

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Viviane Campos Spanhol

**SOROLOGIA BASEADA EM ELISA E NANOTECNOLOGIA PARA DETECÇÃO
DA INFECÇÃO EM CÃES E GATOS PELO SARS-COV-2**

Belo Horizonte

2023

Viviane Campos Spanhol

**SOROLOGIA BASEADA EM ELISA E NANOTECNOLOGIA PARA DETECÇÃO
DA INFECÇÃO EM CÃES E GATOS PELO SARS-COV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Co-orientadora: Dra. Cláudia Fideles Resende

Belo Horizonte

2023

S735s Spanhol, Viviane Campos ,1991-
Sorologia baseada em Elisa e Nanotecnologia para detecção da infecção em cães e gatos pelo SARS-CoV2 /Viviane Campos Spanhol. – 2023.
85f. il

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Coorientadora: Cláudia Fideles Resende
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.
Bibliografias: f. 64 a 74
Anexos: f. 81 a 85
Apêndices: f. 75 a 80.

1. Animais de companhia - Doenças - Teses - 2. Epidemiologia - Teses -
3. Nanotecnologia - Teses - I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos - II. Resende, Cláudia Fideles - III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
IV. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

VIVIANE CAMPOS SPANHOL

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 16 de maio de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Jenner Karlisson Pimenta dos Reis - Orientador(a)

Dr.(a). Cláudia Fideles Resende

Dr.(a). Beatriz Senra Álvares da Silva Santos

Dr.(a). Iara Apolinário Borges



Documento assinado eletronicamente por Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, Presidente de comissão, em 16/05/2023, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Beatriz Senra Álvares da Silva Santos, Usuário Externo, em 17/05/2023, às 20:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Iara Apolinário Borges, Usuária Externa, em 18/05/2023, às 09:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Cláudia Fideles Resende, Usuária Externa, em 22/05/2023, às 20:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2281331 e o código CRC C3FD4A09.

*A minha família,
Aos animais e a todos que colaboraram com o
estudo.*

Agradecimentos

O desenvolvimento dessa dissertação de mestrado contou com a ajuda de muitas pessoas e instituições, dentre as quais eu gostaria de deixar meu agradecimento em especial.

Ao meu orientador, prof. Jenner, pela amizade, confiança e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos e ajudar no que fosse necessário para a conclusão deste trabalho e para meu crescimento acadêmico. Gostaria de estender também meus agradecimentos a sua família que me acolheu tão bem quando a minha não estava por perto.

A minha co-orientadora Dra Cláudia, pela parceria, disponibilidade em revisar minha escrita, compartilhamento de conhecimento e divertidas conversas no Retrolab.

Aos integrantes do Retrolab Amanda Cardoso, Ana Clara Pimenta, Bruna Bueno, Marina Mourão, Pâmella Fernandes, Valéria Palmaka e Lucas Tadeu pelas conversas, colaborações nas coletas, apresentações e discussões sobre a pesquisa.

Aos professores da Escola de Veterinária da UFMG pelos conhecimentos compartilhados e contribuição para o desenvolvimento desse estudo. Em especial aos profs Júlia Angélica G. da Silveira, Rafael R. Nicolino e Adriane P. da Costa Val Bicalho.

Aos profs. Danielle Ferreira e Eduardo Antônio Coelho.

Aos funcionários da Escola de Veterinária, em especial Anna Gabriella, Agda e Graziela.

As colegas de pós-graduação Anisleidy Pérez, Andressa Mendes e Bianca Souza pelas colaborações nas coletas e pesquisa.

Aos profs. do CTNano Ary Correa, Lívia Síman, Rosimeire Barcelos e equipe: Caroline, Enzo, Iara, Kennedy e Lívia.

Ao prof. Wesley Van Voorhis e sua equipe, Universidade de Washington, EUA.

Aos tutores voluntários que gentilmente abriram as portas de suas casas para nos receber e contribuir com a coleta de dados para a pesquisa.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

Ao NIH e a CAPES pela contribuição financeira para o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais Cida e Jomar, meus irmãos Vinícius e Jomar Jr, por serem minha base e por me apoiarem nas realizações pessoais e profissionais.

Por fim, ao meu esposo Gabriel, meu parceiro de vida e grande incentivador para a concretização dessa realização pessoal e profissional. Obrigada pela paciência, atenção e carinho. Apesar das dificuldades, com você ao meu lado a jornada foi mais leve e possível.

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito”.

Martin Luther King

Resumo

O conhecimento sobre a situação soropidemiológica de SARS-CoV-2 em cães e gatos no Brasil ainda é escasso. Essa situação ocorre, em parte, devido à ausência de métodos sorológicos disponíveis comercialmente para fazer a análise desses animais. Desse modo, buscou-se desenvolver dois ensaios imunoenzimáticos indiretos (ELISA) baseados nos antígenos do nucleocapsídeo (N) e domínio de ligação ao receptor da proteína spike (S-RBD) de SARS-CoV-2 para detectar anticorpos IgG contra o vírus nos soros de cães e gatos. Amostras de soro foram obtidas de 308 gatos e 260 cães durante o período de fevereiro de 2021 a agosto de 2022 em Belo Horizonte, Minas Gerais. A origem do animal (domicílio com tutor positivo para COVID-19, Hospital Veterinário, Parque Municipal), o gênero (macho, fêmea), a idade (< 1 ano, 1-3 anos, 3-6 anos e > 6 anos), bem como a positividade para retrovírus em felinos foram avaliados como possíveis fatores de risco para a soropositividade para SARS-CoV-2. Paralelamente, também foi desenvolvido um novo método de diagnóstico sorológico *Point of Care* baseado em nanotecnologia para detectar anticorpos contra a proteína N de SARS-CoV-2 no soro de gatos (Plataforma Portátil de Biodiagnóstico - PPB). A ocorrência geral de anticorpos IgG contra o SARS-CoV-2 detectada pelo método ELISA em gatos foi de 16,88% (52/308) e 5% (13/260) nos cães. Não foi encontrada associação entre soropositividade para SARS-CoV-2 e origem, sexo ou idade de ambas espécies ou retrovírus (FIV, FeLV) nos felinos. A chance de ocorrência de SARS-CoV-2 foi 3,85 vezes maior em gatos do que em cães. Nenhum animal soropositivo no ELISA apresentou sinal clínico sugestivo de COVID-19. A maior ocorrência de animais soropositivos foi detectada pelo ELISA-RBD em comparação ao ELISA-N. O ELISA-N e a PPB-N apresentaram diferenças substanciais na detecção de animais soropositivos. Diante da exposição natural de cães e gatos ao SARS-CoV-2, os ELISAs aqui desenvolvidos demonstraram potencial para serem utilizados no monitoramento epidemiológico do vírus nessas espécies.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; Soroprevalência; Animais de companhia; ELISA; Nanotecnologia.

Abstract

The knowledge about the seroepidemiological situation of SARS-CoV-2 in dogs and cats in Brazil is still limited. This situation occurs, in part, due to the lack of commercially available serological methods for analyzing these animals. Thus, we aimed to develop two indirect immunoenzymatic assays based on the N and S-RBD antigens of SARS-CoV-2 to detect IgG against the virus in the sera of dogs and cats. Serum samples were obtained from 308 cats and 260 dogs from February 2021 to August 2022 in Belo Horizonte, Minas Gerais. The origin of the animal (household with COVID-19 owners, Veterinary Hospital, Districtal Park), gender (male, female), age (< 1 year, 1-3 years, 3-6 years and > 6 years), as well as positivity for feline retroviruses were evaluated as possible risk factors for seropositivity for SARS-CoV-2. At the same time, a new Point of Care serological diagnostic method based on nanotechnology was also developed to detect antibodies against the N protein of SARS-CoV-2 in the serum of cats (Portable Biodiagnosis Platform - PPB). The overall occurrence of IgG antibodies against SARS-CoV-2 in cats was 16.88% (52/308) and 5% (13/260) in dogs. No association was found between seropositivity for SARS-CoV-2 and origin, sex or age for both species and retroviruses (FIV& FeLV) in cats. The chance of occurrence of SARS-CoV-2 was 3.85 times higher in cats than in dogs. No seropositive animals in the ELISA showed clinical signs suggestive of COVID-19. A higher occurrence of seropositive animals was detected by ELISA-RBD compared to ELISA-N. ELISA-N and PPB-N showed substantial differences in the detection of seropositive animals. In light of the natural exposure of dogs and cats to SARS-CoV-2, the ELISAs developed here showed potential to be used in the epidemiological monitoring of the virus in these species.

Keywords: SARS-CoV-2; Seroprevalence; Companion animals; ELISA; Nanotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem de microscopia eletrônica dos primeiros coronavírus humanos.....	17
Figura 2 - Classificação taxonômica do SARS-CoV-2.....	18
Figura 3 - Proteínas estruturais de SARS-CoV-2.....	19
Figura 4 - Estágios do ciclo replicativo de SARS-CoV-2.....	20
Figura 5 - Etapas do teste ELISA indireto.....	37
Figura 6 - Síntese química de nanobastões de ouro.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de animais com relatos de infecção pelo SARS-CoV-2 registrados na base de dados do GISAIID.	27
Tabela 2 - Quantidade e origem das amostras de sangue/soro de cães e gatos.	33
Tabela 3 - Quantidade e origem das amostras de soro de gatos testadas na PPB.	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos de soroprevalência que utilizaram o ELISA como técnica de diagnóstico para avaliar anticorpos contra SARS-CoV-2 em cão e gato.	31
Quadro 2 - Ocorrência de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2 em gatos no município de Belo Horizonte, Minas Gerais.....	47
Quadro 3 - Ocorrência de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2 em cães no município de Belo Horizonte, Minas Gerais.....	48
Quadro 4 - Concordância entre os testes ELISA-RBD e ELISA-N.....	49
Quadro 5 - Positividade dos testes ELISA-N e ELISA-RBD por espécie animal.	49
Quadro 6 - Positividade dos testes ELISA-N e ELISA-RBD por grupo animal de acordo com a origem.....	50
Quadro 7 - Resultados ELISA-N e PPB-N para gatos domiciliados com tutores positivos para COVID19.	51
Quadro 8 - Ocorrência de FIV e FeLV em diferentes populações felinas do município de Belo Horizonte, MG.....	51
Quadro 9 - Ocorrência de SARS-CoV-2 por faixa etária de cães (BHC) e gatos (BHG).	52
Quadro 10 - Ocorrência de SARS-CoV-2 por faixa etária gatos (BHG).	52
Quadro 11 - Ocorrência de SARS-CoV-2 por faixa etária em cães (BHC).	53
Quadro 12 - Ocorrência de SARS-CoV-2 por gênero em gatos (BHG).	53
Quadro 13 - Ocorrência de SARS-CoV-2 por gênero em cães (BHC).	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
BHG	Gatos de Belo Horizonte
BHC	Cães de Belo Horizonte
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
CTNano	Centro de Tecnologia em Nanomateriais e Grafeno
ECA	Enzima conversora da angiotensina 2
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunonorbent Assay</i>
GP	Gatos do Parque
GISAID	<i>Global Initiative on Sharing All Influenza Data</i>
HVG	Gatos do Hospital Veterinário
HVC	Cães do Hospital Veterinário
MERS	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
Nbs	Nanobastões
N	Proteína do nucleocapsídeo
PPB	Plataforma Portátil de Biodiagnóstico
Retrolab	Laboratório de retrovírus
S	Proteína spike
S-RBD	<i>Spike protein Receptor-Binding Domain</i>
SARS	Síndrome aguda respiratória severa
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS.....	16
2.1	Objetivo geral.....	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3.	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1.	Família <i>Coronaviridae</i>	17
3.1.1.	Taxonomia.....	17
3.1.2	Morfologia da Partícula.....	18
3.1.3	Ciclo de Multiplicação	19
3.1.4	Patogênese	20
3.1.5	Coronavírus Zoonóticos	21
3.1.6	SARS-CoV-2.....	24
3.1.6.1	Origem.....	24
3.1.6.2	Infecção em Cães e Gatos	25
3.1.6.3	Diagnóstico.....	27
3.1.6.3.1	ELISA.....	27
3.1.6.3.2	Sorologia através da Nanotecnologia, PPB	29
3.1.6.3.3	Testes padrão-ouro	30
3.1.7	Ocorrência de SARS-CoV-2 em cães e gatos	31
4.	MATERIAL E MÉTODOS.	33
4.1	Obtenção das amostras	33
4.1.2	Aspectos éticos e de biossegurança.....	33
4.1.3	Amostras de sangue e soro	33
4.2	Obtenção dos antígenos recombinantes de SARS-CoV-2	35
4.3	Determinação das condições ótimas dos ELISAs	36
4.3.1	Determinação do ponto de corte.....	37
4.4	Plataforma Portátil de Biodiagnóstico (PPB).....	38
4.4.1	Nanobastões de ouro	38
4.4.1.1	Síntese	38
4.4.1.2	Funcionalização.....	39
4.4.2	Avaliação da concentração de BSA	40

4.4.3	Avaliação das placas para leitura no EPEL.....	40
4.4.4	Titulação dos soros no EPEL	40
4.4.5	Definição dos parâmetros para a classificação das amostras na PPB	41
4.6	Análise estatística.....	44
5.	RESULTADOS.....	45
5.1	Características clínico-epidemiológicas dos animais domiciliados com tutores positivos para COVID-19	45
5.3	Ocorrência de SARS-CoV-2 em cães e gatos no município de Belo Horizonte, MG.....	47
5.4	Concordância entre os ELISAs	49
5.5	Comparação entre as técnicas ELISA-N e PPB-N.....	50
5.6	Retrovírus felinas e SARS-CoV-2.....	51
5.7	Relação entre sexo, idade dos animais e SARS-CoV-2.....	52
5.8	Manifestação clínica nos animais soropositivos	53
6.	DISCUSSÃO.....	54
7.	CONCLUSÕES.....	63
8.	PERSPECTIVAS.	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICE 1	75
	APÊNDICE 2	77
	APÊNDICE 3	79
	APÊNDICE 4	80
	ANEXO 1	81
	ANEXO 2	82
	ANEXO 3	83
	ANEXO 4.....	84

1. INTRODUÇÃO

A pandemia de *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19) resultou em enorme ameaça à saúde pública e animal. Desde o surgimento de seu agente causador, o novo coronavírus *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2), no final de 2019 em Wuhan, na China (Zhou *et al.*, 2020), foram reportados mais de 6.9 milhões de óbitos em humanos mundialmente (WHO, 2023). Com a progressão da pandemia, foram surgindo relatos de infecção natural e experimental em diferentes espécies animais (Younes, S. *et al.*, 2020), incluindo animais de companhia como cães e gatos (Brown, 2020; Bryner, 2020; Newman *et al.* 2020; Sit *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2020).

Alguns estudos realizados no Brasil demonstraram a exposição e/ou infecção de cães e gatos, sobretudo aqueles domiciliados com tutores positivos para COVID-19 (Calvet *et al.*, 2021; Dias *et al.*, 2021). Ademais, foram levantadas preocupações quanto à possível exposição de animais errantes no país (Dias *et al.*, 2021). No entanto, ainda são escassos estudos de soroprevalência para SARS-CoV-2 em cães e gatos domiciliados, bem como errantes no Brasil e no estado de Minas Gerais. Logo, os casos nesses animais, frequentes nas residências e nos espaços urbanos brasileiros, podem estar subestimados.

As recomendações para testar cães e gatos domésticos durante a pandemia foram diferentes em cada país. Em geral, a decisão de testar os animais deveria levar em consideração uma abordagem de saúde única, avaliando-se os riscos epidemiológicos e clínicos para saúde pública e animal (CDC, 2021). Levando em consideração os relatos de infecção humana a partir de visões e hamster (Oude *et al.*, 2021; Yen *et al.*, 2022), bem como evento de zoonose reversa em furões utilizados como pets (Giner *et al.*, 2021; Gortazar *et al.*, 2021), urge a preocupação de potenciais ameaças à saúde devido à transmissão entre humanos e animais de companhia.

Desse modo, estudos em cães e gatos tornam-se necessários para monitorar mudanças de prevalência, bem como a possibilidade de eventos zoonóticos ou de zoonose reversa entre os humanos e esses animais de companhia. Sendo importantes tanto para a saúde pública, quanto para a saúde animal, pois podem contribuir com a elucidação de questões epidemiológicas e fortalecimento do debate em saúde única acerca da pandemia de COVID-19.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver testes baseados em Ensaio Imunoenzimático indireto (ELISA) e Plataforma Portátil de Biodiagnóstico (PPB) para o diagnóstico de SARS-COV-2 em cães e gatos.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver dois testes de ELISA, utilizando os antígenos virais N (Nucleocapsídeo) e S-RBD (Domínio de ligação ao receptor da proteína spike) recombinantes, para o diagnóstico de SARS-CoV-2 em cães e gatos.
- Desenvolver Plataforma Portátil de Biodiagnóstico, utilizando medidas fotônicas e nanobastões de ouro funcionalizados com o antígeno N, para o diagnóstico de SARS-CoV-2 em gatos.
- Comparar os resultados obtidos no ELISA e na PPB que utilizaram a proteína N.
- Utilizar os ELISAs para estimar a soroprevalência de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 em cães e gatos domiciliados, bem como gatos comunitários no município de Belo Horizonte, MG.
- Verificar a associação de infecção pelo SARS-CoV-2 com as retrovirose felinas FIV e FeLV.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Família *Coronaviridae*

3.1.1. Taxonomia

Em 1931, foi relatado o primeiro estudo com um coronavírus, o vírus da Bronquite Infecciosa das galinhas (Schalk, 1931). Já em 1965, Tyrrell e Bynoe relataram um novo vírus associado aos resfriados comuns em seres humanos (Tyrrell e Bynoe, 1966). A princípio, essa nova estirpe viral foi nomeada como B814. Nessa mesma época, Hamre e Procknow também isolaram um novo vírus a partir do trato respiratório humano, o qual foi nomeado como estirpe 229E (Hamre e Procknow, 1966). Por possuírem características morfológicas únicas, ambas estirpes não foram relacionadas à nenhuma família viral da época.

Posteriormente em 1967, a virologista pioneira em microscopia eletrônica, June Almeida juntamente com o pesquisador David Tyrrell fizeram um estudo comparativo da morfologia das estirpes, 229E e B814, encontradas em humanos (Figura 1) com os vírus causadores da bronquite infecciosa em galinhas e observaram semelhanças morfológicas entre eles (Almeida e Tyrrell, 1967).

Em 1968, Almeida e Tyrrell, juntamente com outros virologistas, reconheceram na revista Nature esses vírus como novo grupo viral previamente não descrito e sugeriram nomeá-los como Coronavírus, pois eles apresentavam projeções em suas superfícies que lembravam a coroa solar (latim *corona*, *-ae*, coroa) (Almeida *et. al.*, 1968). Todavia, somente em 1975 esse novo grupo de vírus foi oficialmente reconhecido como integrante da família *Coronaviridae* (Tyrrell *et al.*, 1975).

Figura 1 - Imagem de microscopia eletrônica dos primeiros coronavírus humanos.

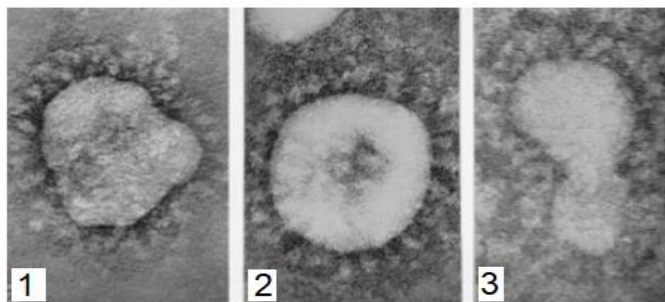


Imagem de microscopia eletrônica dos primeiros coronavírus humanos demonstrando a morfologia em forma de coroa solar da estirpe viral 229E (1) e B814 (2,3). Fonte: ALMEIDA E TYRREL (1967) modificado.

Com relação a classificação taxonômica, SARS-CoV-2 pertence à família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae*, gênero *Betacoronavirus*, subgênero *Sarbecovirus*, espécie *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (Figura 2). Trata-se de uma grande família de vírus de RNA fita simples, senso positivo (RNAss+) e envelopados, que pertencem à ordem *Nidovirales*.

Figura 2 - Classificação taxonômica do SARS-CoV-2.

Ordem: *Nidovirales*

Subordem: *Cornidovirineae*

Família: *Coronaviridae*

Subfamília: *Orthocoronavirinae*

Gênero: *Betacoronavirus*

Subgênero: *Sarbecovirus*

Espécie: *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*

Fonte: GORBALENYA *et al.* (2020)

A subfamília *Orthocoronavirinae* é dividida em quatro gêneros de acordo com características genéticas e evolutivas: *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-* e *Gammacoronavirus* (ICTV, 2021). Majoritariamente, os *Alpha-* e *Betacoronavirus* têm mamíferos como hospedeiros, enquanto os *Delta-* e *Gammacoronavirus* geralmente são isolados de aves (Woo *et al.*, 2012).

