



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

ANISLEIDY PÉREZ CASTILLO

VIGILÂNCIA DE SARS-COV-2 E OUTROS PATÓGENOS EM MAMÍFEROS
DOMÉSTICOS E SILVESTRES DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL NA
PERSPECTIVA DE UMA SÓ SAÚDE.

Belo Horizonte
2024

ANISLEIDY PÉREZ CASTILLO

VIGILÂNCIA DE SARS-COV-2 E OUTROS PATÓGENOS EM MAMÍFEROS DOMÉSTICOS E SILVESTRES DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL NA PERSPECTIVA DE UMA SÓ SAÚDE.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.
Área de concentração: Imunoparasitologia.

Orientadora: Dra. Júlia Angélica Gonçalves da Silveira

Coorientador: Dr. Renato Santana De Aguiar

Belo Horizonte
2024

- 043 Castillo, Anisleidy Pérez.
Vigilância de SARS-CoV-2 e outros patógenos em mamíferos domésticos e silvestres de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil na perspectiva de uma só saúde [manuscrito] / Anisleidy Pérez Castillo. – 2024.
241 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Júlia Angélica Gonçalves da Silveira. Coorientador: Renato Santana De Aguiar.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.
1. Parasitologia. 2. Betacoronavirus. 3. Coinfecção. 4. Leishmania infantum. 5. Toxoplasma. 6. Monitoramento Epidemiológico. I. Silveira, Júlia Angélica Gonçalves da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.
- CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

TÍTULO DA TESE: "VIGILÂNCIA DE SARS-COV-2 E OUTROS PATÓGENOS EM MAMÍFEROS DOMÉSTICOS E SILVESTRES DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL NA PERSPECTIVA DE UMA SÓ SAÚDE"

ALUNA: ANISLEIDY PÉREZ CASTILLO - 360/2024/09

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOPARASITOLOGIA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **vinte e sete de setembro de 2024**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Doutores:

Gustavo Fontes Paz

Membro externo - IRR/FIOCRUZ

Simone Magela Moreira

Membro externo - IFMG- CAMPUS Bambuí

Érika Martins Braga

Membro interno - UFMG

Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Membro interno - UFMG

Júlia Angélica Gonçalves da Silveira

Orientadora - UFMG

Belo Horizonte, 27 de setembro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Julia Angelica Goncalves da Silveira, Professora do Magistério Superior**, em 30/09/2024, às 15:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

*Dedico este trabalho à minha mãe Virginia e à
memória da minha avó Nélida*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar e me mostrar que o tempo dele é perfeito.

À minha mãe, Virginia, que, apesar das dificuldades e da distância, sempre me apoiou em meus estudos e me incentivou a buscar meus sonhos. Obrigada por tudo, Mami! Te amo!!!

À minha avó, Nélida, que, de onde estiver, me acompanha e me protege como meu anjo da guarda.

Ao meu esposo, Luciano, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando em cada passo desta jornada. Agradeço pela compreensão nos dias de estresse e cansaço. Obrigada por tudo, amor!

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), na pessoa da Profa. Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu e da Secretária Sumara Aparecida Guilherme, que se esforçaram ao máximo para que eu pudesse chegar ao Brasil, assumir meu projeto e vivenciar a pós-graduação. Muito obrigada!!!

A Professora Héliida Monteiro de Andrade e à secretaria Sibele Abreu pelo suporte administrativo, sempre muito importante para o correto andamento das atividades da pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa, que possibilitou a dedicação exclusiva ao desenvolvimento deste trabalho.

À FAPEMIG e CNPQ, pelo apoio financeiro essencial para o desenvolvimento do projeto.

Ao projeto PetCOVID-19 e os profs envolvidos (principalmente Daniella Castanheira, Ricardo Nascimento e David Soeiro) no nosso projeto financiado CAPES: Edital de Seleção Emergencial II CAPES - Fármacos e Imunologia COMBATE-COVID Programa: CAPES-EPIDEMIAS - Programa Estratégico Emergencial de Prevenção e Combate a Surtos, Endemias, Epidemias e Pandemias.

