI: 10.3201/eid2812.221235.

BURRELL, Christopher J.; HOWARD, Colin R.; MURPHY, Frederick A. Coronaviruses. *Em: Fenner and White's Medical Virology*. [s.l.] : Elsevier, 2017. p. 437–446. DOI: 10.1016/B978-0-12-375156-0.00031-X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012375156000031X>.

CALVET, Guilherme Amaral et al. Investigation of SARS-CoV-2 infection in dogs and cats of humans diagnosed with COVID-19 in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 16, n. 4 April 2021, p. 1–21, 2021. a. DOI: 10.1371/journal.pone.0250853.

CALVET, Guilherme Amaral et al. Investigation of SARS-CoV-2 infection in dogs and cats of humans diagnosed with COVID-19 in Rio de Janeiro, Brazil. **PloS one**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. e0250853, 2021. b. DOI: 10.1371/journal.pone.0250853.

CARVAJAL, Mateo et al. SARS-CoV-2 infection in brown-headed spider monkeys (*Ateles fusciceps*) at a wildlife rescue center on the coast of Ecuador—South America . **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 12, n. 4, 2024. DOI: 10.1128/spectrum.02741-23.

CHAN, Paul K. S.; CHAN, Martin C. W. **Tracing the SARS-coronavirus**. **Journal of Thoracic Disease** Pioneer Bioscience Publishing, , 2013. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.06.19.

CHAN, Tatjana et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA in a Zoo-Kept Red Fox (*Vulpes vulpes*). **Viruses**, [S. l.], v. 16, n. 4, 2024. DOI: 10.3390/v16040521.

CHANDLER, Jeffrey C. et al. SARS-CoV-2 exposure in wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). [S. l.], 2023. DOI: 10.1073/pnas.2114828118/-/DCSupplemental. Disponível em: <https://promedmail.org/promed-post/?id=20201213.8015608>.

CHAVDA, Vivek P.; FEEHAN, Jack; APOSTOLOPOULOS, Vasso. A Veterinary Vaccine for SARS-CoV-2: The First COVID-19 Vaccine for Animals. **Vaccines**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 631, 2021. DOI: 10.3390/vaccines9060631.

CHENG, Zhangkai J.; SHAN, Jing. 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know. **Infection**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 155–163, 2020. DOI: 10.1007/s15010-020-01401-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01401-y>.

CHIBA, Shiho; HALFMANN, Peter J.; HATTA, Masato; MAEMURA, Tadashi; FAN, Shufang; ARMBRUST, Tammy; SWARTLEY, Olivia M.; CRAWFORD, Latasha K.; KAWAOKA, Yoshihiro. Protective Immunity and Persistent Lung Sequelae in Domestic Cats after SARS-CoV-2 Infection. [S. l.], v. 27, n. 2, p. 660–663, 2021. a.

CHIBA, Shiho; HALFMANN, Peter J.; HATTA, Masato; MAEMURA, Tadashi; FAN, Shufang; ARMBRUST, Tammy; SWARTLEY, Olivia M.; CRAWFORD, LaTasha K.; KAWAOKA, Yoshihiro. Protective Immunity and Persistent Lung Sequelae in Domestic Cats after SARS-CoV-2 Infection. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 27, n. 2, 2021. b. DOI: 10.3201/eid2702.203884.

Coronavírus Brasil. [s.d.]. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 29 nov. 2022.

COVID-19 - Painel COVID-19 - Estado de Mato Grosso. [s.d.]. Disponível em: <http://www.saude.mt.gov.br/painelcovidmt2/>. Acesso em: 29 nov. 2022.

COVID-19 dashboard. 2024. Disponível em: <https://covid19.who.int/?mapFilter=deaths>. Acesso em: 5 maio. 2023.

CRACKOWER, Michael A. et al. **Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function.** [s.l: s.n.]. Disponível em: www.nature.com/nature.

DANZETTA, Maria Luisa et al. SARS-CoV-2 RNA Persistence in Naso-Pharyngeal Swabs. **Microorganisms**, Switzerland, v. 8, n. 8, 2020. a. DOI: 10.3390/microorganisms8081124.

DANZETTA, Maria Luisa et al. SARS-CoV-2 RNA Persistence in Naso-Pharyngeal Swabs. **Microorganisms**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 1124, 2020. b. DOI: 10.3390/microorganisms8081124.

DE MORAIS, Helio Autran; DOS SANTOS, Andrea Pires; DO NASCIMENTO, Naila Cannes; KMETIUK, Louise Bach; BARBOSA, David Soeiro; BRANDÃO, Paulo Eduardo; GUIMARÃES, Ana Marcia Sá; PETTAN-BREWER, Christina; BIONDO, Alexander Welker. **Natural Infection by SARS-CoV-2 in Companion Animals: A Review of Case Reports and Current Evidence of Their Role in the Epidemiology of COVID-19** . **Frontiers in Veterinary Science** , 2020.

DE SOUZA BARBOSA, Altina Bruna et al. Infection of SARS-CoV-2 in domestic dogs associated with owner viral load. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 153, p. 61–65, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.10.006>.

DE WIT, Emmie; VAN DOREMALEN, Neeltje; FALZARANO, Darryl; MUNSTER, Vincent J. **SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses.** **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, , 2016. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.81.

DECARO, Nicola et al. Long-term persistence of neutralizing SARS-CoV-2 antibodies in pets. **Transboundary and emerging diseases**, Germany, v. 69, n. 5, p. 3073–3076, 2022. DOI: 10.1111/tbed.14308.

DIEZMA-DÍAZ, Carlos et al. A comparative study of eight serological methods shows that spike protein-based ELISAs are the most accurate tests for serodiagnosing SARS-CoV-2 infections in cats and dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, [S. l.], v. 10, 2023. a. DOI: 10.3389/fvets.2023.1121935.

DIEZMA-DÍAZ, Carlos et al. A comparative study of eight serological methods shows that spike protein-based ELISAs are the most accurate tests for serodiagnosing SARS-CoV-2 infections in cats and dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, [S. l.], v. 10, p. 42, 2023. b. DOI: 10.3389/FVETS.2023.1121935.