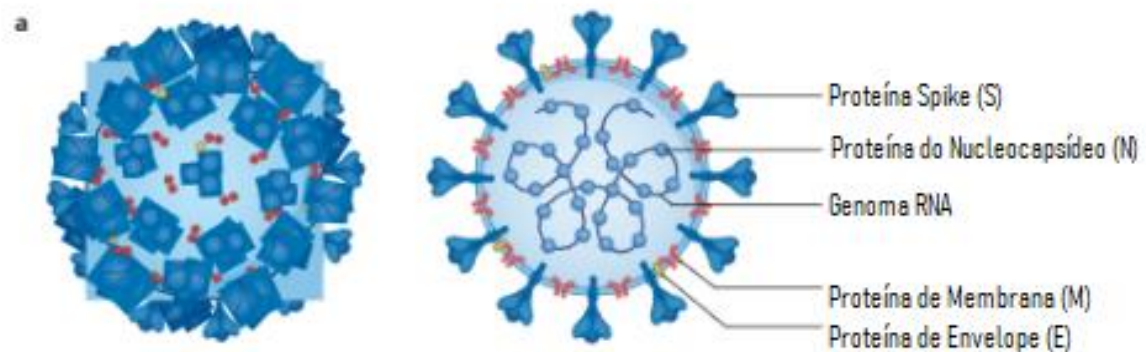
3.1.2 Morfologia da Partícula

SARS-CoV-2 possui quatro proteínas estruturais - nucleocapsídeo (N), membrana (M), envelope (E) e spike (S) (Figura 3). Dessas, as proteínas S e N são as principais utilizadas nos ensaios sorológicos.

A proteína do nucleocapsídeo está envolvida no empacotamento do genoma viral, enquanto a glicoproteína S permite a entrada do vírus na célula hospedeira (Lu *et al.*, 2015). A

proteína S é composta por duas subunidades, S1 e S2. A subunidade S1 possui um domínio de ligação ao receptor (RBD), o qual liga-se especificamente ao receptor da enzima conversora da angiotensina 2 (ECA-2) das células hospedeiras, enquanto a subunidade S2 permite a fusão do envelope viral com a membrana celular (Liu *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005). Desse modo, os receptores ECA-2 presentes nas células do hospedeiro são utilizados pelo SARS-CoV-2 para a entrada na célula (Zhou *et al.*, 2020).

Figura 3 - Proteínas estruturais de SARS-CoV-2.

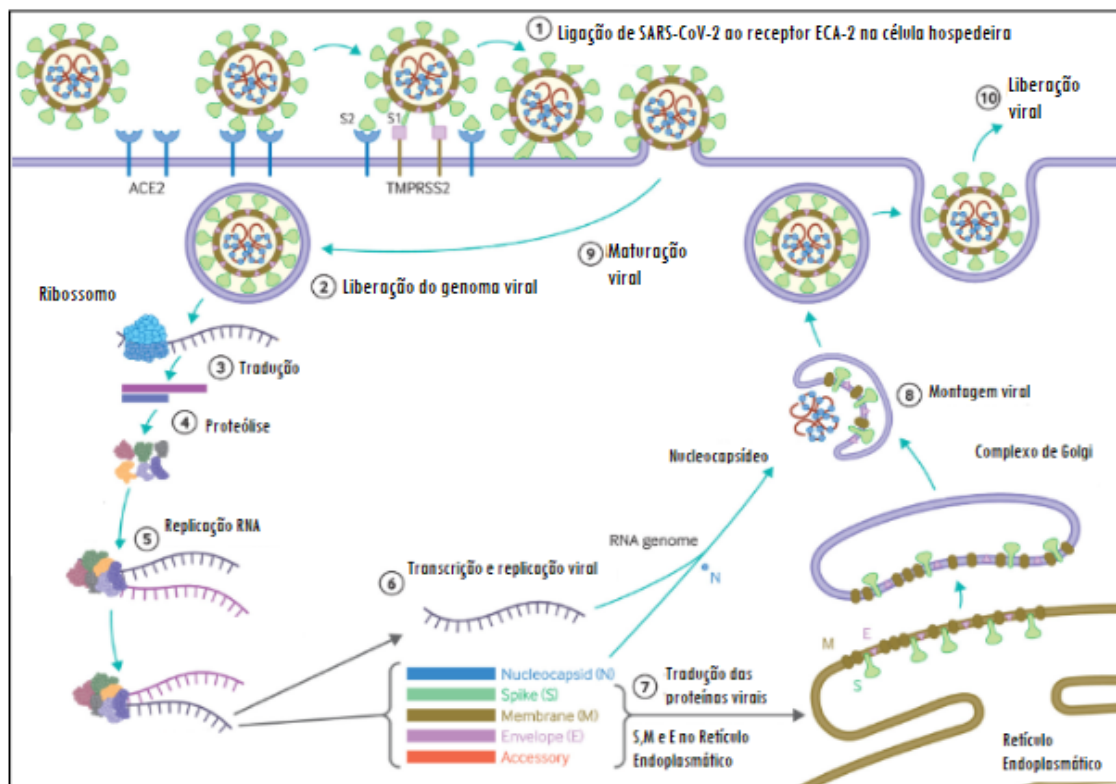


Esquema mostrando as maiores proteínas estruturais de SARS-CoV-2: Proteínas spike (S), de membrana (M), do envelope (E) e do nucleocapsídeo (N). Fonte: LAMERS E HAAGMANS (2022) modificado.

3.1.3 Ciclo de Multiplicação

No primeiro estágio da infecção, o vírus interage com o receptor ECA-2 na célula-alvo do hospedeiro, tal interação é intermediada pelo domínio de ligação ao receptor na subunidade 1 da proteína viral spike (Cevik M, *et al.* 2020a). O ciclo de replicação completo do vírus é descrito na Figura 4.

Figura 4 - Estágios do ciclo replicativo de SARS-CoV-2.



(1) SARS-CoV-2 se liga ao receptor da célula-alvo ECA-2 em sinergia com a serina protease 2 transmembrana do hospedeiro, geralmente expressa nas células epiteliais do trato respiratório e nas células do endotélio vascular. Esse processo leva à fusão da membrana e liberação do genoma viral no citoplasma do hospedeiro (2). Seguido pelos estágios de replicação, montagem, maturação e liberação viral (3-7). Fonte: Adaptado de CEVIK *et al.* (2020a).

3.1.4 Patogênese

A maioria dos cães e gatos infectados pelo SARS-CoV-2 são assintomáticos ou demonstram alterações respiratórias e/ou gastrointestinais moderadas (Newman *et al.* 2020; Segáles *et al.*, 2020; Hosie *et al.*, 2020; Klaus *et al.*, 2021). Estudos experimentais demonstraram a suscetibilidade e transmissibilidade entre gatos, porém não foram observadas manifestações clínicas da doença nos mesmos (Bosco-Lauth *et al.*, 2020; Gaudreault *et al.*, 2020; Shi *et al.* 2020; Halfmann *et al.*, 2020). Outros estudos que investigaram a exposição/infecção de cães e gatos sob condições naturais também não detectaram alterações clínicas, sugerindo que esses animais sejam hospedeiros assintomáticos de SARS-CoV-2 (Hamer *et al.*, 2020; Ruiz-Arrondo *et al.* 2021; Stevanovic *et al.*, 2021).

Em humanos, é reconhecido que os receptores ECA-2 estão distribuídos em diferentes tecidos, tais como no epitélio do trato respiratório e intestinal, bem como no endotélio renal e vascular (Huil *et al.*, 2020; Monteil *et al.*, 2020). Apesar do conhecimento sobre a distribuição espacial desses receptores em animais ser limitada, Lean *et al.* (2022) demonstraram a expressão de ECA-2 nas mucosas respiratória e olfatória, bem como em traquéia e alvéolos pulmonares em gatos. Nos cães, o mesmo estudo demonstrou que ECA-2 estava ausente nas vias aéreas, sendo detectável somente no endotélio e na túnica média dos vasos pulmonares.

Tanto em animais, quanto em humanos a transmissão do novo coronavírus pode ocorrer por meio de contato direto ou indireto com secreções do trato respiratório (Bosco-Lauth *et al.*, 2020; Huil *et al.*, 2020; Shi *et al.* 2020). Em gatos, observou-se período prolongado de excreção viral oral e nasal (mais de 5 dias), com possibilidade de transmissão por contato entre indivíduos da mesma espécie (Bosco-Lauth *et al.*, 2020). Diferentemente, a transmissão intraespécie e eliminação viral após a infecção não foi observada em cães (Bosco-Lauth *et al.*, 2020). Com relação a transmissão por meio da eliminação fecal e/ou contaminação de fômites são necessários mais estudos para melhor compreensão (Cevik *et al.*, 2020a).

Foi reconhecido que SARS-CoV e SARS-CoV-2 apresentam 72% de similaridade entre os nucleotídeos da proteína S (Zhang e Holmes, 2020) e que ambos interagem com receptores ECA-2 da célula hospedeira (Cevik *et al.*, 2020a). Apesar dessas similaridades, SARS-CoV 2 possui algumas características singulares que contribuíram para sua maior transmissibilidade quando comparado ao SARS-CoV. Cita-se, por exemplo, a existência de diferenças estruturais em proteínas de superfície que permitem uma ligação mais forte do SARS-CoV-2 ao receptor ECA-2 (Wrapp, 2020); maior afinidade do novo coronavírus pelo trato respiratório superior (Wölfel *et al.*, 2020) e detecção do pico da carga viral no trato respiratório superior durante o estabelecimento dos sinais clínicos (Cevik *et al.*, 2020b), o que permite a transmissão pré-sintomática e dificulta seu diagnóstico precoce.

3.1.5 Coronavírus Zoonóticos

Os Coronavírus são vírus amplamente distribuídos entre humanos, outros mamíferos e aves, sendo responsáveis por causar doenças respiratórias, entéricas, hepáticas e neurológicas (Masters *et al.*, 2013). Em humanos, a COVID-19 é a sétima coronavirose registrada após HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-HKU, MERS (Síndrome Respiratória do Oriente Médio) e SARS (síndrome aguda respiratória severa) (Bennett *et al.*, 2019).

Entre os animais de companhia, os *Alphacoronavirus*: CCoV (Coronavirose canina) e FCoV (Coronavirose felina) causam alterações gastrointestinais e o *Betacoronavirus* nomeado coronavírus respiratório canino está envolvido com doença respiratória em cães (Decaro *et al.*, 2012; Felten *et al.*, 2019; Erles *et al.*, 2003).

Nos animais de produção, *Betacoronavirus* estão associados com doenças entéricas em bovinos e equinos: BCoV (Coronavirose bovina) e ECoV (Coronavirose equina) (Boileau e Kapil, 2010; Guy *et al.*, 2000). Já em suínos, os mesmos podem ser acometidos pelos *Deltacoronavirus* PDCoV (*Porcine deltacoronavirus*), *Betacoronavirus* PHEV (*Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus*), além de *Alphacoronavirus* que podem causar doenças entéricas potencialmente letais: SADS-CoV (*Swine acute diarrhea syndrome coronavirus*), PEDV (*Porcine epidemic diarrhea virus*) e TGEV (*Transmissible gastroenteritis virus*) (Pan *et al.* 2017; Zhang J., 2016; Mora-Díaz *et al.*, 2019). Em aves, apesar de ocorrerem relatos de *Deltacoronavirus*, os Coronavírus mais conhecidos pertencem ao gênero *Gammacoronavirus*, responsáveis pelas doenças de grande preocupação econômica na avicultura: IBV (*Infectious bronchitis virus*) em galinhas e TCoV (*Turkey coronavirus*) em perus (de Wit e Cook, 2020).

Nesse sentido, durante muito tempo os Coronavírus ficaram conhecidos por causar doenças economicamente importantes em animais e resfriados em humanos. No entanto, nas últimas duas décadas a situação mudou dramaticamente com a emergência de alguns coronavírus zoonóticos e de alta patogenicidade: SARS-CoV (*Severe acute respiratory syndrome - related coronavirus*, 2002) (Drosten *et al.*, 2003), MERS-CoV (*Middle East respiratory syndrome - related coronavirus*, 2012) (Zaki *et al.*, 2012) e SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome - related coronavirus 2*, 2019) (Zhou *et al.*, 2020).

O SARS-CoV, responsável pela Síndrome aguda respiratória severa (SARS), foi relatado pela primeira vez em Guangdong, China em 2002 (Zhong *et al.*, 2003), enquanto o MERS-CoV, causador da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS), foi descrito em 2012 na Arábia Saudita (Zaki *et al.*, 2012). Ambos resultaram em surtos de doenças respiratórias graves com transmissão entre humanos e taxas de letalidade de 10% para SARS-CoV e 34,4% para MERS-CoV (Du *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2020).

Em dezembro de 2019, vários casos de pneumonia viral de causa desconhecida foram registrados em humanos na cidade de Wuhan, província de Hubei, China (Zhu *et al.*, 2020). Os

pacientes apresentaram febre, tosse, dispneia severa e infiltrado bilateral nos pulmões, sinais clínicos similares aos vistos anteriormente em pacientes acometidos por SARS e MERS (Gralinski e Menachery, 2020; Zhu *et al.*, 2020). O agente causador dessa nova pneumonia viral de Wuhan foi isolado de lavados broncoalveolares e identificado como um *Betacoronavirus* nunca registrado anteriormente (Zhu *et al.*, 2020). Análises iniciais do genoma viral presente nos primeiros pacientes acometidos pela doença em Wuhan, revelaram que o novo coronavírus apresentava aproximadamente 72% de similaridade com os nucleotídeos da proteína spike de SARS-CoV (Zhang e Holmes, 2020).

Início de 2020, esse novo coronavírus foi nomeado pelo grupo de estudo *Coronaviridae* do Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) como SARS-CoV-2 e a Organização Mundial da Saúde (OMS) nomeou a doença como COVID-19 (ICTV, 2020; WHO, 2020a). SARS-CoV-2 e outros vírus, predominantemente isolados de humanos e morcegos, tiveram os nomes derivados de SARS-CoV a fim de referenciar o agrupamento filogenético ao invés da manifestação clínica, pois apenas os isolados humanos coletados durante o surto de 2002 foram confirmados como causadores de Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS) nos indivíduos infectados (Gorbalenya *et al.*, 2020).

Diferentemente das coronaviroses de 2002 e 2012, a COVID-19 demonstrou-se altamente transmissível entre humanos e rapidamente alcançou dimensões globais. Portanto, em janeiro de 2020 a OMS reconheceu o surto de COVID-19 como Emergência em Saúde Pública Internacional e posteriormente em março do mesmo ano declarou oficialmente o surto como pandêmico (WHO, 2020a). A taxa de letalidade de SARS-CoV-2 é de aproximadamente 2% e apesar de ser menor que as taxas de SARS-CoV e MERS-CoV, esse novo coronavírus apresentou uma rápida disseminação e capacidade de transmissão a partir de indivíduos assintomáticos ou pré-sintomáticos, o que resultou em maior número de casos e mortes em humanos (Liu *et al.*, 2020; Zhang e Holmes, 2020).

O impacto na saúde humana em decorrência da COVID-19 foi enorme, com milhares de casos e óbitos ao redor do globo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde foram reportados oficialmente, até 26 de abril de 2023, mais de 764 milhões de casos humanos e 6.9 milhões de mortes em todo mundo. A situação do Brasil durante a pandemia foi particularmente crítica, considerando que foram registrados mais de 37 milhões de casos e 701 mil óbitos na mesma data, fazendo com que o país ocupasse a 6ª colocação mundial em número de casos e 2ª em número de óbitos (WHO, 2023). Possivelmente, esses números de casos são maiores, já que

muitos casos assintomáticos ou moderados frequentemente não são considerados nas contagens (Zhang e Holmes, 2020).

3.1.6 SARS-CoV-2

3.1.6.1 Origem

A origem de SARS-CoV-2 ainda não está completamente elucidada. Durante a observação dos primeiros casos de COVID-19, uma associação inicial foi feita com o mercado de animais vivos na cidade de Wuhan, na China (Zhang e Holmes, 2020). Assim como SARS-CoV e MERS-CoV, SARS-CoV-2 também tem sua origem associada a viroses que circulavam em morcegos (Song *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2020).

Alguns estudos sugerem que SARS-CoV-2 originou-se a partir de coronavírus presentes em morcegos-ferradura (*Rhinolophus affinis*), pois a estirpe RaTG13 presente nesses animais mostrou alta similaridade - aproximadamente 96% - com a sequência de nucleotídeos do agente causador da COVID-19 (Zhou *et al.* 2020). Apesar das similaridades genéticas, as diferenças entre esses coronavírus representam mais de 20 anos de evolução viral, logo, a RaTG13 pode ser vista apenas como precursora evolutiva e não origem direta do novo coronavírus (Zhang e Holmes, 2020).

O novo coronavírus possui algumas características únicas que o distingue das demais betacoronavírus. Por exemplo, na junção das subunidades S1 e S2 da proteína spike há um sítio de clivagem polibásico (furina) (Coutard *et al.*, 2020). A função deste local de clivagem polibásico para o SARS-CoV-2 ainda não é completamente elucidada (Andersen *et al.*, 2020), mas estudos anteriores com SARS-CoV sugerem participação na infectividade viral e na gama de hospedeiros (Nao *et al.*, 2017).

Ainda não foi esclarecido até o presente momento se o novo coronavírus foi transmitido de forma direta dos morcegos para os humanos ou por meio de um hospedeiro intermediário (Cui *et al.*, 2022), assim como ocorreu com SARS-CoV e MERS-CoV, os quais têm as civetas e os dromedários como hospedeiros intermediários, respectivamente (Song *et al.*, 2019).

Além dos morcegos, os pangolins (*Manis javanica*) também foram associados à origem de SARS-CoV-2. Coronavírus isolados e sequenciados desses animais demonstraram

cerca de 92,4% de similaridade com o novo coronavírus (Zhang, T., *et al.*, 2020). Diferentemente dos morcegos, os pangolins apresentam alterações clínicas, como pneumonia, quando infectados (Xiao *et al.*, 2020). Nesse sentido, é possível que o pangolim não seja o hospedeiro natural. Contudo, as informações até o momento não são conclusivas sobre sua participação direta como possível hospedeiro intermediário (Hu *et al.*, 2021).

3.1.6.2 Infecção em Cães e Gatos

Com a progressão da pandemia de COVID-19, casos de infecções naturais e experimentais por SARS-Cov-2 foram relatados em diferentes espécies animais em todo o mundo. Ao menos 26 espécies de animais domésticos, de cativeiro ou selvagens - gatos, cães, visões, lontras, furões de estimação, leões, tigres, pumas, leopardos-das-neves, gorilas, veados-de-cauda-branca, gato-pescador, binturong, quati sul-americano, hiena-malhada, lince euroasiático, lince-do-canadá, hipopótamo, hamster, veado-mula, tamanduá-bandeira, peixe-boi das Índias Ocidentais, sagui-de-cauda-preta, esquilo, mandril e raposa vermelha - foram diagnosticados como positivos para esse agente até dezembro de 2022, no portal da Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) (WOAH, 2022).

Assim como os seres humanos, alguns animais são suscetíveis ao SARS-CoV-2 devido a presença do receptor ECA-2 em suas células, que permite a aderência e fusão do envelope viral (Damas *et al.*, 2020; Luan *et al.*, 2020; Schlottau *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2020). As diferenças nas sequências de aminoácidos que compõem esse receptor, bem como sua expressão em diferentes tecidos do hospedeiro podem explicar possíveis diferenças de suscetibilidades entre humanos e animais ao patógeno.

Alguns estudos já demonstraram maior suscetibilidade de hamsters e gatos ao SARS-CoV-2 do que os cães (Shi *et al.*, 2020; Blaurock, 2022). Esse evento é observado em gatos e hamsters dourados, pois são animais que apresentam alta similaridade com a sequência de aminoácidos da ECA-2 de humanos, divergindo somente em 3 dos 22 aminoácidos. Diferentemente, os cães divergem em 5 aminoácidos (Shang *et al.*, 2020).

Cães e gatos frequentemente estão em contato próximo com seres humanos. Logo, torna-se importante investigar a susceptibilidade desses animais ao novo coronavírus. Relatos de infecção pelo SARS-CoV-2 nesses animais de companhia estão frequentemente associados

com a exposição prévia de seus tutores ao vírus (Brown, 2020; Bryner, 2020; Newman *et al.* 2020; Sit *et al.*, 2020).

O primeiro relato de COVID-19 em pets ocorreu em dois cães que coabitavam com tutores positivos, no início de 2020, em Hong Kong, na China. A partir desse estudo foi feita a detecção de RNA e anticorpos em ambos animais e o isolamento viral em um deles. A análise genética das sequências virais dos cães revelou alta similaridade com as sequências encontradas em seus tutores (Sit *et al.*, 2020). Sugerindo, portanto, a transmissão de SARS-CoV-2 de humanos para os cães.

Apesar do estudo feito por Sit e colaboradores, no ano de 2020 em Hong Kong, não demonstrar evidências de transmissão dos cães para outros cães ou pessoas, um dos cães positivos habitava com outro cão, o qual não positivou nos testes para a busca do agente causador da COVID-19. Resultado este que corrobora com outros estudos que não verificaram a transmissão de SARS-CoV-2 entre cães (Shi *et al.*, 2020; Sit *et al.*, 2020).

Após os relatos de infecção nos cães de Hong Kong, outros estudos demonstraram que gatos oriundos de domicílios com pessoas positivas para COVID-19 também positivaram para SARS-CoV-2 (Brown, 2020; Bryner, 2020; Newman *et al.* 2020).

Diferentes variantes surgiram a partir de mutações do SARS-CoV-2. Até o presente momento, foram registradas no banco de dados do GISAID (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data*) sequenciamento de 18 espécies de animais expostos ao agente causador da COVID-19 (Tabela 1). Destas 18 espécies, 15 foram infectadas pela variante delta. Além disso, cães e gatos estão entre os animais infectados por mais de uma variante como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1 - Espécies de animais com relatos de infecção pelo SARS-CoV-2 registrados na base de dados do GISAID.