A minha orientadora, Profa. Dra. Júlia Angélica Gonçalves da Silveira, por me aceitar como orientanda e por todo o ensinamento ao longo desses quatro anos. Sua confiança e apoio foram essenciais para a realização deste trabalho. Obrigada Profa!!!!

Ao meu coorientador, Renato Santana de Aguiar, agradeço por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório e por ter abraçado meu projeto com tanto empenho. Sou grata pelos ensinamentos, pela parceria e pelo apoio incondicional. Apenas tenho a agradecer.

Aos membros do meu laboratório de PROTOVET, em especial ao Nicolas, João, Pedro, Julia, Andressa, Mariana, Ana Claudia, Bárbara, Ellen, Bruna, Mayara, Douglas obrigada pelo acolhimento e toda a ajuda oferecida. Obrigada principalmente pela amizade. Vocês farão muita falta.

Aos membros do antigo laboratório de PROTOVET, Andreina, Anna, Hudson e, em especial, à Soraia, agradeço pelo apoio à minha pesquisa. Foi um prazer trabalhar com vocês.

À minha colega Kelly Godoy. Embora não faça parte do meu laboratório, convivemos diariamente, e ela se tornou uma parte fundamental do nosso grupo.

Aos residentes do laboratório Protovet, em especial a Camila Siqueira Costa, Júlia Penna de Andrade e Camilla Faria Soares, por toda a ajuda prestada durante as coletas das amostras do zoológico.

Aos membros do Laboratório de Biologia Integrativa, em especial ao João Vitor, meu par durante estes quatro anos, e também a Paula, Daniel, Luiza, Renan, Diego e Hugo, agradeço pela colaboração e apoio.

Às colegas de pós-graduação Talita Rodrigues dos Santos e Andréia Luiza Oliveira Costa, agradeço pelas conversas, pela ajuda e pelo incentivo para seguir em frente.

Agradeço a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, em especial a Rosa. Sou profundamente grata pelas palavras de alento, pelo apoio constante e pelas orações diárias, que foram fundamentais para mim.

Ao Professor Jenner, agradeço pela parceria e pelo acolhimento desde o primeiro dia em que nos conhecemos. Você talvez não saiba o quanto esse momento foi significativo para mim. Muito obrigada por tudo.

À Profa. Camila Oliveira e ao professor Rafael Nicolino, pelo suporte nas análises estatísticas, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos veterinários da Prefeitura de Belo Horizonte, ao Jardim Zoológico de BH e aos tutores de pets de BH, que colaboraram diretamente com o meu trabalho.

A todos os professores que marcaram a minha vivência acadêmica desde os primeiros anos de estudo.

À minha amiga e colega de trabalho, May, por sua perseverança em nosso desejo de trabalharmos juntas novamente e pela busca incansável de maneiras de realizar esse sonho, e pelo apoio nesta etapa. Minha gratidão também à amiga Sury, pelo apoio durante estes 4 anos. A ambas por formar minha família cubana no Brasil e amenizar a saudade de casa.

Aos meus familiares e amigos, que mesmo à distância estiveram sempre presentes, em especial Laura e Leidy. Obrigada por serem os ouvidos que tanto precisei nos momentos mais difíceis.

À Salsa, que trouxe tanta alegria e tornou meus dias em Belo Horizonte mais especiais. Como cubana, encontrar um grupo de salsa aqui foi uma grande fonte de felicidade e conforto. Obrigada por fazer meus dias mais brilhantes e me proporcionar momentos tão especiais.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, embora talvez não tenham sido mencionadas, me apoiaram ao longo desta jornada.