DILEEPAN, Mythili; DI, Da; HUANG, Qinfeng; AHMED, Shamim; HEINRICH, Daniel; LY, Hinh; LIANG, Yuying. Seroprevalence of SARS-CoV-2 (COVID-19) exposure in pet cats and dogs in Minnesota, USA. **Virulence**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1597–1609, 2021. a. DOI: 10.1080/21505594.2021.1936433.

DILEEPAN, Mythili; DI, Da; HUANG, Qinfeng; AHMED, Shamim; HEINRICH, Daniel; LY, Hinh; LIANG, Yuying. Seroprevalence of SARS-CoV-2 (COVID-19) exposure in pet cats and dogs in Minnesota, USA. **Virulence**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1597–1609, 2021. b. DOI: 10.1080/21505594.2021.1936433.

DOMENICO, Marina Di; DE ROSA, Alfredo; BOCCELLINO, Mariarosaria. diagnostics Detection of SARS-COV-2 Proteins Using an ELISA Test. [S. l.], 2021. DOI: 10.3390/diagnostics. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/diagnostics>.

DREXLER, Jan Felix et al. Bats host major mammalian paramyxoviruses. **Nature Communications**, [S. l.], v. 3, 2012. DOI: 10.1038/ncomms1796.

DREXLER, Jan Felix; CORMAN, Victor Max; DROSTEN, Christian. **Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. Antiviral Research**, 2014. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.10.013.

DUTRA, Valéria et al. Persistent SARS-CoV-2 antigen presence in multiple organs of a naturally infected cat from Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 28, 2022. DOI: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2021-0074.

EPIFANIO, Ivyson da Silva et al. First report of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection in two asymptomatic cats in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Veterinary world**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 2839–2842, 2021. DOI: 10.14202/vetworld.2021.2839-2842.

FERNÁNDEZ-BELLON, Hugo et al. Monitoring natural SARS-CoV-2 infection in lions (*Panthera leo*) at the Barcelona zoo: Viral dynamics and host responses. **Viruses**, [S. l.], v. 13, n. 9, 2021. DOI: 10.3390/v13091683.

FORNI, Diego; CAGLIANI, Rachele; CLERICI, Mario; SIRONI, Manuela. **Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. Trends in Microbiology** Elsevier Ltd, , 2017. DOI: 10.1016/j.tim.2016.09.001.

FRANCISCO, Raquel; HERNANDEZ, Sonia M.; MEAD, Daniel G.; ADCOCK, Kayla G.; BURKE, Sydney C.; NEMETH, Nicole M.; YABSLEY, Michael J. Experimental Susceptibility of North American Raccoons (*Procyon lotor*) and Striped Skunks (*Mephitis mephitis*) to SARS-CoV-2. **Frontiers in Veterinary Science**, [S. l.], v. 8, 2022. DOI: 10.3389/fvets.2021.715307.

FREULING, Conrad M. et al. Susceptibility of Raccoon Dogs for Experimental SARS-CoV-2 Infection. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 26, n. 12, p. 2982–2985, 2020. DOI: 10.3201/eid2612.203733.

FRITZ, Matthieu et al. High prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in pets from COVID-19+ households. **One Health**, [S. l.], v. 11, n. November, p. 0–4, 2021. a. DOI: 10.1016/j.onehlt.2020.100192.

FRITZ, Matthieu et al. High prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in pets from COVID-19+ households. **One health (Amsterdam, Netherlands)**, [S. l.], v. 11, p. 100192, 2021. b. DOI: 10.1016/j.onehlt.2020.100192.

GAUDREAUULT, Natasha. SARS-CoV-2 infection, disease and transmission in domestic cats. [S. l.], p. 1–37, 2020.

GAUDREAUULT, Natasha N. et al. SARS-CoV-2 infection, disease and transmission in domestic cats. **Emerging microbes & infections**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 2322–2332, 2020. DOI: 10.1080/22221751.2020.1833687.

GAUDREAUULT, Natasha N. et al. Experimental re-infected cats do not transmit SARS-CoV-2. **Emerging Microbes and Infections**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 638–650, 2021. DOI: 10.1080/22221751.2021.1902753.

GE, Xing Yi; YANG, Wei Hong; ZHOU, Ji Hua; LI, Bei; ZHANG, Wei; SHI, Zheng Li; ZHANG, Yun Zhi. Detection of alpha- and betacoronaviruses in rodents from Yunnan, China. **Virology Journal**, [S. l.], v. 14, n. 1, 2017. DOI: 10.1186/s12985-017-0766-9.

GRAHAM, Rachel L.; DONALDSON, Eric F.; BARIC, Ralph S. **A decade after SARS: Strategies for controlling emerging coronaviruses. Nature Reviews Microbiology**, 2013. DOI: 10.1038/nrmicro3143.

- GREENBERG, Alissa. **Oakland Zoo vaccinates its animals against Covid-19**. 2021.
- GRIFFIN, Bryan D. et al. SARS-CoV-2 infection and transmission in the North American deer mouse. **Nature Communications**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 3612, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-23848-9.
- GRUELL, Henning; VANSHYLLA, Kanika; WEBER, Timm; BARNES, Christopher O.; KREER, Christoph; KLEIN, Florian. Antibody-mediated neutralization of SARS-CoV-2. **Immunity**, United States, v. 55, n. 6, p. 925–944, 2022. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.05.005.
- GU, Jiang et al. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 202, n. 3, p. 415–424, 2005. DOI: 10.1084/jem.20050828.
- HALE, Vanessa L. et al. SARS-CoV-2 infection in free-ranging white-tailed deer. **Nature**, [S. l.], v. 602, n. 7897, p. 481–486, 2022. DOI: 10.1038/s41586-021-04353-x.
- HAMER, Sarah A. et al. SARS-CoV-2 infections and viral isolations among serially tested cats and dogs in households with infected owners in texas, usa. **Viruses**, [S. l.], v. 13, n. 5, 2021. a. DOI: 10.3390/v13050938.
- HAMER, Sarah A. et al. SARS-CoV-2 Infections and Viral Isolations among Serially Tested Cats and Dogs in Households with Infected Owners in Texas, USA. **Viruses**, [S. l.], v. 13, n. 5, 2021. b. DOI: 10.3390/V13050938.
- HAMMING, I.; TIMENS, W.; BULTHUIS, M. L. C.; LELY, A. T.; NAVIS, G. J.; VAN GOOR, H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **Journal of Pathology**, [S. l.], v. 203, n. 2, p. 631–637, 2004. DOI: 10.1002/path.1570.
- HASÖKSÜZ, Mustafa; KILIÇ, Selcuk; SARAÇ, Fahriye. **Coronaviruses and sars-cov-2. Turkish Journal of Medical Sciences** Turkiye Klinikleri, , 2020. DOI: 10.3906/sag-2004-127.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Current ICTV Taxonomy Release**. 2023. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy>. Acesso em: 9 jul. 2023.
- JARRAH, Samar Afif et al. Persistent SARS-CoV-2 antigen presence in multiple organs of a naturally infected cat from Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins**