Espécies	Total	Alpha	Delta	Gamma	Omicron	Lambda	MU GH	Sem variantes
Gato	140	11	27	1	5	3		93
Veado	159	3	38	1	4			113
Vison	1366	6	60		2			1298
Cão	84	5	24		7			48
Leão	74	3	42					29
Tigre	43	3	27					13
Gorila	15	2	12					1
Lontra	8	5	3					
Hamster	24		12		12			
Leopardo da neve	9		4				4	1
Urso-gato-asiático	1		1					
Iena	1		1					
Furão	1		1					
Hipopótamo	1		1					
Gato-pescador	1		1					
Lince	ND							
Onça-parda	ND							
Quati	ND							

ND = Não disponível. Espécies de animais com relatos de infecção pelo SARS-CoV-2, bem como a quantidade de estirpes sequenciadas e registradas na base de dados do GISAID até maio de 2022. Fonte: CUI *et al.* (2022) modificado.

Portanto, a partir de relatos de infecção natural e evidências experimentais, é possível reconhecer que cães e gatos são suscetíveis ao SARS-CoV-2, sendo que os felinos apresentam maior suscetibilidade ao vírus que os cães e são capazes de transmitir o agente viral para outros de sua espécie experimentalmente (Shi *et al.*, 2020).

3.1.6.3 Diagnóstico

3.1.6.3.1 ELISA

Atualmente, testes sorológicos utilizando a técnica ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) são os mais comumente utilizados em estudos para a detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2 em animais. Trata-se de uma técnica versátil, capaz de detectar antígenos ou anticorpos. Quando desenvolvida para detectar anticorpos, pode fornecer

informação sobre a extensão da doença ao nível populacional, sendo, por isso, particularmente interessante em estudos epidemiológicos e de vigilância (Yuce *et al.*, 2021).

Essa técnica foi criada por dois grupos de pesquisadores diferentes no início da década de 70 (Engvall e Perlman, 1971; Weemen e Schuurs, 1971). Devido sua praticidade, tornou-se uma técnica amplamente utilizada em laboratórios de pesquisa e diagnóstico em todo o mundo.

A metodologia baseia-se na detecção de anticorpos ou antígenos específicos por meio de reações imunoenzimáticas. Para tanto, utiliza-se microplacas de plástico (poliestireno, polivinil ou polipropileno) como fase sólida para imobilizar antígenos ou anticorpos específicos (Aydin, S., 2015; Engvall e Perlman, 1971; Yalow e Berson, 1960). Isso permite que outros componentes utilizados durante as etapas do teste sejam removidos e que somente o analito de interesse permaneça no poço (Aydin, S., 2015).

Existem algumas modificações quanto ao procedimento básico do ELISA, mas destaca-se quatro tipos principais: o ELISA direto, o qual possui antígeno adsorvido e visa detectar anticorpos; o ELISA indireto, que também possui antígeno adsorvido na fase sólida, mas pode ser utilizado para detectar antígeno ou anticorpo porque possui etapa adicional com anticorpo secundário conjugado com enzima e complementar ao anticorpo primário; o ELISA sanduíche, que possui anticorpos adsorvidos, logo, visa detectar antígenos; por fim, o ELISA competitivo que utiliza antígenos marcados para competir com o antígeno da amostra pelos sítios de ligação do anticorpo primário, desse modo, quanto menos antígeno na amostra teste, maior é a produção de cor gerada pelo antígeno marcado (Alhadj e Farhana, 2022).

Dentre os diferentes tipos de ELISA supracitados, o método indireto é o mais comumente utilizado para o diagnóstico sorológico de SARS-CoV-2. Em geral, os testes são realizados entre 2 a 8 horas (Mekonnen *et al.*, 2020). Neste método, após a fixação do anticorpo, enzimas, como a fosfatase alcalina ou a peroxidase, são conjugadas a um anticorpo secundário para detectar a presença do analito alvo (Engvall, 2010). As enzimas funcionam como marcador e necessitam de um substrato cromogênico para reagirem. Assim, quando há presença do antígeno, há produção de cor. Para interromper a reação pode-se utilizar uma base ou um ácido forte, tal como NaOH, HCl e H₂SO₄ (Hornbeck, 2001). Por fim, os resultados podem ser lidos em um espectrofotômetro em comprimento de onda específico, entre 400-600 nm, dependendo da enzima utilizada.

Há diferentes variações da técnica ELISA para a pesquisa de SARS-CoV-2 em animais, tais como ELISAs comerciais para detectar anticorpos contra a proteína N (Eradikit® COVID-19 multi-espécies, In3 Diagnostic, Turin, Itália; ID Screen® SARS CoV-2 antígeno duplo multi-espécies e ID Screen® SARS-CoV-2-N IgG ELISA indireto, ambos da ID.Vet, Grabels, França) (Decaro *et al.*, 2021; Jemeršič *et al.*, 2021; Stranieri *et al.*, 2021; Udom *et al.*, 2022; Zhang, Q., *et al.*, 2020) e ELISAs *in house* espécie-específicos desenvolvidos para a detecção de anticorpos contra os antígenos N, S ou S-RBD de SARS-CoV-2 (Dileepan *et al.*, 2021; Goletic *et al.* 2022; Zhao, S., *et al.* 2021).

3.1.6.3.2 Sorologia através da Nanotecnologia, PPB

A nanotecnologia tem se mostrado promissora para a área de diagnósticos, podendo ser utilizada como alternativa para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico para SARS-CoV-2. Testes que utilizam nanopartículas seguem o conceito *Point-of-Care* (POC), pois são testes rápidos e de fácil manuseio, que podem ser realizados próximo ao paciente e fora de um ambiente técnico de laboratório (Brasil, 2015).

A Plataforma Portátil de Biodiagnóstico (PPB) é um método novo de diagnóstico, composto por um Espectrômetro Portátil de Espalhamento de Luz (EPEL) e biosensores sensibilizados com antígenos ou anticorpos específicos. O EPEL foi desenvolvido no Laboratório de Física de Sistemas Biológicos da UFMG, pelos professores Oscar Mesquita, Livia Síman Gomes e Luiz Orlando Ladeira, patente número BR 10 2016 009765 7. Este aparelho baseia-se na técnica de espalhamento de luz dinâmica, ou *Dynamic Light Scattering* (DLS) para medir o tamanho de partículas, ou seja, ele faz a coleta da luz espalhada pelas partículas dispersas em solução, bem como a análise e a medida da dinâmica associada ao movimento Browniano executado por elas.

O movimento Browniano é diretamente proporcional ao tamanho das partículas em suspensão. Logo, pode-se obter coeficientes de difusão das partículas e o tamanho das mesmas em função das flutuações de intensidade de luz. Desse modo, a ocorrência de ligação ou não entre antígenos e anticorpos promove alterações no tamanho e massa dos nanobastões (Nbs) que são captados pelo EPEL.

São utilizados Nbs de ouro no biosensoriamento porque são partículas que possuem anisotropia ótica, a qual otimiza a sensibilidade da técnica para detectar a mudança de tamanho

dos Nbs. A anisotropia ótica do ouro é uma característica ótica resultante das interações de elétrons em sua superfície metálica, a qual após a incidência de um feixe de laser do EPEL, produz dois picos de absorbância: um curto com aproximadamente 500 nm e outro longo próximo da região infravermelha (Cao *et al.*, 2014; Junqueira, 2020).

3.1.6.3.3 Testes padrão-ouro

Diferentes técnicas de diagnóstico podem ser utilizadas para a detecção da infecção ativa ou da exposição ao SARS-CoV-2. Para o diagnóstico de infecção ativa, por exemplo, pode ser utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A PCR em Tempo Real (RT-qPCR) é considerada teste de referência para a detecção precoce da infecção, sendo capaz de detectar a presença do RNA viral por meio da amplificação de regiões específicas do genoma viral, tais como as regiões 1 (N1) e 2 (N2) do nucleocapsídeo viral, gene da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), gene E ou S do SARS-CoV-2 (Barroso-Arévalo *et al.*, 2022; Liu *et al.* 2020; Hamer *et al.*, 2021; Yuce *et al.*, 2021). Técnicas de sequenciamento podem ser utilizadas para identificar as estirpes envolvidas nos surtos em animais (McAloose *et al.* 2020; Fernandez-Bellon *et al.*, 2021).

Para a classificação dos resultados na RT-qPCR para SARS-CoV-2, usualmente considera-se como amostra positiva aquela que apresenta ciclos de *threshold* (Ct) menor que 35 e amostra negativa aquela com Ct maior que 40, já para os valores de Ct entre 35 e 40 é necessário confirmação (Xiao *et al.*, 2020; Liu *et al.* 2020). Além disso, quando faz-se a detecção de dois genes alvos diferentes, considera-se positivo para a presença de SARS-CoV-2, e quando somente um dos dois genes alvos é detectado recomenda-se a repetição do teste (Liu *et al.* 2020).

A técnica de PCR apresenta boa sensibilidade e especificidade nos estágios iniciais da infecção, fator importante para prevenir a transmissibilidade e diferenciar de outras viroses respiratórias, mas ela pode apresentar falsos negativos devido a alguns fatores como: ausência de vírus no local de coleta, coleta inadequada ou feita em estágios muito precoces ou tardios da infecção (momentos com ausência ou baixa replicação viral) (Younes, N. *et al.*, 2020; Yuce *et al.*, 2021). Exigindo, portanto, novas coletas ou associação com outros testes para evitar erros de interpretação diagnóstica em pacientes suspeitos. Desse modo, técnicas moleculares têm a

vantagem de determinar se o indivíduo está ou não infectado no momento da coleta, mas não podem demonstrar exposições prévias ao patógeno.

Com relação a avaliação da exposição prévia ao vírus, o teste de neutralização viral é considerado padrão-ouro e por isso tem sido utilizado como teste confirmatório em alguns estudos em animais domésticos (Embregts *et al.*, 2021; Perera *et al.*, 2021; Calvet *et al.*, 2021; Hamer *et al.*, 2021; Patterson *et al.*, 2020). Entretanto, é um teste que requer laboratórios de biossegurança nível 3 (BSL-3) (WHO, 2021), não sendo, portanto, um teste de fácil acesso.

3.1.7 Ocorrência de SARS-CoV-2 em cães e gatos

Para investigar a prevalência de SARS-CoV-2 em animais domésticos diferentes testes, regiões de estudo, origem dos animais e tamanhos amostrais foram encontrados na literatura, como demonstra o Quadro 1. Com relação a soroprevalência detectada pelo ELISA baseado no antígeno S-RBD, as taxas de positividade variaram de 0,015% a 21,74% para os gatos e 1,69% a 43,9% para os cães. Já com relação aos estudos que utilizaram o ELISA baseado na proteína N a taxa de soropositividade foi de 0,36% a 5% para os gatos e cerca de 1% a 11,6% para os cães.

Quadro 1 - Estudos de soroprevalência que utilizaram o ELISA como técnica de diagnóstico para avaliar anticorpos contra SARS-CoV-2 em cão e gato.

Espécie animal	Método diagnóstico	Prevalência	Localização	Referência
Gato	ELISA-RBD	14,7% (15/102)	China	Zhang,Q., <i>et al.</i> , 2020
Cão	ELISA-RBD	1,69% (16/946)	China	Zhao <i>et al.</i> , 2022
Cão	ELISA- RBD	43,9% * (34/78) 14,69**(157/1069)	Croácia	Stevanovic <i>et al.</i> 2021

Espécie animal	Método diagnóstico	Prevalência	Localização	Referência
Gato e Cão	ELISA-RBD	Gato: 0,015% (2/13397) Cão: 0,014% (1/ 7159)	China	Wang, A <i>et al.</i> 2022
Gato	ELISA S1 e S-RBD	Gato: 0,46% (9/1969) S1 e 0,20% (4/1969) S-RBD	Japão	Imanishi <i>et al.</i> 2022
Gato e Cão	ELISA-RBD	Gato:21,74%(15/69); Cão 4,73% (7/148)	Portugal	Barroso <i>et al.</i> , 2022
Gato	ELISA-N	Gato: 1,7% (3/176)	Portugal	Oliveira <i>et al.</i> 2022
Gato e Cão	ELISA-N	Gato: 0,36% (4/1112); Cão: 1,66%(35/2103)	Tailândia	Udom <i>et al.</i> , 2022
Gato e Cão	ELISA-N	Gato: 18%(37/204); Cão:11,6%(23/198)	EUA	Murphy <i>et al.</i> , 2022

* Animais oriundos de Hospital Veterinário. **Animais domiciliados com tutores positivos para COVID-19.

4. MATERIAL E MÉTODOS.

4.1 Obtenção das amostras

4.1.2 Aspectos éticos e de biossegurança

Este trabalho foi aprovado junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua) da UFMG, sob os protocolos de número 185/2016 (Anexo 1) e 184/2021 (Anexo 2), e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFRPE número 4.054.208 (Anexo 3), como parte do estudo multicêntrico Pet-COVID19. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice 1) foi assinado pelos tutores voluntários para a inclusão dos animais no estudo. As amostras de sangue, bem como os reagentes e produtos químicos empregados durante a pesquisa, foram manipulados, acondicionados e descartados segundo as normas de biossegurança estabelecidas pelo Laboratório de Retrovírus, seguindo o Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde da Escola de Veterinária da UFMG.

4.1.3 Amostras de sangue e soro

Amostras de sangue e soro de 308 gatos e 260 cães foram coletadas durante o período de fevereiro de 2021 a agosto de 2022 no município de Belo Horizonte em Minas Gerais, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Quantidade e origem das amostras de sangue/soro de cães e gatos.

Espécie	Tutores positivos para COVID19	Parque Municipal de BH	Hospital Veterinário da UFMG	Total
Gatos	36	59	213	308
Cães	48	Não se aplica	212	260

As amostras de sangue dos animais pertencentes aos tutores positivos para COVID-19 foram coletadas até 15 dias após diagnóstico positivo na RT-qPCR ou teste rápido do tutor.

Este estudo está inserido em outro grande projeto, previamente aprovado, intitulado “Desenvolvimento de protocolos de acompanhamento georreferenciado da prevalência de SARS-CoV-2 em animais domésticos e no homem e sua associação com infecções pré-existentes” (Edital CAPES 11-2020, Fármacos e Imunologia, do Programa Estratégico Emergencial de Prevenção e Combate a Surtos, Endemias, Epidemias e Pandemias – nº processo 88887.507282/2020-000). Portanto, ao longo do estudo houve colaboração entre diferentes grupos de pesquisa, como parte desse projeto maior.

Para obtenção das amostras, inicialmente, foi feita a divulgação do projeto por meio de mídias sociais e convite para participação no estudo de tutores voluntários positivos para COVID-19 moradores de Belo Horizonte, Minas Gerais. Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), bem como questionários clínicos e epidemiológicos (Apêndice 2) foram utilizados nas entrevistas com os tutores dos animais durante as coletas.

O critério de inclusão no estudo considerou qualquer cão ou gato vivendo com tutores com diagnóstico confirmado (RT-PCR ou teste de antígeno) para SARS-CoV-2 nos últimos 7 dias. Não foram feitas restrições baseadas na raça, idade, condição clínica ou vacinal dos animais. O estudo teve como foco inicial abordar cães e gatos sob condições de alta exposição ao agente viral a partir do convívio com pessoas positivas para COVID-19.

No entanto, a adesão de tutores voluntários para o estudo foi abaixo do esperado. Logo, a fim de aumentar o tamanho amostral e reduzir o potencial de viés, buscou-se coletar amostras de outros animais para os quais não havia evidências epidemiológicas de contato com a COVID19. Desse modo, foi feito contato com a prefeitura de Belo Horizonte para que fosse possível coletar amostras de sangue de animais errantes que são acompanhados por programas de monitoramento em andamento no município como, por exemplo, gatos comunitários presentes no Parque Municipal Américo Renné Giannetti (Anexo 4). Além disso, coletou-se amostras de conveniência de soro do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais, campus Pampulha (HV/UFMG), a qual não impactou os animais com coleta de um novo material, além daquele já coletado para um fim específico no HV/UFMG.

As amostras foram coletadas por médicos veterinários treinados e devidamente paramentados com Equipamentos de Proteção Individual (EPIs). Além dos médicos veterinários, a equipe de apoio também fez uso de EPI. Foi realizada contenção manual dos animais (com auxílio de toalha ou focinheira, caso necessário) e coletou-se o sangue periférico

por punção venosa utilizando tubos coletores (4mL) ou microtubos (0,5mL) com e sem anticoagulante.

O sangue coletado foi encaminhado, sob refrigeração, para o Laboratório de Retrovíroses (RetroLab), da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde foi feita a separação do soro sanguíneo. Após esta etapa, o soro foi identificado, alíquotado e armazenado a -20°C até a execução das análises. As amostras de sangue com anticoagulante, dos cães e gatos oriundos de tutores voluntários positivos para COVID19 e dos gatos do Parque Municipal de BH, foram utilizadas para pesquisa molecular de retrovírus felinos (FIV/FeLV) no RetroLab e pesquisa de outros patógenos por membros do projeto maior.

Durante a visita para a coleta de material biológico nos animais dos tutores voluntários positivos para COVID19, também realizou-se exame clínico e físico dos cães e gatos, com avaliação geral da pele, mucosas, linfonodos, aferição de temperatura, auscultação pulmonar e cardíaca.

Diante da ausência de estudos de soroprevalência em pets no Brasil no momento do estudo, o número mínimo de amostras necessário foi calculado utilizando a ferramenta EpiTools. Nesse sentido, para uma prevalência desconhecida de 50%, um erro tolerado de 5% e um nível de confiança de 95%, estabeleceu-se o tamanho mínimo de amostras em 385 animais.

4.2 Obtenção dos antígenos recombinantes de SARS-CoV-2

Os antígenos recombinantes, denominados N-Nterm e S-RBD, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Wesley C. Van Voorhis da Universidade de Washington, Estados Unidos, dentro da rede de cooperação internacional denominada UWARN- *United World Antiviral Research Network*. A porção terminal da nucleoproteína N (N-Nterm), de aproximadamente 16,62 kDa de tamanho, foi produzida em culturas de *E.coli*, purificado por Ni-cromatografia e cromatografia de exclusão de tamanho para uma única banda em SDS-PAGE (alíquotas de 1.0 mg/mL foram estocadas em -20°C). O fragmento S-RBD foi cultivado em células de mamíferos HEK293 (transientes) no Instituto para design de proteínas de Seattle, Washington, EUA e previamente descrito por Phan et al. 2021 (alíquotas de 0,5 mg/mL foram estocadas -20°C). Foram feitas alíquotas de 50uL da solução estoque, para evitar ciclos de congelamento e descongelamento excessivos dos antígenos. As sequências de aminoácidos dos antígenos N-Nterm e S-RBD utilizados nos ELISAs são descritas no Apêndice 3.

4.3 Determinação das condições ótimas dos ELISAs

O desenvolvimento do teste de ELISA foi realizado no Laboratório de Retrovírus (RetroLab) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a orientação do Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis e co-orientação da Dra Cláudia Fideles Resende.

Foi desenvolvido um novo protocolo de ELISA baseado em antígenos S-RBD e N-term do SARS-CoV-2 para detectar anticorpos específicos relacionados à exposição prévia de cães e gatos ao vírus. Inicialmente, foi utilizado para determinação das condições ótimas, um kit comercial anti-SARS-CoV-2-IgG ELISA (EUROIMMUN, Alemanha), gentilmente cedido pelo Dr Michel Soane da EUROIMMUN Brasil. Este kit, previamente desenvolvido para humanos, foi adaptado para animais através da substituição do conjugado anti-IgG-humana original por proteína A, anti-IgG felino e /ou anti-IgG canino. Dessa forma, avaliou-se as melhores concentrações de antígeno, bem como as diluições dos soros e dos conjugados Proteína A (P8651), anti- IgG felino (SAB3700059) e anti-IgG canino (A6792), conjugados com peroxidase (Sigma-Aldrich®), que apresentavam maior discriminação dos resultados entre as amostras supostamente positivas e negativas.

Nesse sentido, foram testadas duas diluições diferentes de conjugado Proteína A (1:5.000 e 1:10.000), para ambas espécies, e conjugados anti-IgG canino e anti-IgG felino na diluição 1:10.000 frente às amostras de cães e gatos, respectivamente, oriundos de tutores com diagnóstico positivo para COVID-19, diluídas 1:50 segundo Dileepan e colaboradores, 2021.

Com relação aos antígenos virais S-RBD (0,995mg/mL) e N-Nterm (4,8mg/mL), foram testadas duas concentrações diferentes: 100 ng/poço e 200 ng/poço diluídas em tampão carbonato/bicarbonato (50mM pH 9,0) e adsorvidas em placas de poliestireno (Nunc-Immuno Plate Maxisorp) durante 18-24h à 4°C.

A reação foi revelada com 100µL/poço do substrato o-phenylenediamine (OPD) a 0,5mg/mL acrescida de 0,02% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 volumes em tampão citrato-fosfato (pH 5,0), durante 10 minutos em TA, ao abrigo da luz. Seguiu-se a interrupção da reação com 40µL/poço de ácido sulfúrico 1N (solução de parada). Três lavagens com 200µL/poço de PBS-Tween foram realizadas entre todas as etapas, exceto após a adição do substrato.

Por fim, a leitura da reação foi realizada em leitor de ELISA *Thermo Plate* (BioTek ELx800, USA), em um comprimento de onda de 492 nm, como pode ser observado na figura 5, a qual ilustra de forma sucinta todas as etapas mencionadas do ELISA. Para o controle branco, utilizou-se poços com PBST 0,01% no volume correspondente ao utilizado para as amostras teste.

Figura 5 - Etapas do teste ELISA indireto.