including **Tropical Diseases**, [S. I.], v. 28, n. August 2021, p. 1–6, 2022. DOI: 10.1590/1678-9199-jvatitd-2021-0074.

KACZOREK-ŁUKOWSKA, Edyta; WERNIKE, Kerstin; BEER, Martin; WRÓBEL, Małgorzata; MAŁACZEWSKA, Joanna; MIKULSKA-SKUPIEŃ, Elżbieta; MALEWSKA, Karolina; MIELCZARSKA, Izabela; SIWICKI, Andrzej Krzysztof. High Seroprevalence against SARS-CoV-2 among Dogs and Cats, Poland, 2021/2022. **Animals: an open access journal from MDPI**, Switzerland, v. 12, n. 16, 2022. a. DOI: 10.3390/ani12162016.

KACZOREK-ŁUKOWSKA, Edyta; WERNIKE, Kerstin; BEER, Martin; WRÓBEL, Małgorzata; MAŁACZEWSKA, Joanna; MIKULSKA-SKUPIEŃ, Elżbieta; MALEWSKA, Karolina; MIELCZARSKA, Izabela; SIWICKI, Andrzej Krzysztof. High Seroprevalence against SARS-CoV-2 among Dogs and Cats, Poland, 2021/2022. **Animals**, [S. I.], v. 12, n. 16, 2022. b. DOI: 10.3390/ani12162016.

KUMAR, Swatantra; NYODU, Rajni; MAURYA, Vimal K.; SAXENA, Shailendra K. Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Em*: [s.l: s.n.]. p. 23–31. DOI: 10.1007/978-981-15-4814-7_3.

LAI DOUDI, Younes et al. SARS-CoV-2 antibodies seroprevalence in dogs from France using ELISA and an automated western blotting assay. **One Health**, [S. I.], v. 13, n. March, p. 19–21, 2021. a. DOI: 10.1016/j.onehlt.2021.100293.

LAI DOUDI, Younes et al. SARS-CoV-2 antibodies seroprevalence in dogs from France using ELISA and an automated western blotting assay. **One health (Amsterdam, Netherlands)**, Netherlands, v. 13, p. 100293, 2021. b. DOI: 10.1016/j.onehlt.2021.100293.

LAM, Tommy Tsan Yuk et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. **Nature** **2020** **583:7815**, [S. I.], v. 583, n. 7815, p. 282–285, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2169-0.

LAUBER, Chris; GOEMAN, Jelle J.; DE PARQUET, Marial Carmen; THI NGA, Phan; SNIJDER, Eric J.; MORITA, Kouichi; GORBALENYA, Alexander E. The Footprint of Genome Architecture in the Largest Genome Expansion in RNA Viruses. **PLoS Pathogens**, [S. I.], v. 9, n. 7, 2013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003500.

LETKO, Michael; MARZI, Andrea; MUNSTER, Vincent. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. **Nature Microbiology**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 562–569, 2020. DOI: 10.1038/s41564-020-0688-y.

LI, Qun et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2001316. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2001316>.

LIM, Yvonne; NG, Yan; TAM, James; LIU, Ding. Human Coronaviruses: A Review of Virus–Host Interactions. **Diseases**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 26, 2016. DOI: 10.3390/diseases4030026.

LORUSSO, Alessio; CALISTRI, Paolo; SAVINI, Giovanni; MORELLI, Daniela; AMBROSIJ, Lucio; MIGLIORATI, Giacomo; D’ALTERIO, Nicola. **Novel SARS-CoV-2 Variants in Italy: The Role of Veterinary Public Health Institutes**. **Viruses** Switzerland, 2021. a. DOI: 10.3390/v13040549.

LORUSSO, Alessio; CALISTRI, Paolo; SAVINI, Giovanni; MORELLI, Daniela; AMBROSIJ, Lucio; MIGLIORATI, Giacomo; D’ALTERIO, Nicola. Novel SARS-CoV-2 Variants in Italy: The Role of Veterinary Public Health Institutes. **Viruses**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 549, 2021. b. DOI: 10.3390/v13040549.

LU, Hongzhou; STRATTON, Charles W.; TANG, Yi Wei. **Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle**. **Journal of Medical Virology** John Wiley and Sons Inc., , 2020. DOI: 10.1002/jmv.25678.

LU, Roujian et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, [S. l.], v. 395, n. 10224, p. 565–574, 2020. a. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.

LU, Roujian et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, [S. l.], v. 395, n. 10224, p. 565–574, 2020. b. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.

MALLETT, Sue et al. At what times during infection is SARS-CoV-2 detectable and no longer detectable using RT-PCR-based tests? A systematic review of individual participant data. **BMC Medicine**, [S. l.], v. 18, n. 1, 2020. DOI: 10.1186/s12916-020-01810-8.

MASTERS, Paul S. **The Molecular Biology of Coronaviruses. Advances in Virus Research**, 2006. DOI: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3.

MCALOOSE, Denise et al. From people to panthera: Natural sars-cov-2 infection in tigers and lions at the bronx zoo. **mBio**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 1–13, 2020. a. DOI: 10.1128/mBio.02220-20.