Etapa inicial de adsorção dos antígenos N-Term ou S-RBD durante 18-24h a 4°C, seguida da etapa de bloqueio das placas adsorvidas com PBSTL 5% por 1h. Após bloqueio, procede-se com a incubação das amostras diluídas em PBSTL 1% por 1h e adição do conjugado em PBSTL 1%, seguido de incubação por também por 1h. Por último, foi feita a adição do substrato seguida de incubação por 10 min e adição da solução de parada (H_2SO_4) para proceder a leitura das absorvâncias em leitor de ELISA no comprimento de onda de 492nm. Entre cada etapa, exceto a etapa de adição do substrato, foram feitas as lavagens e a secagem da placa. Fonte: Elaborado pela autora a partir de imagens coletadas do site < <https://www.hhub.com.br/noticias/metodo-elisa>>

4.3.1 Determinação do ponto de corte

Para a determinação do ponto de corte (*cutoff*) das leituras das amostras, nos testes ELISA-N e ELISA-RBD, foram selecionadas 80 amostras de soro de cães (n=40) e gatos (n=40) coletadas antes da pandemia de COVID19 (soros Pré-COVID19), entre os anos de 2017 e 2018 no município de Belo Horizonte, MG. Os soros dos cães foram gentilmente cedidos pelos Professores Eduardo Antonio Ferraz Coelho e Danielle Ferreira de Magalhães. Já os soros dos gatos pertenciam ao banco de soros do Laboratório de Retrovírus da UFMG.

Todos os soros pré-pandemia foram testados para determinar os valores do ponto de corte das leituras nos ELISAs. Dessa forma, calculou-se a média das absorvâncias (DO) de todos os soros pré-pandemia, por espécie, acrescido de três vezes o desvio padrão (SD).

Devido à ausência no Brasil de um teste de referência para o diagnóstico sorológico do SARS-CoV-2 em cães e gatos, amostras com leitura alta e baixa para cada uma das espécies foram selecionadas para servirem de controle de qualidade interno. Isso permitiu conferir a precisão das medidas e/ou repetibilidade do teste.

Dessa forma, estabeleceu-se como aceitável um limite de 20% de variação entre as leituras dos controles das placas nos testes feitos no mesmo laboratório em dias diferentes. Logo, esses controles internos foram utilizados como referência para fazer a normatização dos resultados entre as diferentes placas.

4.4 Plataforma Portátil de Bidiagnóstico (PPB)

Esta etapa do projeto foi realizada no Centro de Tecnologia em Nanomateriais e Grafeno da Universidade Federal de Minas Gerais (CTNano) da UFMG, localizado no Parque Tecnológico de Belo Horizonte (BHTec), sob supervisão do prof. Ary Corrêa Junior e das prof^{as} Lívia Síman Gomes e Rosimeire Coura Barcelos.

4.4.1 Nanobastões de ouro

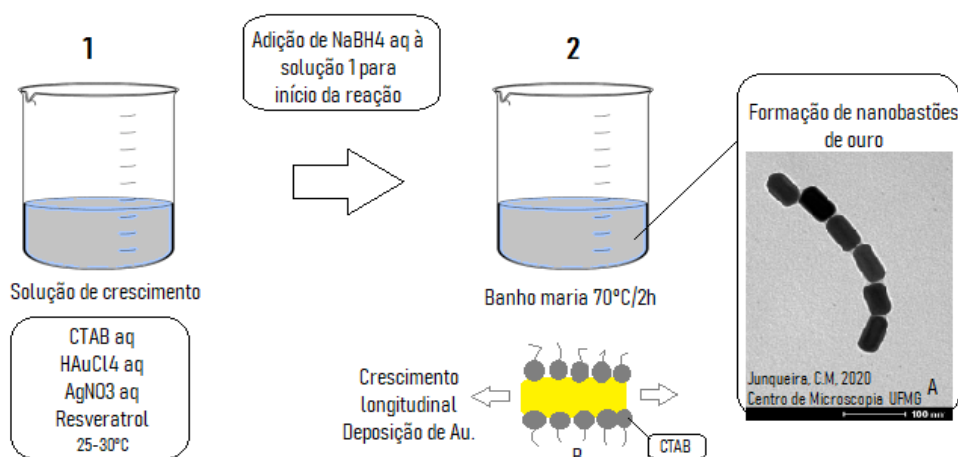
4.4.1.1 Síntese

A construção dos biossensores foi realizada utilizando nanobastões (Nbs) de ouro sintetizados pelo método sem semente, segundo o artigo de Wang e colaboradores (2016), no laboratório de Saúde, Meio Ambiente e Segurança (SMS) do CTNano – UFMG.

Para a síntese dos Nbs de ouro foram adicionadas, em temperatura ambiente, soluções de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) 50 mM, juntamente com ácido cloroáurico (HAuCl₄) 0,5 mM, nitrato de prata (AgNO₃) 0,05 mM e resveratrol 5 mM contendo álcool.

Durante esse processo, a solução sofreu alteração de cor devido a redução de Au (III) para Au (I). Em seguida, adicionou-se uma solução de borohidreto de sódio (NaBH₄) 0,015 mM, a 4°C com o propósito de disparar a formação de sementes de ouro e permitir o crescimento dos Nbs. Posteriormente, a solução foi gradualmente aquecida até atingir 70°C em banho térmico, permanecendo nesta temperatura por 2 horas. Por fim, foram produzidos Nbs com dimensões aproximadas de 50 nm de comprimento e 25 nm de diâmetro, conforme ilustrado na Figura 6.

Figura 6 - Síntese química de nanobastões de ouro.



1 Adição de NaBH_4 à solução de crescimento. 2a Foto de microscopia eletrônica de Nbs de ouro formados após síntese química. 2b CTAB em ligação preferencial nas laterais, funcionando como direcionador do crescimento dos Nbs, permitindo deposição lateral do Au. Fonte: Compilado pela autora com base no artigo de Pearce *et al.* (2007). Crédito da imagem de microscopia eletrônica: Junqueira, C.M., 2020. Centro de Microscopia da UFMG.

4.4.1.2 Funcionalização

A funcionalização é caracterizada pela ligação entre os antígenos de SARS-CoV-2 e os Nbs de ouro, permitindo assim a produção dos biossensores capazes de detectar a presença de anticorpos específicos contra esses antígenos. Durante o processo de funcionalização as extremidades disponíveis dos Nbs de ouro foram ligadas ao ácido-11-mercaptoundecanóico (MUA) por meio do grupamento tiol (SH).

Posteriormente, os reagentes cloridrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida (EDAC) e *N*-hidroxisuccinimida (NHS) foram adicionados para ativar o grupo carboxila (-COOH) do MUA e permitir sua ligação às moléculas contendo grupo amina (-NH₂), tal como os antígenos. Após a ativação das carboxilas, adicionou-se o antígeno N de SARS-CoV-2, em sua forma completa com cerca de 48 kDa. O biossensoriamento ocorre quando o anticorpo específico reconhece os antígenos de SARS-CoV-2 presentes na superfície dos Nbs. Essa etapa está em processo de patenteamento. A sequência de aminoácidos do antígeno N utilizado na PPB é descrita no Apêndice 4.

4.4.2 Avaliação da concentração de BSA

Com fins de reduzir ligações inespecíficas na superfície dos Nbs de ouro e obter melhor distinção entre soros positivos e negativos para SARS-CoV-2, foi feita a avaliação de albumina sérica bovina (BSA) (30 uM) nas seguintes concentrações: 400, 600, 800 e 1000 moléculas de BSA por Nbs. Por exemplo, para obter 400 BSA/Nbs, a cada 330uL de biosensor (25pM) adicionou-se 0,11uL de BSA. Posteriormente, foram realizadas medidas no EPEL e avaliação dos resultados no programa KaleidaGraph®.

4.4.3 Avaliação das placas para leitura no EPEL

Avaliou-se o desempenho de três microplacas de 96 poços fundo plano - Corning®, Costar® e Cralplast® - no leitor de microplacas Varioskan LUX® para selecionar aquela com menor interferência nas leituras. Para a leitura das absorvâncias utilizou-se 3uL de amostra em 297uL de PBS e fator de diluição baseado no comprimento de onda UV-VIS 280, específico para proteínas.

Baseado nas leituras das primeiras 15 amostras e nos resultados de Junqueira, C.M., 2022 (dados não publicados) utilizando a mesma técnica e equipamento para amostras humanas, fixou-se arbitrariamente o menor valor da DO no UV-VIS em 0,17 para normalizar as concentrações de proteínas nas diluições, pois em humanos essa DO foi suficiente para distinguir amostras positivas de negativas. Nesse sentido, a normalização das proteínas totais dos soros foi feita de forma a deixar todas as amostras na mesma concentração.

Inicialmente utilizou-se uma placa de quartzo, a qual não apresentaria absorvância maior que 200 nm. Entretanto, quando comparada, a placa Corning® apresentou maior absorvância. Portanto, após comparação entre os desempenhos das placas, optou-se por retirar o branco para corrigir as leituras e utilizar a placa Corning® para fazer as leituras das amostras no EPEL.

4.4.4 Titulação dos soros no EPEL

Priorizou-se em um primeiro momento testar somente as amostras de soro dos gatos, pois estes mostraram maior frequência de animais soropositivos em nosso ELISA quando comparado aos cães. Dessa maneira, para a determinação das condições ótimas de testagem,

foram selecionados soros de gatos pré-pandemia (n=5), positivo (n=5) e negativo (n=5) no ELISA-N para fazer a titulação no Espectrômetro Portátil de Luz (EPEL). As amostras foram armazenadas a - 20 °C em alíquotas de 3uL até a análise. Optou-se por testar somente amostras com resultados no ELISA-N, pois na época do presente estudo acontecia no CTN Nano projetos com a PPB para diagnóstico de COVID-19 em humanos, em etapas avançadas e utilizando nanosensores funcionalizados com a proteína N recombinante produzida pelo CTVacinas/UFMG.

Uma vez que a concentração de anticorpos de cada amostra não pôde ser aferida, os soros obtidos foram diluídos em PBS pH 7,4 na diluição inicial 1:1000. Para o estabelecimento das condições ótimas utilizou-se como referência os resultados prévios de Junqueira, C. 2022 obtidos para amostras humanas (dados não publicados) e os resultados da avaliação prévia da concentração de BSA neste estudo. Portanto, determinou-se como condições ótimas a utilização de biosensor a 25pM, 400 moléculas de BSA/sensor, quencher a 25pM e meio de diluição (CTAB 3mM; TRIS 10mM; EDTA 1mM).

Após o estabelecimento das condições ótimas, a fim de otimizar o tempo, as amostras e os reagentes disponíveis, preconizou-se avaliar em um primeiro momento uma parte das 308 amostras dos felinos. Dessa maneira, foram avaliadas 50 amostras das diferentes populações de gatos (36/36 BHG; 0/59 GP; 14/213) e 5 amostras de soro pré-COVID19 dos gatos (5/40), conforme especificado na Tabela 3.

Tabela 3 – Quantidade e origem das amostras de soro de gatos testadas na PPB.

Espécie	Tutores positivos para COVID19	Parque Municipal de BH	Hospital Veterinário da UFMG	Pré-COVID19
Gatos	36/36	Não se aplica	14/213	5/40

4.4.5 Definição dos parâmetros para a classificação das amostras na PPB

Após a leitura das amostras no EPEL, foi feita a análise dos resultados gráficos das leituras nos programas KaleidaGraph® e Jupyter®. Em seguida, analisou-se 12 informações de

cada soro sobre o comportamento da curva-resposta média e selecionou-se 5 parâmetros para a classificação das amostras - α_{20} , δ_{20} , T20, T30, T40 - de maneira que o conjunto desses parâmetros fosse utilizado como *cutoff* do modelo de mistura gaussiana.

Com relação aos fatores selecionados na curva-padrão média para classificar as amostras, α_{20} diz respeito à cinética inicial da ligação entre os nanosensores e os anticorpos específicos durante a adição do volume de soro de 0 à 20uL; já δ_{20} corresponde a interpretação da cinética final de ligação quando há adição do volume de 20 à 40uL de soro; T20, T30 e T40 correspondem às alterações de tau nos volumes 20uL, 30uL e 40uL, respectivamente. A unidade tau caracteriza o comprimento na lateral dos nanosensores, que é alterado quando os anticorpos se ligam a eles. Para amostras positivas, espera-se um aumento entre 12-15 nm em cada extremidade do nanosensor e estabilização do valor de tau após ligações específicas com o anticorpo IgG, o qual possui tamanho aproximado de 150 kDa, enquanto em amostras negativas não ocorre estabilização do valor de tau que extrapola os valores do tamanho de IgG, pois na ausência de anticorpos específicos outras proteínas que estão em grande quantidade no soro, como a albumina por exemplo, ligam-se de forma inespecífica aos nanosensores.

4.5 Pesquisa de retrovíroses felinas

A avaliação da possível associação entre importantes retrovírus felinos, vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV) e SARS-CoV-2 foi realizada em um total de 215 das 308 amostras de felinos, no Laboratório de Retrovíroses da Escola de Veterinária da UFMG (Retrolab/UFMG). Pesquisou-se por técnicas de biologia molecular a presença do DNA proviral para FIV e FeLV em amostras de sangue de 36 gatos domiciliados com tutores positivos para COVID19 e 59 gatos comunitários do Parque Municipal de Belo Horizonte. A fim de definir o status sorológico para as retrovíroses nos gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFMG, avaliou-se 120 amostras de soro por meio de teste rápido imunocromatográfico (Combo Vet Fast FIV Ac/FeLV Ag da Bioclin[®]). Não foi possível a realização de ambos os testes, molecular e imunocromatográfico, em todos os 308 gatos avaliados no estudo em detrimento da limitação de reagentes e amostras.

4.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada por meio do kit comercial GenElute™ Blood Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich®), conforme orientações do fabricante. O DNA eluído foi armazenado a -20°C até realização das PCRs para a pesquisa de DNA proviral para os retrovírus felinos (FIV e FeLV).

4.5.2 PCR convencional para diagnóstico de FeLV

Para a detecção do DNA proviral do FeLV, utilizou-se a técnica PCR convencional, conforme padronizado por Victor *et al.* (2020), para amplificação um fragmento de 450pb do gene viral *gag*. Desse modo, utilizou-se os *primers* FeLV F (5' - ACTAACCAATCCCCACGC - 3') e FeLV R (5' - ATGGCTGTCCCACTAGAG - 3') com os seguintes ciclos: 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 59°C por 1min, 72°C por 1 min e extensão final de 72°C por 5 min. Os reagentes foram utilizados nas seguintes concentrações: 5µL de 5xGreen GoTaq Flexi Buffer (Promega®), 1,0µL de MgCl₂ (25mM; Promega®), 1,0µL de cada *primer* (10pmol/µL; Invitrogen®), 0,5µL de dNTPs (10 mM; Promega®), 0,2µL de GoTaq Polimerase (5U/µL; Promega®), 14,3 µL de água ultrapura livre de RNase/DNAse e 2 µL de DNA da amostra. DNA extraído de PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*) de um gato infectado positivo para FeLV foi usado como controle positivo e água ultrapura foi utilizada como controle negativo. Os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

4.5.3 Nested PCR para diagnóstico de FIV

Para a detecção do DNA proviral do FIV, utilizou-se a técnica Nested PCR previamente descrita por Hohdatsu *et al.* (1998), com modificações, para amplificação de um fragmento final de 329pb do gene viral *gag*. Dessa maneira, FIV EF (5' - AATATGACTGTATCTACTGC - 3') e FIV ER (5' - TTTTCTAGAGTACTTTCTGG - 3') foram utilizados como *primers* externos sob as seguintes condições: 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 52°C por 30 s, 72°C por 40 s, e extensão final de 72°C por 7 min. Nas mesmas condições de amplificação, realizou-se a Nested PCR usando FIV IF (5' - TATTCAAACAGTAAATGGAG - 3') e FIV IR (5' CTGCTTGTTGTTCTTGAGTT 3') como *primers* internos e 2µL de produto de PCR da primeira reação. Para primeira reação, utilizou-se 2 µL de DNA da amostra. Os reagentes foram utilizados nas seguintes concentrações: 5µL de 5xGreen GoTaq Flexi Buffer (Promega®), 1,5µL de MgCl₂ (25mM; Promega®), 1,3µL de cada *primer* (10pmol/µL; Invitrogen®), 0,5µL de

dNTPs (10 mM; Promega[®]), 0,25µL de GoTaq Polimerase (5U/µL; Promega[®]), 13,15 µL de água ultrapura livre de RNase/DNase. DNA extraído de PBMC de um gato naturalmente infectado e positivo para FIV foi usado como controle positivo e água ultrapura foi utilizada como controle negativo. Os volumes dos reagentes e o ciclo de amplificação para as reações externa e interna foram iguais, variando apenas os *primers* adicionados. Os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

4.5.4 Sorologia para FIV e FeLV

A determinação qualitativa de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e de antígeno do vírus da leucemia felina (FeLV) foi realizada por meio do teste rápido Combo Vet Fast FIV Ac/FelV Ag da Bioclin[®], conforme orientações do fabricante, em 120 amostras de soro de felinos atendidos no Hospital Veterinário da UFMG.

4.6 Análise estatística

Para as análises dos resultados utilizou-se o programa de estatística Stata 16.0. Desse modo, o teste Kappa foi utilizado para avaliar a concordância entre os resultados dos dois ELISAs, enquanto o teste qui-quadrado de Pearson (χ^2) foi utilizado para avaliar as possíveis divergências entre as frequências esperadas e observadas entre os diferentes grupos de cães e gatos quanto a exposição ao SARS-CoV-2, bem como a possível associação entre idade e gênero dos animais e a positividade para SARS-CoV-2.

Para a avaliação da possível associação entre a ocorrência de retrovírus felinos (FIV e FeLV) e SARS-CoV-2 na população de gatos domiciliados com tutores positivos e gatos errantes do Parque Municipal de Belo Horizonte, bem como qual espécie animal, cão ou gato, teria maior chance de positivar para SARS-CoV-2, foi utilizado o teste de regressão logística.

5. RESULTADOS.

5.1 Características clínico-epidemiológicas dos animais domiciliados com tutores positivos para COVID-19

Foi observada uma distribuição similar entre o sexo dos animais avaliados no estudo. Cerca de 54% (26/48) dos cães eram fêmeas e 46% (22/48) eram machos, enquanto 50% (18/36) dos gatos eram machos e 50% (18/36) eram fêmeas. A maioria dos cães 47,9% (23/48) era sem raça definida (SRD) e todos os 36 gatos eram SRD. A faixa etária dos animais variou de 6 meses a 16 anos, sendo mais frequente os cães com mais de 6 anos - 47,9% (23/48), e os gatos com idade entre 1 a 3 anos - 38,9% (14/36). No geral, a maioria dos animais avaliados (39,3%, 33/84) possuía mais de 6 anos de vida. Com relação à castração, 70,8% (34/48) dos cães e 100% dos gatos eram castrados.

A vacinação observada nos caninos foi de 64,6% (31/48) para vacina polivalente, 89,6% (43/48) para vacina antirrábica, 25% (12/48) para Leishmaniose e 8,3% (4/48) foram vacinados para outras vacinas. Quanto aos felinos, 83,3% (30/36) eram vacinados com polivalente e 80,5% (29/36) com antirrábica. Com relação à vermifugação, 87,5% (42/48) dos cães e 83,3% (30/36) dos gatos estavam com a vermifugação em dia.

O hábito de levar ao veterinário foi observado em 77% (37/48) dos cães, enquanto nos gatos observou-se uma frequência de 91,7% (33/36). O tipo de alimentação mais observado dentre os animais foi a ração, somente 7 cães (14,6%) e 1 gato (2,8%) eram alimentados com comida caseira.

Durante a anamnese, foram relatados pelos tutores 7 cães (14,6%) com hiporexia, 1 com polifagia (2%), 4 (8,3%) com polidipsia, 2 (4,2%) com poliúria, 2 (4,2%) com fezes diarreicas, 2 (4,2%) com fezes ressecadas e 3 (6,25%) com histórico de êmese. Já com relação aos gatos foram relatadas as seguintes alterações: 2 gatos (5,6%) com polifagia, 1 (2,8%) com fezes diarreicas e 2 (5,6%) com histórico de êmese.

Quanto às outras condições de saúde dos cães (n=48), 8 possuíam doenças infecciosas (16,7%), sendo doença transmitida por carrapato (n=3), leishmaniose (n=2), sarna (n=1), cistite (n=1) e cinomose (n=1); outros 15 cães (31,25%) possuíam doenças não-infecciosas, sendo catarata (n=2), cardiopatia (n=2), alergia alimentar (n=1), bronquite (n=1), dermatite (n=3), doença renal (n=2), colapso de traquéia (n=1), doença periodontal (n=2), luxação patelar (n=1).

Dentre os felinos (n=36), 4 (11,1%) apresentavam doenças infecciosas, sendo FIV (n=1), FeLV (n=3), esporotricose (n=1), micoplasmose (n=1) e apenas dois (5,6%) apresentavam doença não-infecciosa, sendo asma (n=1) e complexo granuloma eosinofílico (n=1).

Durante o exame físico, observou-se que 16,7% (8/48) dos cães e 11,1% (4/36) felinos apresentaram sobrepeso (escore corporal $\frac{4}{5}$). Não houve alterações importantes de temperatura nos animais avaliados. Somente 4,7% dos cães (2/48) e 2,8% dos gatos (1/36) apresentaram mucosas hipocoradas. Com relação à ausculta cardíaca, dois cães (4,16%) apresentaram leve taquicardia e nenhum gato apresentou qualquer alteração cardíaca. Na ausculta pulmonar nenhum animal apresentou alteração, mas 4,7% dos cães (2/48) apresentaram o reflexo de tosse positivo. Durante a inspeção de boca, os achados mais comuns em cães foram doença periodontal (5/48;10,4%) e tártaro (5/48;10,4%), enquanto somente um gato (1/36; 2,8%) apresentou úlcera no lábio superior.

No total, foram entrevistados 55 tutores, 83,6% (46/55) mulheres e 16,4% (9/55) homens. O tipo de residência mais frequentemente observada para os cães (n=48) foi casa (66,7%; 32/48), enquanto que para os gatos (n=36) foi apartamento (55,6%; 20/36).

5.2 Condições ótimas para o ELISA

As condições ótimas para os ELISAs foram definidas como: 100ng/100uL/poço dos antígenos N ou S-RBD diluídos em tampão carbonato/bicarbonato (50mM pH 9,0) em placas de 96 poços Nunc-Immuno Plate Maxisorp (Thermo Scientific). Seguida de incubação *overnight* a 4°C e bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente (TA) com solução salina tamponada com fosfato pH 7,0 (PBS) contendo Tween-20 a 0,01% (PBS-Tween), acrescida de 5% de leite em pó desnatado.

Os soros de ambas as espécies foram diluídos 1:50 em PBST acrescido de 1% de leite em pó desnatado (PBSTL1%), em duplicata, e foram incubados por uma hora em TA. Foi adicionado 100µL/poço de conjugado diluído a 1:10.000 em PBSTL 1%, seguido de incubação por uma hora a TA, sendo utilizado o Anti-Cat IgG (Fc *specific*) – Anticorpo Peroxidase produzido em cabra (Sigma-Aldrich) para as amostras de gatos e a Proteína A–Peroxidase de *Staphylococcus aureus/horseradish* para amostras de cães.

O ponto de corte foi estabelecido em:

- ELISA-RBD: 0,275 para cães e 0,649 para gatos
- ELISA-N: 0,321 para cães e 1,136 para gatos

5.3 Ocorrência de SARS-CoV-2 em cães e gatos no município de Belo Horizonte, MG.

Após o desenvolvimento dos ELISAs, foram realizadas as análises sorológicas das amostras de soro para avaliar a ocorrência de SARS-CoV-2 em diferentes grupos de cães e gatos no município de Belo Horizonte, MG. Considerou-se animal positivo, para a presença de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2, aqueles positivos nos ELISA-N e/ou ELISA-RBD.

A ocorrência geral de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2 em gatos foi de 16,88% (52/308; IC: 12,87% – 21,54 %). A frequência de animais positivos por grupo foi 16,67% (6/36) para gatos domiciliados com tutores positivos para COVID19 (BHG); 23,73% (14/59) para gatos do Parque Municipal (GP) e 15,02% (32/213) para gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFMG (HVG). Não houve significância estatística na diferença de ocorrência de SARS-CoV-2 entre os grupos de gatos ($\chi^2 = 2,4965$; $p = 0,287$) (Quadro 2).

Quadro 2 - Ocorrência de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2 em gatos no município de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Resultado ELISA/ Grupo	BHG	GP	HVG
Negativo	83,33% (30/36)	72,27% (45/59)	84,98% (181/213)
Positivo	16,67% (6/36)	23,73% (14/59)	15,02% (32/213)

BHG: gatos domiciliados com tutores positivos para COVID19; GP: gatos do Parque Municipal (GP) e HVG: gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFMG.

Com relação aos cães, a ocorrência geral de anticorpos IgG contra proteínas específicas de SARS-CoV-2 foi de 5% (13/260; IC 95%: 2,91% a 8,44%). A soropositividade observada por grupo foi 6,25% (3/48) para cães domiciliados com tutores positivos para COVID19 (BHC)

e 4,72% (10/212) para cães atendidos pelo Hospital Veterinário da UFMG (HVC). Não houve significância estatística na diferença de ocorrência de SARS-CoV-2 entre os grupos de cães ($\chi^2 = 0,1936$; $p = 0,66$) (Quadro 3).

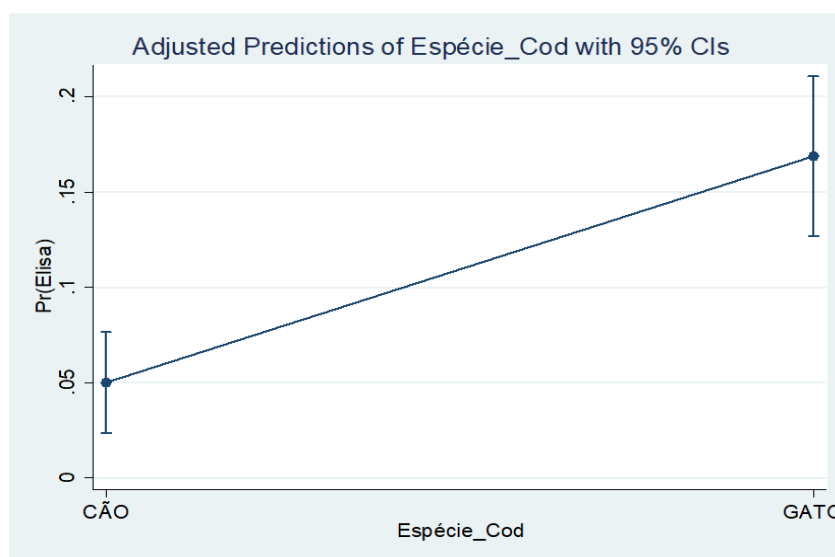
Quadro 3 - Ocorrência de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2 em cães no município de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Resultado / Grupo	BHC	HVC
Negativo	93,75% (45/48)	95,28% (202/212)
Positivo	6,25% (3/48)	4,72% (10/212)

BHC: cães domiciliados com tutores positivos para COVID19; HVC: cães atendidos pelo Hospital Veterinário da UFMG.

Através da análise de regressão logística, buscou-se avaliar qual espécie seria mais provável testar positivo para SARS-CoV-2. Ao analisar 568 resultados de cães e gatos no ELISA, observou-se que os gatos apresentaram 3,85 vezes mais chance (IC 95%: 2,05 a 7,26) de positivar para SARS-CoV-2 que os cães, como é possível observar no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Chance de ocorrência de SARS-CoV-2 em cães e gatos.



5.4 Concordância entre os ELISAs

Utilizou-se o teste Kappa para avaliar a concordância entre todos os resultados observados no ELISA-RBD e ELISA-N (n=568). Dessa maneira, observou-se uma concordância razoável de 90,32% entre os testes e um kappa de 0,21, como pode-se observar no Quadro 4.

Quadro 4 - Concordância entre os testes ELISA-RBD e ELISA-N.

ELISA-RBD \ ELISA-N	Negativo	Positivo	Total
Negativo	503	17	520
Positivo	38	10	48
Total	541	27	568

Concordância	Kappa	Erro padrão	z	Prob > z
90,32%	0,2192	0,0401	5,47	0,0000

Ao analisar o desempenho individual de cada ELISA por espécie, observou-se uma maior frequência de animais positivos no ELISA-RBD quando comparado ao ELISA-N (Quadro 5).

Quadro 5 - Positividade dos testes ELISA-N e ELISA-RBD por espécie animal.

Teste \ Espécie	Cães	Gatos
ELISA-N	2,3% (7/260)	6,5% (20/308)
ELISA-RBD	2,7% (8/260)	13% (40/308)
ELISA-N e ELISA-RBD	0,7% (2/260)	2,9% (9/308)

Quadro 6 - Positividade dos testes ELISA-N e ELISA-RBD por grupo animal de acordo com a origem.

Teste Grupo	ELISA-N	ELISA-RBD
BHC	2% (1/48)	6,25% (3/48)
HVC	3,3% (7/212)	2,4% (5/212)
BHG	11% (4/36)	11% (4/36)
HVG	4% (9/213)	12% (26/213)
GP	12% (7/59)	17% (10/59)

BHC: cães domiciliados com tutores positivos para COVID19; HVC: cães atendidos pelo Hospital Veterinário da UFMG; BHG: gatos domiciliados com tutores positivos para COVID19; HVG: gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFMG e GP: gatos do Parque Municipal (GP).

5.5 Comparação entre as técnicas ELISA-N e PPB-N

Ao comparar os resultados dos gatos domiciliados com tutores positivos para COVID-19 (n=36) obtidos no ELISA-N e na Plataforma Portátil de Biodiagnóstico, também utilizando a proteína do nucleocapsídeo de SARS-CoV-2 (PPB-N), observou-se maior sensibilidade relativa da PPB-N em comparação ao ELISA-N (Quadro 7). Cerca de 52,8% (19/36) dos gatos positivaram para a presença de anticorpos IgG contra a proteína N de SARS-CoV-2 na PPB-N, enquanto a soropositividade no ELISA-N foi de somente 11,1% (4/36).

Quadro 7 - Resultados ELISA-N e PPB-N para gatos domiciliados com tutores positivos para COVID19.

Técnica Resultado	ELISA-N	PPB-N
Positivo	11,1% (4/36)	52,8% (19/36)
Negativo	88,9% (32/36)	33,3% (12/36)
E	0	2,8% (1/36)
ND	0	11,1% (4/36)

E: amostra excluída da análise estatística feita pelo filtro Zscore. ND: Não determinado, não foi possível determinar se a amostra era positiva ou negativa.

5.6 Retrovíroses felinas e SARS-CoV-2

A ocorrência de importantes retrovírus felinos, FIV e FeLV, foi avaliada nas populações de gatos domiciliados com tutores positivos para COVID-19, gatos comunitários do Parque Municipal de Belo Horizonte e gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFMG, em Belo Horizonte, MG. Verificou-se que para todas as populações felinas avaliadas, FeLV foi o retrovírus mais comumente encontrado. Além disso, nenhum gato comunitário apresentou resultado positivo na PCR para FIV (Quadro 8).

Quadro 8 - Ocorrência de FIV e FeLV em diferentes populações felinas do município de Belo Horizonte, MG.

Grupo Retrovírus	BHG	GP	HVG	Ocorrência geral nas populações
FIV	8,3% (3/36)	0% (0/59)	0,83% (1/120)	1,86% (4/215)
FeLV	13,9% (5/36)	15,3% (9/59)	8,33% (10/120)	11,16% (24/215)

Ao analisar os resultados para FIV e FeLV (PCRs e Teste rápido), bem como para SARS-CoV-2 (ELISAs) das populações felinas (n=215), não se observou associação entre os retrovírus felinos (FIV $p = 0,11$ e FeLV $p = 0,36$), e para qualquer retrovírus (FIV e/ou FeLV $p = 0,99$) e o novo coronavírus por meio de regressão logística univariada.

Ademais, somente 2,32% (5/215) dos felinos avaliados apresentaram coinfeção entre retrovírus e SARS-CoV-2. Sendo, dois gatos de tutores positivos para COVID19 coinfectados com FIV e SARS-CoV-2; dois gatos do parque municipal coinfectados com FeLV e SARS-CoV-2 e um gato atendido no Hospital Veterinário coinfectado com FeLV e SARS-CoV-2.

5.7 Relação entre sexo, idade dos animais e SARS-CoV-2

Não foi encontrada associação entre sexo e idade dos animais com positividade para SARS-CoV-2, tanto na avaliação feita em conjunto (cão e gato), quanto em separado por espécie, como demonstrado nos quadros 9 a 13.

Quadro 9 - Ocorrência de SARS-CoV-2 por faixa etária de cães (BHC) e gatos (BHG).

Resultado ELISA SARS-CoV-2	menos de 1 ano	1 a 3 anos	3 a 6 anos	mais de 6 anos
Negativo	4	24	16	31
Positivo	1	5	0	2

($\chi^2 = 4,7327$; $p = 0,192$)

Quadro 10 - Ocorrência de SARS-CoV-2 por faixa etária gatos (BHG).

Resultado ELISA SARS-CoV-2	menos de 1 ano	1 a 3 anos	3 a 6 anos	mais de 6 anos
Negativo	3	11	7	9
Positivo	1	3	0	1

($\chi^2 = 2,2750$; $p = 0,517$)

Quadro 11 - Ocorrência de SARS-CoV-2 por faixa etária em cães (BHC).

Resultado ELISA SARS-CoV-2	menos de 1 ano	1 a 3 anos	3 a 6 anos	mais de 6 anos
Negativo	1	13	9	22
Positivo	0	2	0	1

($\chi^2 = 2,0931$; $p = 0,553$)

Quadro 12 - Ocorrência de SARS-CoV-2 por gênero em gatos (BHG).

Resultado ELISA SARS-CoV-2	Fêmea	Macho
Negativo	14	16
Positivo	4	2

($\chi^2 = 0,80$; $p = 0,371$)

Quadro 13 - Ocorrência de SARS-CoV-2 por gênero em cães (BHC).

Resultado ELISA SARS-CoV-2	Fêmea	Macho
Negativo	23	22
Positivo	3	0

($\chi^2 = 2,70$; $p = 0,1$)

5.8 Manifestação clínica nos animais soropositivos

Nenhum animal (cães e gatos) soropositivo no ELISA apresentou sinal clínico sugestivo de COVID19, tal como febre, alteração respiratória ou gastrointestinal durante anamnese e exame físico feito nas coletas.

6. DISCUSSÃO.

Durante a pandemia não houve no Brasil um programa oficial de vigilância de COVID-19 para as espécies animais do país. Nesse sentido, centros de investigação e universidades tiveram papel importante no desenvolvimento de projetos de estudo sobre a suscetibilidade de animais domésticos e silvestres ao SARS-CoV-2.

O presente estudo permitiu investigar a exposição de pets no município de Belo Horizonte de fevereiro de 2021 a agosto de 2022, momento em que a cidade atingiu o marco de mais de 360 mil casos humanos confirmados de COVID-19 (SES-MG, 2023). No total, 308 gatos e 260 cães foram avaliados nesse período quanto à presença de anticorpos IgG anti-RBD e anti-N de SARS-CoV-2 por meio de ELISA indireto. As amostras foram agrupadas em grupos distintos de acordo com a origem dos animais (animais pré-pandemia; animais domiciliados com pessoas positivas para COVID-19; animais errantes; animais atendidos no Hospital Veterinário da UFMG e oriundos da população em geral), permitindo maior alcance dentro da população pet do município.

As informações apresentadas sugerem que cães e gatos domiciliados, bem como gatos de rua foram expostos ao SARS-CoV-2 em Belo Horizonte durante a pandemia de COVID-19, corroborando com outros estudos que também avaliaram a exposição de pets domiciliados (Brown, 2020; Bryner, 2020; Newman *et al.* 2020; Segáles *et al.*, 2020; Sit *et al.*, 2020) e gatos errantes (Dias *et al.*, 2021; Villanueva-Saz *et al.*, 2022; Zhang, Q. *et al.*, 2020) ao SARS-CoV-2.

A frequência de exposição dos pets ao SARS-CoV-2 ao longo da pandemia de COVID-19 foi distinta entre os estudos, sobretudo devido a algumas diferenças como técnica utilizada, região geográfica de estudo, tamanho amostral ou momento da pandemia no qual ocorreu a coleta de amostras. No presente estudo feito em Belo Horizonte, a ocorrência geral de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2, foi de 16,88% (52/308) em gatos e 5% (13/260) em cães, similar à frequência encontrada em estudos realizados em outros países que também utilizaram a técnica ELISA, tal como Polônia (gato: 18,9% - 46/243; cão: 16% - 62/388) (Kaczorek-Łukowska, 2022), Estados Unidos da América (gato: 18% - 37/204; cão: 11,6% - 23/198) (Murphy *et al.*, 2022) e Portugal (gato: 21,74% - 15/69; cão 4,73% - 7/148) (Barroso *et al.*, 2022).

Em contraste, observou-se uma menor exposição de cães e gatos ao agente causador da COVID-19 em estudos com maior tamanho amostral feitos na China (gato: 0,015% - 2/13397; cão: 0,014% - 1/7159) (Wang *et al.*, 2022), na Tailândia (gato: 0,36% - 4/1112; cão: 1,66% - 35/2103) (Udom *et al.*, 2022) e no Japão (gato: 0,20% - 4/1969) (Imanishi *et al.*, 2022).

Apesar dos estudos supracitados utilizarem a mesma técnica sorológica, o tamanho amostral e as proteínas-alvo do patógeno utilizados foram distintos. Além disso, alguns dos estudos analisaram de forma individual a performance dos ELISAs baseados em somente um antígeno do SARS-CoV-2, tais como o antígeno N ou S-RBD.

Usualmente, a detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2 em cães e gatos, por meio da técnica ELISA, baseia-se em diferentes tipos de antígenos virais, tais como S, N ou S-RBD (Dileepan *et al.*, 2021; Goletic *et al.*, 2022; Zhao, S., *et al.*, 2021). Sendo, portanto, a falta de consenso entre qual o melhor antígeno para estudos sorológicos nessas espécies, uma possível explicação para as diferenças encontradas entre os resultados em diferentes países.

Em geral, estudos em humanos demonstram que os ELISAs que utilizam o antígeno S-RBD apresentam maior especificidade em comparação aos que utilizam a proteína N (Chia *et al.*, 2020; Klumpp-Thomas *et al.*, 2020). Sugere-se que isso ocorra porque o S-RBD é pouco conservado entre os diferentes coronavírus, enquanto a proteína N é similar entre os vírus pertencentes à família *Coronaviridae* (Chia *et al.*, 2020; Premkumar *et al.*, 2020). Logo, em estudos no qual busca-se maior especificidade em detrimento da sensibilidade pode-se utilizar o ELISA-RBD ao invés de ELISA-N, e vice-versa. Em nosso estudo optamos por desenvolver ambos de forma separada, buscando avaliar o desempenho de cada ELISA.

Diferentemente, Dileepan e colaboradores encontraram maior detecção de amostras soropositivas utilizando o ELISA-N comparado ao ELISA-RBD (Dileepan *et al.*, 2021), enquanto em nossas investigações, observamos uma maior detecção de animais soropositivos no ELISA-RBD quando comparado ao ELISA-N. Essa diferença encontrada pode estar relacionada a localização das proteínas N e S-RBD no vírus. A posição mais externa do antígeno S-RBD em relação a proteína N pode resultar em uma resposta de anticorpos direcionada contra ele mais rápida e robusta.

Cita-se como outra possível explicação para as diferenças encontradas as características inerentes do antígeno utilizado. Por exemplo, já foi demonstrado que ELISAs

baseados em antígenos N associados ao RNA apresentam menor sensibilidade na detecção de animais soropositivos que aqueles que fazem o uso do antígeno N em sua forma livre de RNA (Di *et al.*, 2021). Apesar dessas diferenças, ambas formas dos antígenos recombinantes podem ser utilizados para a detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2 em cães e gatos.

De maneira similar, em nosso estudo também observamos diferenças substanciais entre os resultados das técnicas PPB e ELISA que utilizaram o antígeno N para detectar anticorpos contra SARS-CoV-2 no soro de 36 gatos que viviam com tutores positivos para COVID-19. Ao utilizar a PPB-N detectamos uma ocorrência de anticorpos IgG anti-N (52,8%, 19/36) consideravelmente maior que a detectada pelo ELISA-N (11,1%, 4/36). Apesar da discordância esperada entre resultados de técnicas diferentes, foi inesperado uma discordância substancial, já que ambas as técnicas foram desenvolvidas para detectar anticorpos contra a proteína N do SARS-CoV-2.

Uma possível explicação para a discordância dos resultados encontrados nas duas técnicas é a utilização de antígenos N recombinantes diferentes, como demonstrado nos anexos 7 e 8. Ambos antígenos possuem origem distinta e foram utilizados previamente no desenvolvimento e validação de ELISAs para o diagnóstico de COVID-19 em humanos no Brasil e nos Estados Unidos da América (Bagno *et al.*, 2022; Phan *et al.*, 2021). Portanto, a PPB-N utilizou um antígeno N, de origem brasileira, em sua forma completa com cerca de 48 kDa, enquanto o ELISA utilizou a porção terminal da proteína N (N-terminal, região de domínio de ligação de RNA) com tamanho de 16,62 kDa e de origem americana.

Durante o processo de validação do ELISA para teste de amostras humanas nos Estados Unidos, Phan e colaboradores, em 2021, avaliaram um painel de proteínas recombinantes, incluindo as proteínas N em sua forma completa, N-terminal e S-RBD. Nesse estudo, os pesquisadores observaram que o ELISA baseado na proteína S-RBD obteve melhor sensibilidade (92%; n= 72/78) seguido pelo ELISA que utilizou a proteína N-terminal (87%; n=68/78) (Phan *et al.*, 2021). Em contraste, o ELISA que utilizou a proteína N completa resultou em respostas pouco específicas. Sendo, por esse motivo, os antígenos S-RBD e N-terminal sugeridos como melhores candidatos para o diagnóstico sorológico específico para SARS-CoV-2.

Semelhantemente, a PPB-N desenvolvida por nós utilizando a proteína N completa apresentou respostas pouco específicas em comparação aos resultados obtidos pelo nosso ELISA baseado na proteína N-terminal. Já que aproximadamente 52,8% (19/36) dos gatos avaliados positivaram para a presença de anticorpos IgG contra a proteína N de SARS-CoV-2 na PPB-N, enquanto 11,1% (4/36) soropositivaram no ELISA-N.

Apesar das diferenças encontradas nos resultados das duas técnicas, observamos que a PPB apresenta algumas vantagens em potencial em relação ao ELISA, tais como: a rapidez, por ser uma técnica semi-automatizada; o baixo custo, devido a utilização de menor volume de reagentes e amostras; e sua versatilidade, por ser uma técnica que pode ser utilizada fora de um ambiente de laboratório.

Entretanto, alguns pontos da técnica podem ser aprimorados, tal como sua especificidade. Possivelmente a ocorrência de ligações inespecíficas com outras proteínas presentes no soro dos animais, como a albumina, estaria reduzindo a especificidade da técnica. A fim de abordar essa limitação da técnica algumas mudanças são necessárias.

Uma possível abordagem para melhorar a especificidade da PPB é a adição de uma etapa pré-analítica para remover potenciais ligantes inespecíficos antes da leitura da amostra. De maneira similar à etapa de incubação das amostras no ELISA, sugere-se testar diferentes concentrações de um agente de bloqueio, por exemplo a soro albumina bovina (BSA), juntamente com as amostras para reduzir possíveis ligações inespecíficas com outras proteínas presentes no soro antes de proceder a leitura das amostras no EPEL.