MCALOOSE, Denise et al. From people to panthera: Natural sars-cov-2 infection in tigers and lions at the bronx zoo. **mBio**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 1–13, 2020. b. DOI: 10.1128/mBio.02220-20.

MCINTOSH, Kenneth; PEIRIS, J. S. M. Coronaviruses. *Em: Clinical Virology*. [s.l.] : Wiley, 2009. p. 1155–1171. DOI: 10.1128/9781555815981.ch51.

MOLENAAR, Robert Jan et al. Clinical and Pathological Findings in SARS-CoV-2 Disease Outbreaks in Farmed Mink (*Neovison vison*). **Veterinary Pathology**, [S. l.], v. 57, n. 5, p. 653–657, 2020. DOI: 10.1177/0300985820943535.

MOROZOV, Igor et al. Preliminary Study on the Efficacy of a Recombinant, Subunit SARS-CoV-2 Animal Vaccine against Virulent SARS-CoV-2 Challenge in Cats. **Vaccines**, [S. l.], v. 11, n. 12, 2023. DOI: 10.3390/vaccines11121831.

MUNSTER, Vincent J. et al. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. **Nature**, [S. l.], v. 585, n. 7824, p. 268–272, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2324-7.

OIE statement on COVID-19 and mink. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.woah.org/en/oie-statement-on-covid-19-and-mink/>. Acesso em: 5 maio. 2023.

O'SHEA, Thomas J.; CRYAN, Paul M.; CUNNINGHAM, Andrew A.; FOOKS, Anthony R.; HAYMAN, David T. S.; LUIS, Angela D.; PEEL, Alison J.; PLOWRIGHT, Raina K.; WOOD, James L. N. Bat Flight and Zoonotic Viruses. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 741–745, 2014. DOI: 10.3201/eid2005.130539.

OUDE MUNNINK, Bas B. et al. **Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.science.org>.

PALMER, Mitchell V. et al. Susceptibility of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) to SARS-CoV-2. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 95, n. 11, 2021. DOI: 10.1128/jvi.00083-21.

PARRY, Nicola M. A. Forensic Science International : Reports COVID-19 and pets : When pandemic meets panic. **Forensic Science International: Reports**, [S. l.], n. April, p. 100090, 2020. DOI: 10.1016/j.fsir.2020.100090. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsir.2020.100090>.

PATTERSON, E. I. et al. Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–5, 2020. a. DOI: 10.1038/s41467-020-20097-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-20097-0>.

PATTERSON, E. I. et al. Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 6231, 2020. b. DOI: 10.1038/s41467-020-20097-0.

PEIRIS, J. S. M.; GUAN, Y.; YUEN, K. Y. **Severe acute respiratory syndrome**. **Nature Medicine**, 2004. DOI: 10.1038/nm1143.

PEREIRA, Asheley H. B. et al. ScienceDirect Natural SARS-CoV-2 Infection in a Free-Ranging Black-Tailed Marmoset (*Mico melanurus*) from an Urban Area in Mid-West Brazil. [S. l.], v. 194, p. 22–27, 2022. a. DOI: 10.1016/j.jcpa.2022.03.005.

PEREIRA, Asheley Hb et al. Natural SARS-CoV-2 Infection in a Free-Ranging Black-Tailed Marmoset (*Mico melanurus*) from an Urban Area in Mid-West Brazil. **Journal of comparative pathology**, England, v. 194, p. 22–27, 2022. b. DOI: 10.1016/j.jcpa.2022.03.005.

PEREIRA, Asheley Henrique Barbosa et al. A Novel Host of an Emerging Disease: SARS-CoV-2 Infection in a Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) Kept Under Clinical Care in Brazil. **EcoHealth**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 458–462, 2022. c. DOI: 10.1007/s10393-022-01623-6.

PERLMAN, Stanley; NETLAND, Jason. **Coronaviruses post-SARS: Update on replication and pathogenesis**. **Nature Reviews Microbiology**, 2009. DOI: 10.1038/nrmicro2147.

PORTER, Stephanie M.; HARTWIG, Airn E.; BIELEFELDT-OHMANN, Helle; BOSCOLAUTH, Angela M.; ROOT, J. Jeffrey. Susceptibility of Wild Canids to SARS-CoV-2. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 28, n. 9, p. 1852–1855, 2022. DOI: 10.3201/eid2809.220223.

RAČNIK, Jožko et al. Transmission of SARS-CoV-2 from human to domestic ferret. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 27, n. 9, p. 2450–2453, 2021. DOI: 10.3201/eid2709.210774.

RAMAKRISHNAN, Muthannan Andavar. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. **World Journal of Virology**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 85, 2016. a. DOI: 10.5501/wjv.v5.i2.85.

RAMAKRISHNAN, Muthannan Andavar. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. [S. l.], 2016. b. DOI: 10.5501/wjv.v5.i2.85.

ROCKX, Barry et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. **Science (New York, N.Y.)**, United States, v. 368, n. 6494, p. 1012–1015, 2020. DOI: 10.1126/science.abb7314.

SAIED, AbdulRahman A.; METWALLY, Asmaa A. SARS-CoV-2 variants of concerns in animals: An unmonitored rising health threat. **Virusdisease**, India, v. 33, n. 4, p. 466–476, 2022. DOI: 10.1007/s13337-022-00794-8.

SAIED, AbdulRahman A.; METWALLY, Asmaa A.; MOHAMED, Hams M. A.; HARIDY, Mohie A. M. The contribution of bovines to human health against viral infections. **Environmental science and pollution research international**, Germany, v. 28, n. 34, p. 46999–47023, 2021. DOI: 10.1007/s11356-021-14941-z.

SAMRAT, Subodh Kumar; THARAPPEL, Anil M.; LI, Zhong; LI, Hongmin. **Prospect of SARS-CoV-2 spike protein: Potential role in vaccine and therapeutic development**. **Virus Research** Elsevier B.V., , 2020. DOI: 10.1016/j.virusres.2020.198141.