A funcionalização dos nanobastões com os antígenos N-Nterm e S-RBD recombinantes utilizados nos ELISAs aqui desenvolvidos poderia auxiliar com mais informações na escolha do melhor antígeno para ser utilizado na técnica.

A reação cruzada de SARS-CoV-2 com outras coronavírus de cães e gatos foi pouco investigada até o momento, mas é possível que a ocorrência dessas reações seja pouco provável, já que os respectivos vírus pertencem a gêneros diferentes (Alphacoronavírus e Betacoronavirus). Nesse sentido, alguns estudos já demonstraram ausência ou pouca reação cruzada de SARS-CoV-2 com outros Coronavírus presentes nesses animais (Laidoudi *et al.*, 2021; Zhang, Q. *et al.*, 2020). Contudo, não foi possível descartar em nosso estudo a ocorrência de reações cruzadas nos ELISAs ou na PPB. Logo, uma etapa futura para avaliar a reatividade

cruzada de SARS-CoV-2 com amostras positivas para outras coronavírus comuns em cães e gatos é necessária para abordar melhor a especificidade das técnicas.

Ao avaliar as diferenças de exposição entre as espécies quanto a sua origem e estilo de vida, o qual poderiam impactar na menor ou maior exposição do animal ao patógeno, observou-se que não houve significância estatística na diferença de ocorrência de SARS-CoV-2 entre nenhum dos grupos analisados: animais que viviam em contato próximo com paciente humano diagnosticado para COVID-19; animais de rua; animais domiciliados pertencentes à população em geral, independente do status para COVID-19 dos tutores (animais atendidos no Hospital Veterinário).

Em nosso estudo, não foi encontrada associação entre cães/gatos que habitam com ao menos um tutor diagnosticado para COVID-19 e maior risco de exposição ao SARS-CoV-2, corroborando com estudo realizado na França com tamanho amostral semelhante ao nosso (Bessièrre *et al.*, 2022). Em contraste, estudo realizado por Patterson *et al.* (2020), com tamanho amostral maior que o nosso, encontrou significância estatística nessa associação. Desse modo, essa possível associação não pode ser completamente descartada e são necessários outros estudos com maior tamanho amostral para apoiar ou descartar uma diferença estatisticamente significativa.

Assim como os estudos realizados por Barroso e colaboradores em Portugal, (Barroso *et al.*, 2022), nosso estudo também não encontrou correlação entre soropositividade para SARS-CoV-2 e sexo ($\chi^2 = 0,80$; $p = 0,371$ para gatos e $\chi^2 = 2,70$; $p = 0,1$ para cães) ou idade ($\chi^2 = 4,7327$; $p = 0,192$) entre os animais de ambas as espécies estudadas. Diferentemente, Spada e colaboradores, utilizando ELISA-N, encontraram associação entre soropositividade para SARS-CoV-2 em gatos de 1 a 6 anos e status soropositivo para FeLV em uma população de 215 gatos (Spada *et al.*, 2022).

Ao longo da pandemia de COVID-19, surgiu a preocupação com a possibilidade de agravamento das condições de saúde preexistentes em cães e gatos infectados pelo SARS-CoV-2. Segalés *et al.* 2020, por exemplo, relatou a infecção subclínica por SARS-CoV-2 em um felino doméstico que sofria de cardiomiopatia hipertrófica, trombose e grave edema pulmonar, comorbidades que conduziram o animal à eutanásia. Assim como nesse caso, a hipótese de

piora clínica ocasionada pela COVID-19 em cães e gatos com doenças preexistentes ainda não foi confirmada.

A fim de abordar essa questão, nós avaliamos a associação entre a soropositividade para o agente causador da COVID-19 e importantes retrovírus felinos. Infecções por FIV e FeLV podem ocasionar quadro de imunossupressão nos felinos, tornando-os suscetíveis a infecções secundárias, tal como a COVID-19. Desse modo, foram avaliados no total 215 felinos (36 BHG; 59 GP; 120 HVG) para a presença dessas retrovírus, por meio das técnicas PCR, *nested* PCR e teste rápido Combo Vet Fast FIV Ac/FeLV Ag da Bioclin[®].

A prevalência encontrada para FeLV foi superior (13,9% - 5/36 para BHG; 15,3% - 9/59 para GP; 8,33% - 10/120 para HVG) à encontrada para FIV (8,3% - 3/36 para BHG; 0% - 0/59 para GP; 0,83% - 1/120 para HVG) em todas as populações estudadas. De forma similar, outro estudo realizado na região metropolitana de Belo Horizonte também encontrou maior ocorrência de felinos positivos para FeLV do que para FIV (Alves *et al.*, 2011), com positividade de 6,41% (5/78) para FIV por meio de PCR para o gene *gag* e de 17,95% (14/78) para FeLV por meio de teste rápido (SNAP Combo Plus FIV e FeLV, IDEXX[®]).

Em nosso estudo observamos maior ocorrência de FIV em gatos domiciliados (BHG e HVG) em comparação aos gatos de rua (GP). De maneira similar, estudos prévios realizados em Belo Horizonte e em São Paulo também encontraram maior ocorrência de FIV em gatos domiciliados do que em gatos de rua ou de abrigo (Caxito *et al.*, 2006; Lara *et al.*, 2008).

As diferenças de alvo de identificação das técnicas PCR e Teste imunocromatográfico, bem como suas diferenças de sensibilidade/especificidade diagnóstica e a não utilização de ambas as técnicas para definir o status para os retrovírus felinos nas três populações de estudo (BHG, GP e HVG), podem ter gerado a subestimação dos resultados para os retrovírus felinos apresentados no presente estudo. A associação das técnicas mencionadas poderia contribuir com mais informações para definir o status para FIV e FeLV nos felinos. Todavia, não foi possível a realização de tal associação de técnicas devido à limitação de amostras de sangue/soro de alguns animais e disponibilidade de reagentes.

A soropositividade para SARS-CoV-2 e status positivo, via diagnóstico molecular ou sorológico, para retrovírus felinos (FIV ou FeLV) foram detectados concomitantemente em somente 5 dos 215 gatos avaliados: dois gatos BHG positivos para SARS-CoV-2 e FIV; dois

gatos GP positivos para SARS-CoV-2 e FeLV; um gato HVG positivo para SARS-CoV-2 e FeLV. Assim como Villanueva-Saz *et al.* (2021), nós também não encontramos associação entre gatos soropositivos para o agente causador da COVID-19 e retrovírus felinos.

Gatos de rua são fontes potenciais de patógenos para humanos e outros animais, podendo ainda atuarem como animais sentinelas para a presença de infecções, tal como a COVID-19. A presença de SARS-CoV-2 em gatos de rua já foi relatada em diferentes países. Na Espanha, por exemplo, observou-se que 3,51% (4/114) dos gatos errantes apresentavam anticorpos contra a proteína S-RBD de SARS-CoV-2 no período de janeiro a outubro de 2020 (Villanueva-Saz *et al.*, 2021). Já na China, um estudo demonstrou soropositividade em 14,7% dos gatos de rua avaliados de janeiro a março de 2020 (Zhang *et al.*, 2020).

Em contrapartida, nosso estudo em Belo Horizonte demonstrou que 23,73% (14/59) dos gatos de rua foram soropositivos para a presença de anticorpos contra o SARS-CoV-2. Essas diferenças encontradas entre os estudos supracitados podem ter como possível causa as diferenças no tamanho amostral, bem como a época de coleta das mesmas, refletindo em momentos diferentes da intensidade da circulação do vírus nos países. Além disso, também observou-se diferenças nas técnicas utilizadas e interpretação dos resultados, já que no nosso estudo considerou-se animais soropositivos para as proteínas N e/ou S-RBD, e não somente para a proteína S-RBD como nos outros estudos (Villanueva-Saz *et al.* 2021; Zhang *et al.*, 2020).

Desse modo, ao considerar em nosso estudo somente a proteína S-RBD na detecção de exposição dos felinos de rua observou-se que cerca de 17% (10/59) apresentaram anticorpos anti-RBD, enquanto 12% (7/59) apresentaram anticorpos contra a proteína N de SARS-CoV-2 (Quadro 6). Logo, é possível que os estudos que utilizaram somente um antígeno alvo do vírus subestimaram a exposição dos animais ao SARS-CoV-2.

Baseado na detecção de anticorpos neutralizantes, um estudo anterior feito em 2020 no Rio de Janeiro sugeriu a exposição de cães e gatos de rua ao SARS-CoV-2 durante a pandemia de COVID-19. Neste estudo, dos 96 animais avaliados, somente 14 eram cães e gatos de rua e somente 1 cão e 1 gato apresentaram anticorpos neutralizantes contra o agente causador da COVID-19 (Dias *et al.* 2021). Em nosso estudo foi possível avaliar e demonstrar a exposição ao SARS-CoV-2 em um número maior de gatos errantes (14/59) no município de Belo

Horizonte. Concordando, portanto, com a sugestão prévia de exposição de animais de rua ao vírus durante a pandemia no Brasil.

Embora a rota de infecção de gatos de rua não seja completamente compreendida, especula-se que esses animais adquirem a infecção por meio de contato com humanos positivos para COVID-19, bem como interação com outros gatos ou ambiente contaminado (Dias *et al.* 2021; Zhang *et al.*, 2020).

Apesar de não termos observado uma significância estatística na ocorrência de SARS-CoV-2 entre as diferentes populações felinas avaliadas no estudo, observamos nos números absolutos que houve uma tendência de maior exposição dos gatos do parque municipal (GP: 23,73% - 14/59) ao vírus do que as outras populações felinas que eram domiciliadas (BHG: 16,67% - 6/36 e HVG: 15,02% - 32/213).

Os felinos que vivem livremente no parque municipal de Belo Horizonte são animais comunitários, que rotineiramente compartilham superfícies/objetos e interagem com outros felinos e diferentes pessoas no mesmo ambiente. Em período pandêmico, isso pode ter resultado na maior exposição desses ao SARS-CoV-2 do que aqueles gatos domiciliados que convivem com um número menor de pessoas e outros animais. Desse modo, são necessários mais estudos com maior tamanho amostral para verificar se essa tendência se mantém.

Em geral, a espécie felina apresentou maior soroprevalência (16,88% - 52/308), bem como maior chance de positivar para SARS-CoV-2 (*odds ratio* 3,85; IC 95%: 2,05 a 7,26) quando comparada aos caninos (5% - 13/260). Do mesmo modo, em estudo realizado na França, Bessièrre e colaboradores encontraram maior chance dos gatos soropositivarem em comparação aos cães (*odds ratio* 1,51; IC 95%:0,61-3,84) (Bessièrre *et al.*, 2022). Nossos achados corroboram com estudos anteriores que indicam maior suscetibilidade dos gatos em comparação aos cães (Dileepan *et al.*, 2021; Halfmann *et al.* 2020; Shi *et al.*, 2020).

O presente estudo apresentou algumas limitações como o tamanho amostral, não avaliação da ocorrência de reação cruzada entre SARS-CoV-2 e outros Coronavírus comuns em cães e gatos, ausência de teste referência para classificar controle positivo e negativo, bem como melhor avaliação da performance diagnóstica dos testes desenvolvidos.

Poucos estudos avaliaram a infecção e a exposição dos cães e gatos de rua ou aqueles domiciliados em residência com casos humanos para COVID-19 no Brasil. De acordo com dados oficiais da Pesquisa Nacional de Saúde realizada em 2019, cerca de 46,1% dos domicílios brasileiros possuem cães e 19,3% gatos (IBGE, 2019). Nesse sentido, urge a preocupação que a infecção natural desses animais possa ter implicações potenciais em eventos de transmissão zoonótica durante a pandemia de COVID-19, bem como em futuros surtos associados aos coronavírus.

A possibilidade desses eventos zoonóticos poderia gerar medo na população e resultar em consequências negativas ao bem-estar dos animais, tais como abandono e sacrifício dos mesmos. Logo, estudos como o nosso que auxiliam com informações sobre o impacto na saúde e papel dos animais na pandemia de COVID-19 é uma forma de se evitar a desinformação e orientar a população brasileira a evitar abandono e/ou sacrifício de seus animais de companhia em momentos de crise sanitária.

Apesar das limitações, o presente estudo foi importante não somente para demonstrar a exposição de cães e gatos ao SARS-CoV-2 no Brasil, mas também para auxiliar com informações à comunidade científica e à população em geral sobre o impacto na saúde humana e animal, dinâmica de transmissão e definição de reservatórios potenciais. Além disso, o mesmo também resultou no desenvolvimento de testes diagnósticos baseados em metodologias contemporâneas, como é o caso da PPB que utiliza plataforma nanotecnológica, e específicas para as espécies felinas e caninas, contribuindo para o estudo do impacto da COVID-19 nessas espécies no Brasil.

7. CONCLUSÕES

- Os ELISAs desenvolvidos baseados nas proteínas recombinantes N-Nterm e S-RBD, específicos para cães e gatos, são ferramentas que podem ser utilizadas no monitoramento epidemiológico do SARS-CoV-2 nestas espécies.
- Cães e gatos domiciliados e/ou errantes foram expostos de forma natural ao SARS-CoV-2 durante a pandemia de COVID-19 no Brasil.
- Gatos são mais suscetíveis à infecção natural por SARS-CoV-2 que cães.
- O monitoramento de anticorpos contra SARS-CoV-2 em animais de companhia é útil para entender a extensão da circulação do vírus nos mesmos.
- A abordagem com visão de saúde única é importante para controlar a pandemia de COVID-19, bem como mitigar futuros eventos zoonóticos associados à emergência de novos coronavírus ou novas variantes a partir dos animais.

8. PERSPECTIVAS.

- Analisar amostras para outras doenças e para outros coronavírus nos ELISAs e na PPB.
- Confirmar a positividade das amostras em teste sorológico de referência, tal como o teste de neutralização viral em placas.
- Avaliar a performance do ELISA com os dois antígenos na mesma placa.
- Analisar na PPB-N as amostras de cães com resultado no ELISA-N para SARS-CoV-2.
- Avaliar performance da PPB funcionalizada com os antígenos recombinantes N-NTerm e S-RBD de SARS-CoV-2.
- Adição de etapa pré-analítica com agente de bloqueio para reduzir ligações inespecíficas e melhorar a especificidade da PPB.

REFERÊNCIAS.

ALHAJJ, M., FARHANA, A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. [Updated 2022 Feb 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>

ALMEIDA J.D., TYRRELL, D.A.J. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. **J Gen Virol**. v. 1, n.2, p.175-178. 1967.

ALMEIDA, J. D., BERRY, D. M., CUNNINGHAM, C. H., D. HAMRE, D., HOFSTAD, M. S., MALLUCCI, L., MCINTOSH, K., TYRRELL, D. A. J. Virology: Coronaviruses. **Nature**. v. 220, p. 650. 1968.

ALVES, F., RAJÃO, D.S., DEL PUERTO, H.L., BRAZ, G.F., LEITE, R.C., MAZUR, C., MARTINS, A.S., DOS REIS, J.K.P. Occurrence of Feline Immunodeficiency Virus and Feline Leukemia Virus Infection in Cats. **American J. Animal & Vet. Sci**. v.6, n.3, p. 125-129. 2011.

ANDERSEN, K.G., RAMBAUT, A., LIPKIN, W.I. et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nat Med**. v. 26, p. 450–452. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>

AYDIN S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**. v.72, p. 4-15. 2015. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.

BARROSO-ARÉVALO, S., BARNETO, A., RAMOS, Á. M., RIVERA, B., SÁNCHEZ, R., SÁNCHEZ-MORALES, L., PÉREZ-SANCHO, M., BUENDÍA, A., FERRERAS, E., ORTIZ-MENÉNDEZ, J. C., MORENO, I., SERRES, C., VELA, C., RISALDE, M. Á., DOMÍNGUEZ, L., & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M. Large-scale study on virological and serological prevalence of SARS-CoV-2 in cats and dogs in Spain. **Transboundary and emerging diseases**. v.69, n.4, e759–e774. 2022. <https://doi.org/10.1111/tbed.14366>

BESSIÈRE, P., VERGNE, T., BATTINI, M., BRUN, J., AVERSO, J., JOLY, E., GUÉRIN, J.-L., CADIERGUES, M.-C. SARS-CoV-2 Infection in Companion Animals: Prospective Serological Survey and Risk Factor Analysis in France. **Viruses**. v.14. 2022.

BLAUROCK, C., BREITHAUPT, A., WEBER, S. et al. Compellingly high SARS-CoV-2 susceptibility of Golden Syrian hamsters suggests multiple zoonotic infections of pet hamsters during the COVID-19 pandemic. **Sci Rep** 12, 15069 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19222->

BOSCO-LAUTH AM, HARTWIG AE, PORTER SM, 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**. v.117, p.26382–26388. 2020.

BOILEAU MJ, KAPIL S. Bovine coronavirus associated syndromes. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**. 26:123–46, 2010 doi: 10.1016/j.cvfa.2009.10.003

BRASIL, 2015. Resolução - RDC nº 36, de 26 de agosto de 2015. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/32421597/doi-2015-08-27-resolucao-rdc-n-36-de-26-de-agosto-de-2015-32421440 Acesso em: 21 Out 2021

BROWN, L. First known cat infected with coronavirus reported in Belgium. 2020. Disponível em: <<https://nypost.com/2020/03/27/first-known-cat-infected-with-coronavirus-reported-in-belgium/>>

BRYNER, J. Cat infected with COVID-19 from owner in Belgium. 2020. Available at <https://www.livescience.com/cat-infected-covid-19-from-owner.html>

CALVET, G.A.; PEREIRA, S.A.; OGRZEWALSKA, M.; PAUVOLID-CORRÊA, A.; RESENDE, P.C.; DE TASSINARI, W.S.; DE PINA COSTA, A.; KEIDEL, L.O.; DA ROCHA, A.S.B.; DA SILVA, M.F.B.; 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**. v.16. 2021.

CAO, J.; SUN, T.; GRATAN, K. T. V. Gold nanorod- based localized surface Plasmon resonance biosensors: A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*. v. 195, p. 332 – 351. 2014.

CAXITO, F.A., COELHO, F.M., OLIVEIRA, M.E., RESENDE, M. Feline immunodeficiency virus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil. **Vet. Res. Commun.** v.30, p.953-956. 2006. DOI: 10.1007/s11259-006-3363-8

CDC, 2021. Centers for Disease Control and Prevention. COVID-19-Animal Testing Guidance Updated Oct. 12, 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/animals/animal-testing.html> Acesso em: 21 Out 2021

CEVIK M, KUPPALLI K, KINDRACHUK J, PEIRIS M. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. **BMJ**. v.371, 2020a.

CEVIK, M., TATE, M., LLOYD, O., et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding and infectiousness: a living systematic review and meta-analysis. **Lancet Microbe**. v.20, p.30172-5, 2020b.

CHIA, W. N., TAN, C. W., FOO, R., KANG, A., PENG, Y., SIVALINGAM, V., TIU, C., ONG, X. M., ZHU, F., YOUNG, B. E., CHEN, M. I., TAN, Y. J., LYE, D. C., ANDERSON, D. E., & WANG, L. F. Serological differentiation between COVID-19 and SARS infections. **Emerging Microbes & Infections**, v.9, p.1497– 1505. 2020.

COUTARD, B., VALLE, C., DE LAMBALLERIE, X., CANARD, B., SEIDAH, N.G., AND DECROLY, E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. **Antiviral Res**. 176, 104742, 2020.

CUI, S., LIU, Y., ZHAO, J., PENG, X., LU, G., SHI, W., PAN, Y., ZHANG, D., YANG, P., & WANG, Q. An Updated Review on SARS-CoV-2 Infection in Animals. **Viruses**. v.14, n.7, 1527, 2022.

DAMAS, J. et al. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**. v.117, p.22311–22322, 2020.

DECARON, MARI V, VON REITZENSTEIN M, LUCENTE MS, CIRONE F, ELIA G, et al. A pantropic canine coronavirus genetically related to the prototype isolate CB/05. **Vet Microbiol**. v.159, p.239–44, 2012.

DECARO,N.,GRASSI,A.,LORUSSO,E.,PATTERSON,E.I.,LORUSSO,A.,DESARIO,C.,ANDERSON,E.R.,VASINIOTI,V.,WASTIKA,C.E.,HUGHES,G.L.,VALLERIANI,F.,COLITTI,B.,RICCI,D.,BUONAVOGLIA,D.,ROSATI,S.,CAVALIERE,N.,PALTRINIERI,S.,LAUZI,S.,ELIA,G., BUONAVOGLIA,C. Long-term persistence of neutralizing SARS-CoV-2 antibodies in pets. **Transboundary and Emerging Diseases**. v.69, n.5, p.3073-3076, 2021. <https://doi.org/10.1111/tbed.14308>

DE WIT, J. J. (SJAAK) & COOK, COOK, J.K.A. Spotlight on avian coronaviruses. **Avian Pathology**. v.49, n.4, p.313-316, 2020. DOI: 10.1080/03079457.2020.1761010

DIAS, H.G., RESCK, M.E.B., CALDAS, G.C., RESCK, A.F., DA SILVA, N.V., DOS SANTOS, A.M.V., et al. Neutralizing antibodies for SARS-CoV-2 in stray animals from Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS ONE** v.16, n.3, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248578>

DI, D., DILEEPAN, M., AHMED, S., LIANG, Y., & LY, H. (2021). Recombinant SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein: Expression, Purification, and Its Biochemical Characterization and Utility in Serological Assay Development to Assess Immunological Responses to SARS-CoV-2 Infection. **Pathogens**, v.10, n.8, p.1039, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081039>

DILEEPAN, M., DI, D., HUANG, Q., 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, 2021.