SCHLOTTAU, Kore et al. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. **The Lancet Microbe**, [S. l.], v. 1, n. 5, p. e218–e225, 2020. a. DOI: 10.1016/S2666-5247(20)30089-6.

SCHLOTTAU, Kore et al. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. **The Lancet. Microbe**, England, v. 1, n. 5, p. e218–e225, 2020. b. DOI: 10.1016/S2666-5247(20)30089-6.

SECRETARIA DE SAÚDE DE MATO GROSSO. COVID-19 Painel. [S. l.], 2024. Disponível em: <http://www.saude.mt.gov.br/painelcovidmt2/>.

SHAH, Vibhuti Kumar; FIRMAL, Priyanka; ALAM, Aftab; GANGULY, Dipyaman; CHATTOPADHYAY, Samit. **Overview of Immune Response During SARS-CoV-2**

Infection: Lessons From the Past. Frontiers in Immunology Frontiers Media S.A., , 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01949.

SHI, Jianzhong et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. **Science**, [S. l.], v. 368, n. 6494, p. 1016–1020, 2020. a. DOI: 10.1126/science.abb7015.

SHI, Jianzhong et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. **Science**, [S. l.], p. eabb7015, 2020. b. DOI: 10.1126/science.abb7015.

SIA, Sin Fun et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. **Nature**, [S. l.], v. 583, n. 7818, p. 834–838, 2020. a. DOI: 10.1038/s41586-020-2342-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2342-5>.

SIA, Sin Fun; YAH, Li-Meng; CHIN, Alex WH; FUND, Kevin; POON, Leon LM; NICHOLLS, John M.; PEIRIS, Malik; YEN, Hui-Ling. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 virus in golden syrian hamsters. **PREPRINT (Version 1) available at Research Square**, [S. l.], 2020. b. DOI: 10.21203/rs.3.rs-20774/v1.

SINGH, Dhiraj Kumar et al. in the lungs of rhesus macaques , baboons and marmosets. **Nature Microbiology**, [S. l.], v. 6, n. January, 2021. a. DOI: 10.1038/s41564-020-00841-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-020-00841-4>.

SINGH, Dhiraj Kumar et al. Responses to acute infection with SARS-CoV-2 in the lungs of rhesus macaques, baboons and marmosets. **Nature Microbiology**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 73–86, 2021. b. DOI: 10.1038/s41564-020-00841-4.

SONG, Peipei; LI, Wei; XIE, Jianqin; HOU, Yanlong; YOU, Chongge. **Cytokine storm induced by SARS-CoV-2. Clinica Chimica Acta** Elsevier B.V., , 2020. DOI: 10.1016/j.cca.2020.06.017.

STANOJEVIC, Slavoljub; RADOJICIC, Sonja; MISIC, Dusan; SREJIĆ, Damjan; VASILJEVIC, Dragan V.; PROKIC, Kristina; ILIĆ, Nevenka. Seroprevalence of SARS-CoV-2 in Dogs and Cats: Results of a Retrospective Serological Survey of Infection in Dogs and Cats in Šumadija District, Serbia. **SSRN Electronic Journal**, [S. l.], 2022. DOI: 10.2139/ssrn.4060891.

STEVANOVIC, Vladimir et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 infection among pet animals in Croatia and potential public health impact. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S. l.], v. 68, n. 4, p. 1767–1773, 2021. a. DOI: 10.1111/tbed.13924.

STEVANOVIC, Vladimir et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 infection among pet animals in Croatia and potential public health impact. **Transboundary and emerging diseases**, Germany, v. 68, n. 4, p. 1767–1773, 2021. b. DOI: 10.1111/tbed.13924.

STOFFELLA-DUTRA, Ana Gabriella et al. SARS-CoV-2 Spillback to Wild Coatis in Sylvatic–Urban Hotspot, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 664–667, 2023. DOI: 10.3201/eid2903.221339.

STREICKER, Daniel G.; GILBERT, Amy T. **Contextualizing bats as viral reservoirs.** **Science**American Association for the Advancement of Science, , 2020. DOI: 10.1126/science.abd4559.

SULKIN, S. E.; ALLEN, R. **Virus Infections in Bats.** [s.l.] : S.Karger AG, 1974. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-04030-2>. Acesso em: 15 maio. 2023.

TAN, Chee Wah et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 38, n. 9, p. 1073–1078, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0631-z.

ULRICH, Lorenz; MICHELITSCH, Anna; HALWE, Nico; WERNIKE, Kerstin; HOFFMANN, Donata; BEER, Martin. Experimental SARS-CoV-2 Infection of Bank Voles. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 1193–1195, 2021. DOI: 10.3201/eid2704.204945.

VALLERIANI, Fabrizia et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Variants by Serum from BNT162b2 Vaccine Recipients. **Viruses**, Switzerland, v. 13, n. 10, 2021. a. DOI: 10.3390/v13102011.

VALLERIANI, Fabrizia et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Variants by Serum from BNT162b2 Vaccine Recipients. **Viruses**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 2011, 2021. b. DOI: 10.3390/v13102011.

VAN DEN BRAND, J. M. A.; L.HAAGMANS, B.; LEIJTEN, L.; VAN RIEL, D.; E.MARTINA, B. E.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; KUIKEN, T. Pathology of experimental SARS coronavirus infection in cats and ferrets. **Veterinary Pathology**, [S. l.], v. 45, n. 4, p. 551–562, 2008. DOI: 10.1354/vp.45-4-551.

VAN DER HOEK, Lia. **SARS-CoV, human coronavirus NL63 (HCoV-NL63) and HCoV-HKU1 were first described Human coronaviruses: what do they cause?** [s.l: s.n.].

VERCAMMEN, Francis et al. SARS-CoV-2 Infection in Captive Hippos (*Hippopotamus amphibius*), Belgium. **Animals**, [S. l.], v. 13, n. 2, 2023. DOI: 10.3390/ani13020316.

V'KOVSKI, Philip; KRATZEL, Annika; STEINER, Silvio; STALDER, Hanspeter; THIEL, Volker. **Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. Nature Reviews Microbiology** Nature Research, , 2021. DOI: 10.1038/s41579-020-00468-6.