DROSTEN, C. et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. **N Engl J Med**. v.348, n.20, p.1967-76, 2003. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa030747>

DU, L., HE, Y., ZHOU, Y., LIU, S., ZHENG, B. J. & JIANG, S. The spike protein of SARS-CoV-a target for vaccine and therapeutic development. **Nat. Rev. Microbiol**. v.7, p.226–236, 2009.

EMBREGTS,C.,VERSTREPEN,B.,LANGERMANS,J.,BÖSZÖRMÉNYI,K.P.,SIKKEMA,R.S.,DEVRIES,R.D.,HOFFMANN,D.,WERNIKE,K.,SMIT,L.,ZHAO,S.,ROCKX,B.,KOOPMANS,M.,HAAGMANS,B.L.,KUIKEN,T.,&GEURTSVANKESSEL,C.H.Evaluation of a multi-species SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test. **One Health (Amsterdam, Netherlands)**, v.13, n.100313, p.1-8,2021. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100313>

ENGVALL, E., PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**. v.8, p.871–4, 1971.

ENGVALL, E. The ELISA enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem*. v.56, p.319 –20. 2010.

ERLES K, TOOMEY C, BROOKS HW, BROWNLIE J. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. **Virology**. v.310, n.2, p.216–23. 2003. doi: 10.1016/S0042-6822(03)00160-0

FELTEN S, HARTMANN K. Diagnosis of feline infectious peritonitis: a review of the current literature. **Viruses**. v.11, p.1068, 2019. doi: 10.3390/v11111068

FERNANDEZ-BELLON, H.; RODON, J.; FERNANDEZ-BASTIT, L.; ALMAGRO, V.; PADILLA-SOLE, P.; LORCA-ORO, C.; VALLE, R.; ROCA, N.; GRAZIOLI, S.;TROGU, T.;

et al. Monitoring Natural SARS-CoV-2 Infection in Lions (*Panthera leo*) at the Barcelona Zoo: Viral Dynamics and Host Responses. **Viruses**. v.13, p. 1683. 2021.

FLÁVIA F. BAGNO, SARAH A.R. SÉRGIO, MARIA MARTA FIGUEIREDO, LARA C. GODOI, LUIS A.F. ANDRADE, NATÁLIA C. SALAZAR, CAMILA P. SOARES, ANDRESSA AGUIAR, FLÁVIA JAQUELINE ALMEIDA, EDIMILSON D. DA SILVA, ANTÔNIO G.P. FERREIRA, EDISON LUIZ DURIGON, RICARDO T. GAZZINELLI, SANTUZA M.R. TEIXEIRA, ANA PAULA S.M. FERNANDES, FLAVIO G. DA FONSECA **J Clin Virol Plus**. v.2, n.3, 100101. 2022. doi: 10.1016/j.jcvp.2022.100101

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

GAUDREAULT NN, TRUJILLO JD, CAROSSINO M, et al. SARS-CoV-2 infection, disease and transmission in domestic cats. **Emerg Microbes Infect.** v.9,n.1, p.2322–2332. 2020.

GRALINSKI, L. E. & MENACHERY, V. D. Return of the coronavirus: 2019-nCoV. **Viruses**. v.12, n.2, p.135. 2020.

GINER J, VILLANUEVA-SAZ S, TOBAJAS AP, PEREZ MD, GONZALEZ A, VERDE M, et al. SARS-CoV-2 seroprevalence in household domestic ferrets (*Mustela putorius furo*). **Animals (Basel)**. v.11, n.3, 667, p.1-11.2021. doi: 10.3390/ani11030667

GOLETIC, S.; GOLETIC, T.; SOFTIC, A.; ZAHIROVIC, A.; RUKAVINA, D.; KAVAZOVIC, A.; OMERAGIC, J.; UMIHANIC, S.; HUKIC, M. The Evidence of SARS-CoV-2 Human-to-Pets Transmission in Household Settings in Bosnia and Herzegovina. **Front. Genet.**,v.13, artigo 839205.17. 2022.

GORBALENYA, A. E. et al. The species Severe acute respiratory syndrome related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**. v. 5, n. 4, p. 536-544, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z>. Acesso em: 14.10.22.

GORTAZAR C, BARROSO-AREVALO S, FERRERAS-COLINO E, ISLA J. DELA FUENTE G, RIVERA B, et al. Natural SARS-CoV-2 infection in Kept Ferrets, Spain. **Emerg Infect Dis.** v.27, p.1994–6. 2021. doi: 10.3201/eid2707.210096

GRALINSKI, L. E. & MENACHERY, V. D. Return of the coronavirus: 2019-nCoV. **Viruses**. v.12, n.2, 135, p.1-8 . 2020.

GUY JS, BRESLIN JJ, BREUHAUS B, VIVRETTE S, SMITH LG. Characterization of a coronavirus isolated from a diarrheic foal. **J Clin Microbiol.** V.38, p.4523–6. 2000. doi: 10.1128/JCM.38.12.4523-4526.2000

HALFMANN, P.J., HATTA, M.CHIBA, S., et al. Transmission of SARS-CoV-2 in domestic cats. **N Engl J Med.** v.383, n.6, p.592–594. 2020.doi: 10.1056/NEJMc2013400

HAMER, S.A., PAUVOLID-CORRÊA, A., ZECCA, I.B., et al. Natural SARS-CoV-2 infections, including virus isolation, among serially tested cats and dogs in households with

confirmed human COVID-19 cases in Texas, USA. **bioRxiv**. 2020. DOI:<https://doi.org/10.1101/2020.12.08.416339>.

HAMER, S.A., PAUVOLID-CORRÊA, A., ZECCA, I.B., et al. SARS-CoV-2 infections and viral isolations among serially tested cats and dogs in households with infected owners in Texas, USA. **Viruses**. v.13, n.5:938. 2021.

HAMRE, D., PROCKNOW, J.J. A new virus isolated from the human respiratory tract. **Proc Soc Exp Biol Med**. v.121, p.190-193. 1966.

HOHDATSU, T., MOTOKAWA, K., USAMI, M., AMIOKA, M., OKADA, S., KOYAMA, H. Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the gag gene. **J. Virol. Methods**. v. 70, p.107–111. 1998.

HOSIE, M.J.; EPIFANO, I.; HERDER, V.; ORTON, R.J.; STEVENSON, A.; JOHNSON, N.; MACDONALD, E.; DUNBAR, D.; MCDONALD, M.; HOWIE, F.; et al. Respiratory disease in cats associated with human-to-cat transmission of SARS-CoV-2 in the UK. **bioRxiv** .2020.

HORNBECK, P., Enzyme-linked immunosorbent assays. Chapter 2: Unit 2.1. **Curr Protoc Immunol**. 2001. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im0201s01>

HU, B., GUO, H., ZHOU, P. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nat Rev Microbiol** v.19, p.141–154. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.

HUI, K.P.Y., CHEUNG, M.C., PERERA, R.A.P.M, et.al. Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo and in-vitro cultures. **Lancet Respir Med** v.8, p.687-95. 2020. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30193-4 pmid: 32386571

IBGE, 2019. Pesquisa Nacional de Saúde 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pns#Caracter%20C3%ADsticas%20do%20domic%20C3%ADlio%20e%20servi%20C3%A7os%20domiciliares%20de%20sa%20C3%BAde> Acesso em: 21 Out 2021.

ICTV - Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nat. Microbiol**. v.5, p.536–544. 2020.

ICTV - Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Current ICTV Taxonomy Release. Taxon details. EC 53, Online, Julho 2021. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy> Acesso em: 14.10.22.

JEMERŠIĆ, L., LOJKIĆ, I., KREŠIĆ, N., KEROS, T., ZELENKA, T.A., JURINOVIĆ, L., SKOK, D., BATA, I., BORAS, J., HABRUN, B., & BRNIĆ, D. Investigating the presence of SARS CoV-2 in free-living and captive animals. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v.10, n.6, 635. 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060635>

JUNQUEIRA, C.M. 2020. Da micologia clássica à nanotecnologia: aumento da eficiência para detecção de micoses sistêmicas e aplicação de um novo teste rápido e de baixo custo para diagnóstico de criptococose. Dissertação (mestrado em microbiologia). Departamento de

Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

KLAUS, J.; PALIZZOTTO, C.; ZINI, E.; MELI, M.L.; LEO, C.; EGBERINK, H.; ZHAO, S.; HOFMANN-LEHMANN, R. SARS-CoV-2 Infection and Antibody Response in a Symptomatic Cat from Italy with Intestinal B-Cell Lymphoma. **Viruses**. v.13, n.3, 527, p.1-10. 2021. <https://doi.org/10.3390/v13030527>

KLUMPP-THOMAS, C., KALISH, H., DREW, M. *et al.* Standardization of ELISA protocols for serosurveys of the SARS-CoV-2 pandemic using clinical and at-home blood sampling. **Nat Commun** v.12, 113. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20383-x>

LAIODOUDI, Y., SEREME, Y., MEDKOUR, H., WATIER-GRILLOT, S., SCANDOLA, P., GINESTA, J., ANDRÉO, V., LABARDE, C., COMTET, L., POURQUIER, P., RAOULT, D., MARIÉ, J. L., & DAVOUST, B. SARS-CoV-2 antibodies seroprevalence in dogs from France using ELISA and an automated western blotting assay. **One health (Amsterdam, Netherlands)**, v.13, 100293. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100293>

LAMERS, MART M, AND BART L HAAGMANS. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nature reviews. Microbiology**. v. 20, n.5, p. 270-284. 2022.

LARA, V.M., TANIWAKI, S.A., JUNIOR, J.P.A. Occurrence of feline immunodeficiency virus infection in cats. **Cienc. Rural**. 2008. Doi: 10.1590/S0103-84782008000800024

LIU Y, GAYLE AA, WILDER-SMITH A, ROCKLOV J. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. **J Travel Med**. 2020.

LEAN, F. Z. X., NÚÑEZ, A., SPIRO, S., PRIESTNALL, S. L., VREMAN, S., BAILEY, D., JAMES, J., WRIGGLESWORTH, E., SUAREZ-BONNET, A., CONCEICAO, C., THAKUR, N., BYRNE, A. M. P., ACKROYD, S., DELAHAY, R. J., VAN DER POEL, W. H. M., BROWN, I. H., FOOKS, A. R., & BROOKES, S. M. Differential susceptibility of SARS-CoV-2 in animals: Evidence of ACE2 host receptor distribution in companion animals, livestock and wildlife by immunohistochemical characterisation. **Transboundary and emerging diseases**, v.69, n.4, p.2275–2286. 2022. <https://doi.org/10.1111/tbed.14232>

LENZ, O. C., MARQUES, A. D., KELLY, B. J., RODINO, K. G., COLE, S. D., PERERA, R. A. P. M., WEISS, S. R., BUSHMAN, F. D., & LENNON, E. M. SARS-CoV-2 Delta Variant (AY.3) in the Feces of a Domestic Cat. **Viruses**. v.14, n.2, 421. 2022. <https://doi.org/10.3390/v14020421>

LIU Y, GAYLE AA, WILDER-SMITH A, ROCKLOV J. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. **J Travel Med**. v.27, n.2, 2020.

LU, G., WANG, Q., GAO, G.F. Bat-to-human: spike features determining ‘host jump’ of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond. **Trends Microbiol**. v.23, p. 468-478, 2015.

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

- LIU, S. et al. Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. **Lancet**. v.363, p.938–947. 2004.
- LI, F., LI, W., FARZAN, M. & HARRISON, S. C. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. **Science**. v. 309, p.1864–1868, 2005.
- LIU, R., HUAN, H., LIU, F., LV, Z., WU, K., LIU, Y., et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. **Clin Chim Acta**. v. 505, p.172-175. 2020. doi: 10.1016/j.cca.2020.03.009
- MASTERS, P.S., PERLMAN, S. Coronaviridae. In: Knipe DM, Howley PM, eds. **Fields virology**. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, p.825-58. 2013.
- MCALOOSE, D.; LAVERACK, M.; WANG, L.; KILLIAN, M.L.; CASERTA, L.C.; YUAN, F.; MITCHELL, P.K.; QUEEN, K.; MAULDIN, M.R.; CRONK, B.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. 2020.
- MORA-DÍAZ, J.C., PIÑEYRO, P.E., HOUSTON, E., ZIMMERMAN, J., GIMÉNEZ-LIROLA, L.G. Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus: a review. **Front Vet Sci**. v.6, n.53. 2019. doi: 10.3389/fvets.2019.00053
- MEKONNEN, D., MENGIST, H. M., DERBIE, A., NIBRET, E., MUNSHEA, A., HE, H., et al. Diagnostic Accuracy of Serological Tests and Kinetics of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antibody: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Rev. Med. Virol**. v.31, n.3, 2020. doi:10.1002/rmv.2181
- MONTEIL, V., KWON H., PRADO, P., ET AL.. Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2. **Cell**. v.181, p.905-913. 2020. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.004 pmid: 32333836
- NAO, N. et al. Genetic Predisposition To Acquire a Polybasic Cleavage Site for Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Hemagglutinin. **ASM Journals MBio**. v. 8, n.1, e02298-16, 2017.
- NEWMAN, A.; SMITH, D.; GHAI, R.R.; WALLACE, R.M.; TORCHETTI, M.K.; LOIACONO, C.; MURRELL, L.S.; CARPENTER, A.; MOTOFF, S.; ROONEY, J.A.; et al. First reported cases of SARS-CoV-2 infection in companion animals—New York, March–April 2020. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v.69, p.710–713. 2020.
- OUDE MUNNINK BB, SIKKEMA RS, NIEUWENHUIJSE DF, MOLENAAR RJ, MUNGER E, MOLENKAMP R, et al. Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans. **Science**. v.371, p.172–7. 2021. doi: 10.1126/science.abe5901
- PERERA, R., KO, R., TSANG, O., HUI, D., KWAN, M., BRACKMAN, C.J., TO, E., YEN, H.L., LEUNG, K., CHENG, S., CHAN, K.H., CHAN, K., LI, K.C., SAIF, L., BARRS, V.R., WU, J.T., SIT, T., POON, L., & PEIRIS, M. Evaluation of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test for detection of antibody in human, canine, cat, and hamster sera. **Journal of Clinical Microbiology**. v.59, n.2, e02504–20. 2021. <https://doi.org/10.1128/JCM.02504-20>

PREMKUMAR, L., SEGOVIA-CHUMBEZ, B., JADI, R., MARTINEZ, D. R., RAUT, R., MARKMANN, A., CORNABY, C., BARTELT, L., WEISS, S., PARK, Y., EDWARDS, C. E., WEIMER, E., SCHERER, E. M., ROUPHAEL, N., EDUPUGANTI, S., WEISKOPF, D., TSE, L. V., HOU, Y. J., MARGOLIS, D., SETTE, A., ... DE SILVA, A. M. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. **Science immunology**, v.5, n.48, 2020. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abc8413>

PHAN, I.Q., SUBRAMANIAN, S., KIM, D. et al. In silico detection of SARS-CoV-2 specific B-cell epitopes and validation in ELISA for serological diagnosis of COVID-19. **Sci Rep** v.11, 4290. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83730-y>

PAN Y, TIAN X, QIN P, WANG B, ZHAO P, YANG Y-L, et al. Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China. **Vet Microbiol.** v.211, p.15–21. 2017. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.09.020

RUIZ-ARRONDO I, PORTILLO A, PALOMAR AM, et al. Detection of SARS-CoV-2 in pets living with COVID-19 owners diagnosed during the COVID-19 lockdown in Spain: a case of an asymptomatic cat with SARS-CoV-2 in Europe. **Transbound Emerg Dis.** v.68, n.2, p.973–976. 2021

SCHALK, A.F.; HAWN, M.C. An apparently new respiratory disease of baby chicks. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 78 , p.413–423. 1931.

SES-MG, 2023. Secretaria de estado de saúde de Minas Gerais. Painel COVID-19. Acesso em: <<https://coronavirus.saude.mg.gov.br/painel>> dia 24 jan. 2023.

SEGALÉS, J.; PUIG, M.; RODON, J.; AVILA-NIETO, C.; CARRILLO, J.; CANTERO, G.; TERRÓN, M.T.; CRUZ, S.; PARERA, M.; NOGUERA-JULIÁN, M.; et al. Detection of SARS-CoV-2 in a cat owned by a COVID-19-affected patient in Spain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.117, p. 24790–24793. 2020.

SCHLOTTAU, K. et al. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. **Lancet Microbe** v.1, e218–e225. 2020.

SHANG J, YE G, SHI K, WAN Y, LUO C, AIHARA H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. **Nature.** v.581, p.221–4. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2179-y

SHI, J. et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. **Science.** v.368,n.6494, p.1016–1020. 2020.

SIT, T.H.C., BRACKMAN, C.J., IP, S.M. et al. Infection of dogs with SARS-CoV-2. **Nature.** v.586, p.776–778. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2334-5>

SONG, Z., XU, Y., BAO, L., ZHANG, L., YU, P., QU, Y., ZHU, H., ZHAO, W., HAN, Y., QIN, C. From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. **Viruses.** v.11 n.1. 2019. <<https://www.mdpi.com/1999-4915/11/1/59>>

SPADA, E.; BRUNO, F.;CASTELLI, G.; VITALE, F.; REALE, S.;BIONDI, V.; MIGLIAZZO, A.; PEREGO, R.; BAGGIANI, L.; PROVERBIO, D. Do Blood Phenotypes of

Feline AB Blood Group System Affect the SARS-CoV-2 Antibody Serostatus in Cats? **Viruses**, v.14, n.12, 2691. p.1-13. 2022. <https://doi.org/10.3390/v14122691>

STEVANOVIĆ, V.; TABAIN, I.; VILIBIĆ-CAVLEK, T.; MAURIC MALJKOVIĆ, M.; BENVIN, I.; HRUSKAR, Z.; KOVAC, S.; SMIT, I.; MILETIĆ, G.; HADINA, S.; et al. The Emergence of SARS-CoV-2 within the Dog Population in Croatia: Host Factors and Clinical Outcome. **Viruses**. v. 13, 1430. 2021. <https://doi.org/10.3390/v13081430>

STRANIERI, A., LAUZI, S., GIORDANO, A., GALIMBERTI, L., RATTI, G., DECARO, N., BRIOSCHI, F., LELLI, D., GABBA, S., AMARACHI, N. L., LORUSSO, E., MORENO, A., TROGU, T., & PALTRINIERI, S. Absence of SARS-CoV-2 RNA and anti-SARS-CoV-2 antibodies in stray cats. **Transboundary and Emerging Diseases**. v.69, n.4.2021. <https://doi.org/10.1111/tbed.14200>

TYRRELL, D.A.J.; BYNOE, M.L. Cultivation of novel type of common-cold virus in organ cultures. **British Medical Journal**. v. 1, p. 1497-1470. 1965.

TYRRELL DA, BYNOE, M.L. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. **Lancet**. v.1, p.76-77. 1966.

TYRRELL, D.A., ALMEIDA, J.D., CUNNINGHAM, C.H., et al. Coronaviridae. **Intervirolgy**. v. 5, p.76-82. 1975.

UDOM, K., JAIRAK, W., CHAMSAI, E., CHAROENKUL, K., BOONYAPISITSOPA, S., BUNPAPONG, N., TECHAKRIENGKRAI, N., & AMONSIN, A. Serological survey of antibodies against SARS-CoV-2 in dogs and cats, Thailand. **Transboundary and Emerging Diseases**,. v.69, n.4, 2022. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/tbed.14208>

VAN WEEMEN, B.K., SCHUURS, A.H. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. **FEBS Lett** v.15, p. 232–6. 1971.

VICTOR, R. M., BICALHO, J. M., ANDRADE, M. B., BUENO, B. L., DE ABREU, L. R. A., BICALHO, A. P. D. C. V., & DOS REIS, J. K. P. (2020). Molecular Detection of Feline Leukemia Virus in Oral, Conjunctival, and Rectal Mucosae Provides Results Comparable to Detection in Blood. *Journal of clinical microbiology*, 58(2), e01233-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01233-19>

VILLANUEVA-SAZ, S., GINER, J., TOBAJAS, A. P., PÉREZ, M. D., GONZÁLEZ-RAMÍREZ, A. M., MACÍAS-LEÓN, J., GONZÁLEZ, A., VERDE, M., YZUEL, A., HURTADO-GUERRERO, R., PARDO, J., SANTIAGO, L., PAÑO-PARDO, J. R., RUÍZ, H., LACASTA, D. M., SÁNCHEZ, L., MARTELES, D., GRACIA, A. P., & FERNÁNDEZ, A. Serological evidence of SARS-CoV-2 and co-infections in stray cats in Spain. **Transboundary and emerging diseases**, v.69, n.3, 1056–1064. 2022. <https://doi.org/10.1111/tbed.14062>

WANG, A., ZHU, X., CHEN, Y., SUN, Y., LIU, H., DING, P., ZHOU, J., LIU, Y., LIANG, C., YIN, J., & ZHANG, G. Serological survey of SARS-CoV-2 in companion animals in China. **Frontiers in veterinary science**, v.9, 986619. 2022. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.986619>

WANG, N., SHANG, J., JIANG, S. & DU, L. Subunit vaccines against emerging pathogenic human coronaviruses. **Front. Microbiol.** v.11, n.298. 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00298>

WHO 2020a. Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Situation report – 51. Geneva: **World Health Organization**. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10. Acesso em: 15 julho 2022.