WHO. **WHO**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>. Acesso em: 28 maio. 2023.

WHO. **Determines that COVID-19 is now an established and ongoing health issue which no longer constitutes a public health emergency of international concern (PHEIC)**. 2023. Disponível em: [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic). Acesso em: 4 maio. 2023.

WHO. **WHO COVID-19 dashboard**. 2024.

WHO **Covid-19 Dashboard**. 2024. Disponível em: <https://covid19.who.int/?mapFilter=deaths>. Acesso em: 28 maio. 2023.

WOOLSEY, Courtney et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19 and protection against re-infection. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 86–98, 2021. a. DOI: 10.1038/s41590-020-00835-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-020-00835-8>.

WOOLSEY, Courtney et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19 and protection against re-infection. **Nature immunology**, United States, v. 22, n. 1, p. 86–98, 2021. b. DOI: 10.1038/s41590-020-00835-8.

WRAPP, Daniel; WANG, Nianshuang; CORBETT, Kizzmekia S.; GOLDSMITH, Jory A.; HSIEH, Ching-Lin; ABIONA, Olubukola; GRAHAM, Barney S.; MCLELLAN, Jason S. **Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.science.org>.

YAGLOM, Hayley D. et al. DETECTION OF SARS-COV-2 IN A SQUIRREL MONKEY (SAIMIRI SCIUREUS): A ONE HEALTH INVESTIGATION AND RESPONSE. **Journal of**

Zoo and Wildlife Medicine, [S. l.], v. 55, n. 2, p. 471–478, 2024. DOI: 10.1638/2023-0052.

YILMAZ, Aysun et al. Presence of Antibodies to SARS-CoV-2 in Domestic Cats in Istanbul, Turkey, Before and After COVID-19 Pandemic. **Frontiers in Veterinary Science**, [S. l.], v. 8, 2021. DOI: 10.3389/fvets.2021.707368.

ZHANG, Bicheng et al. Immune Phenotyping Based on the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and IgG Level Predicts Disease Severity and Outcome for Patients With COVID-19. **Frontiers in molecular biosciences**, Switzerland, v. 7, p. 157, 2020. a. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00157.

ZHANG, Bicheng et al. Immune Phenotyping Based on the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and IgG Level Predicts Disease Severity and Outcome for Patients With COVID-19. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [S. l.], v. 7, 2020. b. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00157.

ZHANG, Qiang et al. SARS-CoV-2 neutralizing serum antibodies in cats: a serological investigation. **bioRxiv**, [S. l.], p. 2020.04.01.021196, 2020. c. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.01.021196v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.01.021196v1.abstract>.

ZHANG, Qiang et al. SARS-CoV-2 neutralizing serum antibodies in cats: a serological investigation. **bioRxiv**, [S. l.], p. 2020.04.01.021196, 2020. d. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.01.021196v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.01.021196v1.abstract>.

ZHANG, Qiang et al. A serological survey of SARS-CoV-2 in cat in Wuhan. **Emerging Microbes and Infections**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 2013–2019, 2020. e. DOI: 10.1080/22221751.2020.1817796.

ZHAO, Jie; CUI, Wei; TIAN, Bao Ping. **The Potential Intermediate Hosts for SARS-CoV-2**. **Frontiers in Microbiology**Frontiers Media S.A., , 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.580137.

ZHAO, Ya et al. A serological survey of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in dogs in Wuhan. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S. l.], v. 69, n. 2, p. 591–597, 2022. DOI: 10.1111/tbed.14024.

ZHAO, Yu; ZHAO, Zixian; WANG, Yujia; ZHOU, Yueqing; MA, Yu; ZUO, Wei. zhao single cell rna expression profiling of ace 2 the receptor of sars cov 2. **BioRxiv**, [S. l.], 2020. a.

ZHAO, Yuan et al. Susceptibility of tree shrew to SARS-CoV-2 infection. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2020. b. DOI: 10.1038/s41598-020-72563-w.

ZHAO, Yuan et al. Susceptibility of tree shrew to SARS-CoV-2 infection. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2020. c. DOI: 10.1038/s41598-020-72563-w.

ZHOU, Peng et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, [S. l.], v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.

ZOETIS INC. **Zoetis Donates COVID-19 Vaccines to Help Support the Health of Zoo Animals**. 2021.

<i>Sp</i>	<i>Sex</i>	<i>Breed</i>	<i>Age</i>	<i>Sampling date</i>	<i>History</i>	<i>ELISA</i>	<i>SN</i>	<i>Street access</i>	<i>COVID-19 household status</i>
<i>Dog</i>	F	Basset	3 Y	May 25, 2021	Idiopathic epilepsy	24.00%	1:20	No	Yes, January 2021
<i>Dog</i>	F	Shih tzu	1 M	Jan 28, 2021	Sneezing, nasal secretion	33.81%	1:10	Yes	Yes, November 2021
<i>Dog</i>	M	Shih tzu	7 Y	May 20, 2021	Acute renal insufficiency	40.0%	1:40	No	Yes, April 2021
<i>Cat</i>	M	Mixed breed	8 M	Dec 16, 2020	Vomiting, intense dehydration, dyschezia, dysuria, anorexia, weight loss	41.60%	1:320	Yes	COVID-19 symptoms; infection not confirmed
<i>Cat</i>	F	Siamese	4 Y	Feb 2021	Urinary infection	55.19%	1:80	No	Yes, mid-2020
<i>Cat</i>	F	Mixed breed	1 Y	Apr 11, 2021	Fracture	45.00%	1:40	Yes	Yes, date unknown
<i>Cat</i>	F	Mixed breed	2 Y	Jan 8, 2021	Elective castration	31.96%	Negative (< 1:10)	No	Yes, 2020

Table 1. Epidemiological data on dogs and cats that were seropositive for SARS-CoV-2 through serum neutralization (SN) assays.