WHO 2021. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19). Geneva: **World Health Organization**. Disponível em: [https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-(covid-19)). Acesso em: 20 set.2022

WHO 2023. COVID-19 Dashboard. Geneva: **World Health Organization**. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>> Acesso em: 01 maio 2023

WOO PC, LAU SKP, LAM CSF, LAU CCY, TSANG AKL, LAU JHN, BAI R, TENG JLL, TSANG CCC, WANG M, ZHENG, B-J, CHAN K-H, YUENA K-Y. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. **J Virol**. v.86, n.7, p.3995-4008. 2012. doi:<https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11>)

WOAH, 2022. SARS-CoV-2 in animals - Situation report 16 31.08.2022. **World Organisation for Animal Health**, Paris, France. Disponível em: <<https://www.woah.org/app/uploads/2023/01/sars-cov-2-situation-report-20.pdf>> Acesso dia 19 janeiro 2023.

XIAO, K. et al. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. **Nature** v.583, p.286–289. 2020.

XIAO, A.T., TONG, Y.X., GAO, C., ZHU, L., ZHANG, Y.J., ZHANG, S. Dynamic profile of RT-PCR findings from 301 COVID-19 patients in Wuhan, China: A descriptive study. **J Clin Virol**. v.127:104346. 2020. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104346.

WRAPP, D., WANG N., CORBETT, K.S., et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**. v.367, p.1260-3. 2020. doi: 10.1126/science.abb2507 pmid: 32075877

WÖLFEL, R., CORMAN, V.M., GUGGEMOS, W., et al.. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature**. v. 581, p.465-9. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2196-x pmid: 32235945

YALOW RS, BERSON SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. **J Clin Invest** v.39, p.1157–75. 1960.

YEN HL, SIT THC, BRACKMAN CJ, CHUK SSY, GU H, TAM KWS. ET AL. Transmission of SARS-CoV-2 Delta Variant (Ay127) from pet hamsters to humans, leading to onward human-to-human transmission: a case study. **Lancet**. v.399, p.1070–8. 2022. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00326-9

YOUNES, N., AL-SADEQ DW, AL-JIGHEFEE H, YOUNES S, AL-JAMAL O, DAAS HI, et al. Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. **Viruses**. v.12, n.6, 582. 2020. doi: 10.3390/v12060582

YOUNES, S., YOUNES N, SHURRAB F, NASRALLAH GK. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 natural animal reservoirs and experimental models: systematic review. **Rev Med Virol.** v.31,n.4, 2020.

YÜCE, M., FILIZTEKIN, E., & ÖZKAYA, K. G. COVID-19 diagnosis -A review of current methods. **Biosensors & bioelectronics.** v.172, 112752. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112752>

ZAKI, A. M., VAN BOHEEMEN, S., BESTEBROER, T. M., OSTERHAUS, A. D. & FOUCHIER, R. A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **N. Engl. J. Med.** v.367, p.1814–1820 . 2012.

ZHANG, J. Porcine deltacoronavirus: overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution. **Virus Res.** v.226, p.71–84. 2016. doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.028

ZHANG, Q., ZHANG, H., GAO, J., HUANG, K., YANG, Y., HUI, X., HE, X., LI, C., GONG, W., ZHANG, Y., ZHAO, Y., PENG, C., GAO, X., CHEN, H., ZOU, Z., SHI, Z. L., & JIN, M. A serological survey of SARS-CoV-2 in cat in Wuhan. **Emerging Microbes & Infections.** v.9, n.1, p.2013–2019. 2020. doi: 10.1080/22221751.2020.1817796.

ZHANG, T., WU, Q., ZHANG, Z. Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. **Curr. Biol.** v.30, p.1346–1351 .2020.

ZHANG, Y. -Z., HOLMES, E.C. A genomic perspective on the origin and emergence of SARS-CoV-2. **Cell.** v.181, n.2, p.223–227. 2020.

ZHAO, S., SCHUURMAN, N., LI, W., WANG, C., SMIT, L.A.M., BROENS, E.M., WAGENAAR, J.A., VAN KUPPEVELD, F.J.M., BOSCH, B.J., EGBERINK, H. Serologic Screening of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection in Cats and Dogs during First Coronavirus Disease Wave, the Netherlands. **Emerg. Infect. Dis.** v.27, p.1362–1370. 2021.

ZHANG, Y.-Z., HOLMES, E.C. A genomic perspective on the origin and emergence of SARS-CoV-2. **Cell.** v.181, n.2, p.223–227. 2020.

ZHANG, Q., ZHANG, H.,GAO J, HUANG, K., YANG, Y., HUI, X., et al. A serological survey of SARS-CoV-2 in a cat in Wuhan. **Emerg Microbes Infect.** v.9, n.1, p.2013–9. 2020. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1817796>

ZHONG, N. S. et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People’s Republic of China, in February, 2003. **Lancet** v.362, p.1353–1358. 2003.

ZHOU, P.; YANG, X.L.; WANG, X.G. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature** v.579, p.270–273. 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2012-7>

ZHU, N. ET AL. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **N. Engl. J. Med.** v.382, p.727–733. 2020. Doi: 10.1056/NEJMoa2001017

APÊNDICE 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Título do projeto: Desenvolvimento de protocolos de acompanhamento georeferenciado da prevalência de SARS-CoV-2 em animais domésticos e no homem e sua associação com infecções pré-existentes

Pesquisador principal: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Razão social e Ciae p instituição da CEUA que aprovou: Universidade Federal de Minas Gerais - Ciae p: 01.044.2013

Projeto aprovado pelo CEUA, número de protocolo 184/2021

Objetivos: Estimar a prevalência de infecção por SARS-CoV-2 em cães e gatos, sua distribuição espacial e sua associação com a presença da COVID-19 em humanos no município de Belo Horizonte; Desenvolver e testar kits diagnósticos para COVID-19 utilizando estratégias sorológicas convencionais e nanotecnológicas que permitam sua utilização em animais domésticos; e verificar possíveis alterações imunológicas e patológicas associadas a infecção por SARS-Cov-2 nos animais examinados e as possíveis associações com outras infecções parasitárias

Procedimentos a serem realizados com os animais: O gato ou cão serão submetidos à coleta de sangue e de secreções nasais e orofaríngeas uma vez durante o projeto, durante a consulta clínica. Será feita a coleta de sangue pela veia do braço (veia cefálica) ou veia do pescoço (veia jugular), da maneira que o animal se sentir mais confortável. Será coletado aproximadamente 1 a 3 mL (um a 3 mililitros) de sangue. Também serão coletadas amostras de secreções orofaríngeas, nasais e anais com o auxílio de swabs.

Potenciais riscos para os animais: O risco que o paciente será submetido é mínimo, podendo apresentar um pequeno hematoma (bolsa de sangue) no local da coleta, comum ao procedimento. O tempo de coleta das amostras do animal será de no máximo 20 minutos.

Cronograma: A coleta do animal será realizada uma única vez durante a execução do projeto, no momento da visita à residência.

Benefícios: O benefício para o animal será a realização do diagnóstico de SARS -CoV2, hemoparasitos, bactérias hemotrópicas e parasitos gastrintestinais. O benefício para os outros animais e para a sociedade é o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico para SARS-CoV-2, elucidação do papel dos cães e gatos na epidemiologia da COVID-19 e identificação de outros patógenos associados à COVID-19.

Esclarecimentos ao proprietário sobre a participação do animal neste projeto: Sua autorização para a inclusão do seu animal neste estudo é voluntária. Seu (s) animal (ais) poderá (ão) ser retirado (s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele (s). A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações e, nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares. A equipe de pesquisa se responsabilizará pelo bem-estar do (s) seu (s) animal (ais) durante todo o procedimento de coleta e tempo de observação. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o pesquisador principal ou com sua equipe pelos contatos:

Endereço: Laboratório de Retrovírus, Sala E-208, Bloco E, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Campus Pampulha da UFMG - Av. Antônio Carlos, 6627 - São Luiz, Belo Horizonte - MG, 31270-901.

Declaração de consentimento: Fui devidamente esclarecido (a) sobre todos os procedimentos desse estudo, seus riscos e benefícios ao(s) meu(s) animal(s) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s) a seguir, neste projeto. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Belo Horizonte, MG, ____ de _____ de _____

Responsável pelo animal:

Nome completo: _____

Assinatura: _____

Número do documento de identidade: _____

Pesquisador responsável:

Nome completo: _____

Assinatura: _____

Número do documento de identidade: _____

1. Identificação do (s) animal (is):

Nome: _____

Número de identificação: _____

Espécie: _____

Raça: _____

2. Identificação do (s) animal (is):

Nome: _____

Número de identificação: _____

Espécie: _____

Raça: _____

APÊNDICE 2

FICHA DE ANAMNESE E QUESTIONÁRIO LOCAL

1. Nome do tutor: _____

2. Tutor positivo em (data da coleta): _____ () Teste rápido () rt-qPCR

3. Nome / espécie do animal: _____

4. Raça: _____ 5. Sexo: () M () F

6. Idade: _____ 7. Castrado: () S () N

7. Vacinas (últimos 12 meses): () N () Polivalente () Antirrábica () Leishmaniose
() Outras: _____

8. Vermífugo (últimos 12 meses): () S () N

9. Repelentes: () S () N

SE SIM, Quais? () Coleira - marca: _____

() Topspot - marca: _____

() Outros: _____

10. Frequenta veterinário? () S () N

SE SIM: Data da última visita ao veterinário: ____/____/____

Procedimentos / diagnóstico realizados (descrever): _____

11. Alimentação: () Ração: Qual? _____

() Comida caseira () Ração e comida caseira () Outros: _____

12. Apetite: () Normorexia () Polifagia () Hiporexia

Observações relevantes: _____

13. Ingestão hídrica: () Normodipsia () Polidipsia

Observações relevantes: _____

14. Urina: () Normúria () Poliúria

Observações relevantes: _____

15. Fezes: () Normais () Ressecadas () Amolecidas

() Diarreicas com aspecto _____

16. Vômito: () N () S: Aspecto _____

17. Portador de outras condições de saúde? () N () S

SE SIM, Quais?

() Doenças infecciosas (descrever): _____

() Não infecciosas / crônicas (descrever): _____

18. Uso de medicamento: () N () S:

Quais? (descrever): _____

EXAME FÍSICO

Peso:

Escore corporal:

Temperatura:

Mucosas:

Ausculta:

FC:

Inspeção de boca:

Inspeção de pele:

Reflexo de tosse:

COVID-19 - Sintomático () S () N

Observações Gerais relevantes: _____

AMBIENTE

1. Externo (observar e marcar as opções necessárias):

- | | |
|---|--|
| () Próximo a fazenda/ reserva/ área de proteção ambiental / praça/ área arborizada | |
| () Residência em condomínio fechado | |
| () Única casa no terreno | () Quintal com gramado / terra |
| () Apartamento com sacada | () Quintal parcialmente calçado |
| () Apartamento sem sacada | () Quintal totalmente calçado |
| () Casa essencialmente em alvenaria | () Presença de animais soltos nos arredores |
| () Casa essencialmente em madeira | |
| () Arruamento com asfalto | |
| () Arruamento sem asfalto | |

2. Interno (onde o animal permanece)

- () Alta incidência solar
() Baixa incidência solar
() Pelos pela casa
() Sinais de sujidades: _____

APÊNDICE 3

Informações dos antígenos utilizados no desenvolvimento do ELISA-N e ELISA-RBD:

Antígeno N (16.62 kDa)

MHHHHHHSSG VDLGTENLYF QSNNTASWF TALTQHGKED LKFPRGQGVP
INTNSSPDDQ IGYRRATRR IRGGDGKMKD LSPRWYFYLL GTGPEAGLPY GANKDGIWV
ATEGALNTPK DHIGTRNPAN NAAIVLQLPQ GTTLPKGFYA

Antígeno RBD

MGILPSPGMPALLSLVSLLSVLLMGCVAETGTRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAW
NRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQA
PGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDI
STEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVC
GPKKSTHHHHHHHH

Origem dos antígenos: Laboratório de Design de Proteínas, Prof. Wesley Van Voorhis, University of Washington, Estados Unidos da América.

Referência: Phan, I.Q., Subramanian, S., Kim, D. *et al.* In silico detection of SARS-CoV-2 specific B-cell epitopes and validation in ELISA for serological diagnosis of COVID-19. *Sci Rep* 11, 4290 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83730-y>

APÊNDICE 4

Informações do antígeno utilizado no desenvolvimento da Plataforma Portátil de Bodiagnóstico (PPB):

Antígeno N (48 KDa)

MASMTGGQQMGRGMSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNNGERSGARSKQRRP
QGLPNNTASWFTALTQHGKEDLKFPRGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRRATTRRIRGGDG
KMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNA
AIVLQLPQGTTLPGKFYAEGSRGGSQASSRSSSRNNSRNSTPGSSRGTSARMAGN
GGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGGQQQQGQTVTKKSAEASKKPRQKRTATKAY
NVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVT
PSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTEPKKDKKKKKADETQAL
PQRQKKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQAGGGHHHHHH

MT126808.1 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/BRA/SP02/2020

Origem: CTVacinas, Universidade Federal de Minas Gerais e FIOCRUZ Minas, Belo Horizonte, Brasil.

Referência: Flávia F. Bagno, Sarah A.R. Sérgio, Maria Marta Figueiredo, Lara C. Godoi, Luis A.F. Andrade, Natália C. Salazar, Camila P. Soares, Andressa Aguiar, Flávia Jaqueline Almeida, Edimilson D. da Silva, Antônio G.P. Ferreira, Edison Luiz Durigon, Ricardo T. Gazzinelli, Santuza M.R. Teixeira, Ana Paula S.M. Fernandes, Flavio G. da Fonseca J Clin Virol Plus. 2022 Aug; 2(3): 100101. Published online 2022 Aug 6. doi: 10.1016/j.jcvp.2022.100101

ANEXO 1

**UFMG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 185 / 2016, relativo ao projeto intitulado "MANEJO DE GATOS COMUNITÁRIOS NO MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS", que tem como responsável Júlia Angélica Gonçalves da Silveira, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 11/10/2016. Este certificado espira-se em 11/10/2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 185 / 2016, related to the Project entitled "CATS COMMUNITY MANAGEMENT IN MUNICIPALITY BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS", under the supervision of Júlia Angélica Gonçalves da Silveira, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/10/2016. This certificate expires in 11/10/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 11/10/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Desenvolvimento de protocolos de acompanhamento geo-referenciado da prevalência de SARS-CoV-2 em animais domésticos e no homem e sua associação com infecções pré-existentes", protocolo do CEUA: 184/2021 sob a responsabilidade de Jenner Karlisson Pimenta dos Reis que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 13/09/2021.

Vigência da Autorização	13/09/2021 a 12/09/2026
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/Inragem	Gatos / Indiferente
Nº de animais	69
Peso/Idade	4kg / 5(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Domicílio dos tutores
*Espécie/Inragem	Cão / Indiferente
Nº de animais	70
Peso/Idade	8kg / 5(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Domicílio dos tutores

Considerações posteriores:

13/09/2021	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 13/09/2021. Validade: 13/09/2021 à 12/09/2026.
------------	---


Belo Horizonte, 13/09/2021.

Atenciosamente,



Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br

ANEXO 3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO - UFRP				
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP				
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA				
Título da Pesquisa: Promoção da vigilância de SARS-CoV-2 em animais de companhia do Brasil com Interface à Saúde Única.				
Pesquisador: Daniel Friguglietti Brandespin				
Área Temática:				
Versão: 2				
CAAE: 31752120.7.1001.9547				
Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO				
Patrocinador Principal: CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ				
DADOS DO PARECER				
Número do Parecer: 4.054.208				
Apresentação do Projeto:				
<p>A proposta é um estudo longitudinal prospectivo, com animais de companhia (mamíferos domésticos como cães, gatos e/ou pequenos roedores como hamsters e afins), cujo tutor esteja em isolamento domiciliar, com diagnóstico laboratorial confirmado para SARS-CoV-2 através de RTqPCR ou resposta imunológica apenas por IgM (caracterizando doença ativa), até sete dias da data do diagnóstico, residente em uma das cinco capitais: Belo Horizonte (MG), Campo Grande (MS), Curitiba (PR), Recife (PE) e São Paulo (SP). Todos os tutores ou familiares voluntários receberão, por e-mail ou aplicativo de comunicação, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e, ao consentirem com a participação na pesquisa, responderão ao questionário de televigilância por meio de contato telefônico, a fim de determinar as características ambientais e outros fatores associados à infecção nos animais. Serão excluídos do estudo, animais que não sejam mamíferos, como peixes ou répteis, assim como animais de rua, em condição irrestrita ou animais de grande porte, que não tenham relação com as residências no meio urbano ou animais de tutores com resultados negativos para SARS-COV-2.</p>				
<table border="1"> <tr> <td>Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n Dois Irmãos, 1º andar do Prédio Central da Reitoria da UFRPE</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Recife Município: RECIFE CEP: 52.171-900</td> </tr> <tr> <td>UF: PE Telefone: (81)3320-6638 E-mail: cep@ufrpe.br</td> </tr> </table>		Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n Dois Irmãos, 1º andar do Prédio Central da Reitoria da UFRPE	Bairro: Recife Município: RECIFE CEP: 52.171-900	UF: PE Telefone: (81)3320-6638 E-mail: cep@ufrpe.br
Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n Dois Irmãos, 1º andar do Prédio Central da Reitoria da UFRPE				
Bairro: Recife Município: RECIFE CEP: 52.171-900				
UF: PE Telefone: (81)3320-6638 E-mail: cep@ufrpe.br				

ANEXO 4

 <p style="font-size: small;">PREFEITURA MUNICIPAL DE BELO HORIZONTE</p>	
TERMO DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL	
<p>À <i>Escola de Veterinária da UFMG e ao Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Campus Pampulha, localizada à Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, 31270-901.</i></p>	
<p>Responsáveis pela pesquisa:</p>	
<p>a) Secretaria Municipal de Saúde/Gerência de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte Maria Helena Franco Morais (CPF: 627451406 63), Vanessa de Oliveira Pires Fiúza (CPF: 652880506 78), Eduardo Viana Vieira Gusmão (CPF: 9892187860 53), Silvana Tecles Brandão (CPF: 666398246 04)</p>	
<p>b) Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG</p>	
<p>- Depto. Parasitologia/ICB Prof. Júlia Angélica Gonçalves da Silveira Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro Msc. Hudson Andrade dos Santos</p>	
<p>- Depto. de Patologia Geral Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri Prof. Dr. Ricardo Gonçalves Prof. Dra Tatiane Paixão Dr. Aldair Woyames Pinto Júnior Msc. Gregório Guilherme Almeida</p>	
<p>- Depto de Virologia/ICB Giliane de Souza Trindade: Profa Adjunta Galileu Barbosa Costa: Doutorando em Microbiologia Jaqueline Silva de Oliveira: Mestranda em Microbiologia Ana Teresa Saraiva Silva: Graduada em Biologia, IC</p>	
<p>- Depto. Medicina Veterinária Preventiva/EV Profa. Kelly Moura Keller Profa. Danielle Ferreira de Magalhães Soares Paloma Carla Fonte Boa Carvalho Joana Angelica Macêdo Costa Silva (Residente em Saúde Pública) Glendalisse Nunes Rocha de Faria Teixeira (Residente em Saúde Pública)</p>	
<p>- Depto. Clínica e Cirurgia Veterinárias/EV Prof. Renato de Lima Santos Amanda Pifano Neto Quintal Diogo César Eneidino Lacerda</p>	
<p>c) Universidade Federal de Uberlândia - UFU - ICBIM Prof. Sydnei Magno da Silva</p>	
<hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> <p style="font-size: x-small; margin: 0;"> GERÊNCIA DE CONTROLE DE ZOONOSSES/GVSI/SMSA/PB4 Av. Afonso Pena, 2.336 4º andar - Funcionário CEP: 30130-007 - BELO HORIZONTE, MG Fone: (031) 3277.78.01 - Fax: 3277.95.46 - zoonos@pbbh.gov.br </p>	

Esta autorização refere-se à parceria firmada entre a Gerência de Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Belo Horizonte para realização do Projeto de Pesquisa "MANEJO DE GATOS COMUNITÁRIOS NO MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS", que tem como objetivos específicos:

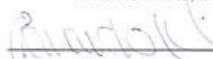
- Caracterizar os gatos comunitários analisados quanto as variáveis: espécie, sexo (macho e fêmea), idade (filhote, jovem e adulto), condição corporal, sinais clínicos específicos, diagnóstico presuntivo e o local de origem e destinação;
- Identificar agentes etiológicos potencialmente patogênicos (parasitos, vírus e bactérias) e de importância em saúde pública nos gatos comunitários estudados;
- Avaliar indicadores de bem estar animal, relacionados à dimensão sanitária e comportamental;
- Conhecer a dinâmica populacional das populações de gatos comunitários residentes em parques municipais;
- Determinar a distribuição espacial das colônias no interior das áreas públicas (parques, entre outros) e no município de Belo Horizonte, caracterizando o grau de dependência do homem e sua associação com os patógenos encontrados e características físicas e de bem estar;
- Realizar a cirurgia de esterilização nos gatos capturados (machos e fêmeas) e promover ações de adoção ou, na impossibilidade desta, retorno para o ambiente de origem;
- Avaliar os custos e os fatores facilitadores e dificultadores para a implantação do manejo de gatos comunitários em Belo Horizonte.

Autorizo a coleta de dados relativos aos animais capturados e ao ambiente em que se encontra, assim como de amostras biológicas, conforme explicitado no projeto de pesquisa acima referido.

Ciente dos objetivos e metodologia da pesquisa concordo em fornecer todos os subsídios para seu desenvolvimento, desde que, sejam assegurados os requisitos abaixo:

- Cumprimento das determinações éticas da Lei no 11.794, de 08.10.2008 do CONCEA
- Esta pesquisa será realizada em consonância com as atividades rotineiras previstas no serviço e não haverá nenhuma despesa para esta instituição que seja decorrente da participação na pesquisa.

Belo Horizonte, 29 de agosto de 2016.



 Eduardo Viana Vieira Guimarães
Gerência de Controle de Zoonoses
BM 82733-2