APÊNDICE B - SARS-CoV-2 serosurvey study in wild animals in Brazil

SARS-CoV-2 serosurvey study in wild animals in Brazil

ABSTRACT

The pandemia scenario we lived from 2019-2023 changed our lives forever, a lot was learnt and has still to come as knowledge about reverse zoonotic diseases and the good relationship between humans and the nature. Since animals can get affected and may be reservoirs of SARS-CoV-2 we tested 36 samples of wild animals brought by governmental organisations to the veterinary teaching hospital of Federal University of Mato Grosso that were found in the region of Cuiabá – capital of the state of Mato Grosso with ELISA and Virus Neutralization Test during August 2020 and April 2021. All samples were negative for SARS-CoV-2 in both tests. These results show that infection of wild-life animals in the area of study is probably rare, however the constant surveillance around animals and the safe contact and interactions with ecosystems in One-Health approach is essential to avoid widespread of important pathogens.

Keywords: Brazil, One-health, SARS-CoV-2, wild animals, VNT, ELISA

Coronaviruses impacted public health in the last decades and are responsible for severe diseases which are known as SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome – Coronavirus), the MERS (Middle East Respiratory Syndrome) and now the SARS-CoV-2 (SAMRAT et al., 2020).

Currently, genetic sequences data shows that the Coronavirus circulating in *Rhinolophus* bat (Horseshoe Bat) populations is the closest relative of SARS-CoV-2 suggesting this animal as reservatory, but there is no enough scientific evidence to identify how the original route of transmission to humans started, this could be facilitated by an intermediate host that remains unknown (WOAH, 2022). Because of its origin in animals, knowing the susceptible animals and possible reservatories is essential to preserve the human being health (MCALOOSE et al., 2020).

Cuiaba – capital city of Mato Grosso State (MT) was very affected by the SARS-CoV-2 pandemic with a number of confirmed cases of 111.196 at the time of the sampling (August 2020 – April 2021) in a population of 612.547 with a mortality rate of 4,7 at the time (SECRETARIA DE SAÚDE DE MATO GROSSO, 2023), Considering the potential public health implications, it is crucial to investigate the prevalence of SARS-CoV-2 exposure in wild animal populations, this study's aim was to make a serosurvey in wild animals brought by governmental organisations for medical care to the teaching hospital to know the seroprevalence of SARS-CoV-2 in their natural environment.

The samples of 36 wild animals were collected in the teaching veterinary hospital of Federal University of Mato Grosso from August 2020 to April 2021, aliquoted in 100 µl and sent to Italy for processing and testing.

The table1 shows the proportion of species tested for SARS-CoV-2 in ELISA test and Virus Neutralisation Test in Cuiabá-MT.

Specie	Quantity
<i>Panthera onca</i>	8
<i>Alouatta caraya</i>	4
<i>Puma concolor</i>	3
<i>Ateles spp.</i>	4
<i>Nasua nasua</i>	1
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	8
<i>Tapirus terrestris</i>	3
<i>Leopardus pardalis</i>	2

<i>Sapajus spp.</i>	2
<i>Cerdocyon thous</i>	1

A double-antigen ELISA kit was used for detection of specific antibodies against the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in animal serum samples. Specific IgG antibodies binding to the SARS-CoV-2 N protein were determined using ERADIKIT COVID19-IgG (cat: 26867-02; In3diagnostic, Turin, Italy). The results were defined based on the calculated ratio described in the following formula and were expressed as percentages: $PR (\%) = (OD \text{ test sample} - OD \text{ negative control}) / (OD \text{ positive control} - OD \text{ negative control})$. Values $\geq 40\%$ were considered positive for the presence of antibodies against SARS-CoV-2.

A previously described SN assay (VALLERIANI et al., 2021) was applied to assess the presence of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 in dog and cat serum samples. Before testing, the serum samples were inactivated by heating at 56 °C for 30 min. Twofold serial dilutions (from 1:10 to 1:1280) of the tested samples and the positive and negative control samples were prepared in 96-well plates using MEM supplemented with 2% FBS. Negative control serum samples included in the analysis were of human and canine/feline origin, one for each species and collected before SARS-CoV-2 emergence. Positive serum samples were of human and canine/feline origin as previously described (DECARO et al., 2022; DILEEPAN et al., 2021). Subsequently, an equal volume of 100 TCID₅₀/mL of viral isolate was added to the diluted serum samples, and the plates were incubated for 30 min at 37 °C in 5% CO₂. After incubation, the serum-virus solutions were transferred to 96-well plates containing confluent Vero E6 cells that had been seeded on the previous day. These plates were incubated for 72 h at 37 °C in 5% CO₂ and were observed using an inverted microscope for detection of any virus-specific cytopathic effect (CPE). The neutralization titer was defined as the reciprocal of the highest dilution without any CPE in the wells, and the positive threshold was set at 1:10.

All the samples were negative in both tests ELISA and VNT. Although our negative results, there are evidences of infected wild animals in nature in the same city the study was made (PEREIRA et al., 2022a, 2022b), in zoological parks (ALLENDER et al., 2022; CHAN et al., 2024; FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2021; MCALOOSE et al., 2020; VERCAMMEN et al., 2023; YAGLOM et al., 2024), in synantropic animals in Brazil (STOFFELLA-DUTRA et al., 2023) and wildlife in the world (AGUILÓ-GISBERT et al., 2021; HALE et al., 2022). Experimental susceptibility studies in wild animals not only proved their susceptibility for SARS-CoV-2 but also raised the possibility of them being reservoirs in nature, capable of maintaining the virus circulating in the wild environment and acting as reservoirs for the virus (FREULING et al., 2020; PALMER et al., 2021; ZHAO et al., 2020).

Some studies were conducted until the present date in wild animals of free range life. In USA the seroprevalence in White-tailed deer was of 40% in 2021 highlighting the need for continued wildlife surveillance (CHANDLER et al., 2023). A large-scale serologic survey of SARS-CoV-2 in multiple rodent species across many countries in Europe tested 1,237 wild rodents and small mammals also found all negative except for one unconfirmed that was positive in IFA but negative in seroneutralization assay and microsphere immunoassay, this rodent was from an urban park (BOURRET et al., 2022). In Spain a survey of SARS-CoV-2 in captive and free-ranging wildlife found 8/137 animals positive in ELISA targeting antibodies against the receptor binding domain and/or viral nucleoprotein, but from RT-qPCR analysis none of the 283 animals tested were positive (FERNÁNDEZ-BASTIT et al., 2024). In Switzerland, an investigation found a seroprevalence of 3.1%, 2.2% and 4.2% in free-ranging Swiss red foxes, Eurasian lynx and European wildcat, respectively, with this study they could not provide evidence of reservoir formation in between the wildlife accessed (KUHN et al., 2024).

Both of the studies that found positivity in serologic surveys in Switzerland and Spain were conducted in a longer period of time (from 2020-2023) than in our study, this could provide greater chances of wild animals coming into contact with the virus. The animals from our study were free range animals that may not have had contact with humans or contaminated objects in urban areas in this short period (August 2020-April

2021), also the samples were collected during a period of decline in human cases and the beginning of the second wave of SARS-CoV-2 in the city (SECRETARIA DE SAÚDE DE MATO GROSSO, 2023). Although this could be the reason for our negative results, more studies in wild animals in nature are required to know the real threat of maintaining the virus in nature and if animals can be reservoirs in wild environment. This is the first serological survey on SARS-CoV-2 among wild animals of many species in Brazil.

(Word count: 1058)

Acknowledgements

We are thankful to Nicola Decaro with his team and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the support of our study.

All applicable institutional and national guidelines for the care and use of animals were followed.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

References

AGUILÓ-GISBERT, J. et al. First description of sars-cov-2 infection in two feral American mink (*Neovison vison*) caught in the wild. *Animals*, v. 11, n. 5, 1 maio 2021.

ALLENDER, M. C. et al. Multi-species outbreak of SARS-CoV-2 Delta variant in a zoological institution, with the detection in two new families of carnivores. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 69, n. 5, p. e3060–e3075, 1 set. 2022.

BOURRET, V. et al. Serologic Surveillance for SARS-CoV-2 Infection among Wild Rodents, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, v. 28, n. 12, dez. 2022.

CHAN, T. et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA in a Zoo-Kept Red Fox (*Vulpes vulpes*). *Viruses*, v. 16, n. 4, 1 abr. 2024.

CHANDLER, J. C. et al. SARS-CoV-2 exposure in wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). 2023.

DECARO, N. et al. Long-term persistence of neutralizing SARS-CoV-2 antibodies in pets. *Transboundary and emerging diseases*, v. 69, n. 5, p. 3073–3076, set. 2022.

DILEEPAN, M. et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 (COVID-19) exposure in pet cats and dogs in Minnesota, USA. *Virulence*, v. 12, n. 1, p. 1597–1609, 31 dez. 2021.

FERNÁNDEZ-BASTIT, L. et al. Survey of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in captive and free-ranging wildlife from Spain. *Veterinary research*, v. 55, n. 1, p. 90, 19 jul. 2024.

FERNÁNDEZ-BELLON, H. et al. Monitoring natural SARS-CoV-2 infection in lions (*Panthera leo*) at the Barcelona zoo: Viral dynamics and host responses. *Viruses*, v. 13, n. 9, 1 set. 2021.

FREULING, C. M. et al. Susceptibility of Raccoon Dogs for Experimental SARS-CoV-2 Infection. *Emerging Infectious Diseases*, v. 26, n. 12, p. 2982–2985, dez. 2020.

HALE, V. L. et al. SARS-CoV-2 infection in free-ranging white-tailed deer. *Nature*, v. 602, n. 7897, p. 481–486, 17 fev. 2022.

KUHN, J. et al. Investigations on the Potential Role of Free-Ranging Wildlife as a Reservoir of SARS-CoV-2 in Switzerland. *Viruses*, v. 16, n. 9, p. 1407, 3 set. 2024.

MCALOOSE, D. et al. From people to panthera: Natural sars-cov-2 infection in tigers and lions at the bronx zoo. *mBio*, v. 11, n. 5, p. 1–13, 1 set. 2020.

PALMER, M. V. et al. Susceptibility of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) to SARS-CoV-2. *Journal of Virology*, v. 95, n. 11, 10 maio 2021.

PEREIRA, A. H. B. et al. ScienceDirect Natural SARS-CoV-2 Infection in a Free-Ranging Black-Tailed Marmoset (*Mico melanurus*) from an Urban Area in Mid-West Brazil. v. 194, p. 22–27, 2022a.

PEREIRA, A. H. B. et al. A Novel Host of an Emerging Disease: SARS-CoV-2 Infection in a Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) Kept Under Clinical Care in Brazil. *EcoHealth*, v. 19, n. 4, p. 458–462, 1 dez. 2022b.

SAMRAT, S. K. et al. Prospect of SARS-CoV-2 spike protein: Potential role in vaccine and therapeutic development. *Virus Research Elsevier B.V.*, , 15 out. 2020.

SECRETARIA DE SAÚDE DE MATO GROSSO. COVID-19 Painel. 2023.

STOFFELLA-DUTRA, A. G. et al. SARS-CoV-2 Spillback to Wild Coatis in Sylvatic–Urban Hotspot, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 29, n. 3, p. 664–667, mar. 2023.

VALLERIANI, F. et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Variants by Serum from BNT162b2 Vaccine Recipients. *Viruses*, v. 13, n. 10, out. 2021.

VERCAMMEN, F. et al. SARS-CoV-2 Infection in Captive Hippos (*Hippopotamus amphibius*), Belgium. *Animals*, v. 13, n. 2, 1 jan. 2023.

WOAH. Questions and Answers. Disponível em: <<https://www.woah.org/en/what-we-offer/emergency-preparedness/covid-19/#ui-id-2>>. Acesso em: 10 jul. 2023.

YAGLOM, H. D. et al. DETECTION OF SARS-COV-2 IN A SQUIRREL MONKEY (SAIMIRI SCIUREUS): A ONE HEALTH INVESTIGATION AND RESPONSE. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 55, n. 2, p. 471–478, 13 jun. 2024.

ZHAO, Y. et al. Susceptibility of tree shrew to SARS-CoV-2 infection. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.