*Toda a nossa ciência, comparada com a
realidade, é primitiva e infantil – e, no
entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”*

Albert Einstein

RESUMO

Entre janeiro de 2021 e março de 2023, investigamos a presença de SARS-CoV-2 e hemopatógenos em três populações distintas de mamíferos em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Foram utilizados diferentes métodos diagnósticos, como RT-qPCR para SARS-CoV-2, PCR para hemopatógenos, RFLP-PCR para *Leishmania* spp. e ensaios sorológicos para *Toxoplasma gondii*. No Projeto PetCOVID-19, que incluiu 86 cães e gatos domiciliados cujos tutores foram diagnosticados com COVID-19, a taxa de infecção por SARS-CoV-2 foi de 9,3%. Coinfecções com hemopatógenos foram frequentes, com prevalências de 47,7% para *Anaplasma/Ehrlichia* spp., 17,4% para *Mycoplasma* spp., 15,8% para *Bartonella* spp. e 37,5% para Piroplasmida. Nenhum animal foi positivo para *Leishmania* spp., e a soroprevalência de *T. gondii* foi de 15,8% entre os gatos. A variante Ômicron (BA.1.) foi identificada nesses animais. Entre os 78 gatos errantes do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, 7,7% foram positivos para SARS-CoV-2. A prevalência de hemopatógenos incluiu 38,5% para *Anaplasma/Ehrlichia* spp., 7,7% para *Mycoplasma* spp., 38,5% para *Bartonella* spp. e 2,6% para Piroplasmida. *Leishmania* spp. foi detectada em 15,4% dos gatos, sendo 14,1% positivos para *L. infantum*. A soroprevalência de *T. gondii* foi de 23,1%. A variante Delta (B.1.617.2) foi identificada nos gatos do parque. Nos 52 mamíferos cativos do Jardim Zoológico de Belo Horizonte, 18% foram positivos para SARS-CoV-2. As coinfecções com hemopatógenos incluíram prevalências de 14,6% para *Anaplasma/Ehrlichia* spp., 17,5% para *Mycoplasma* spp., 42,5% para *Bartonella* spp. e 22,5% para Piroplasmida. *Leishmania* spp. foi detectada em 33,3% dos animais da família Canidae. As variantes Alpha (B.1.1.7) e Ômicron (BA.1.) foram identificadas nos animais do zoológico. Associações significativas foram encontradas entre a infecção por SARS-CoV-2 e a presença de hemopatógenos nos gatos do parque ($p = 0,032$) e entre SARS-CoV-2 e *Bartonella* spp. nos animais do zoológico ($p = 0,000$). Esses resultados reforçam a importância da vigilância epidemiológica em animais, visando não apenas à saúde animal, mas também à saúde pública, especialmente em contextos de pandemia como o da COVID-19.

Palavras chaves: Coronavírus, animais, hemopatógenos, PCR, sequenciamento, coinfecção, Uma Só Saúde

ABSTRACT

Between January 2021 and March 2023, we investigated the presence of SARS-CoV-2 and hemopathogens in three distinct mammal populations in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Different diagnostic methods were used, including RT-qPCR for SARS-CoV-2, PCR for hemopathogens, RFLP-PCR for *Leishmania* spp., and serological assays for *Toxoplasma gondii*. In the PetCOVID-19 Project, which included 86 domestic dogs and cats whose owners had been diagnosed with COVID-19, the infection rate for SARS-CoV-2 was 9.3%. Coinfections with hemopathogens were common, with prevalences of 47.7% for *Anaplasma/Ehrlichia* spp., 17.4% for *Mycoplasma* spp., 15.8% for *Bartonella* spp., and 37.5% for Piroplasmida. No animal tested positive for *Leishmania* spp., and the seroprevalence of *T. gondii* was 15.8% among the cats. The Omicron variant (BA.1.) was identified in these animals. Among the 78 stray cats from Américo Renné Giannetti Municipal Park, 7.7% were positive for SARS-CoV-2. The prevalence of hemopathogens included 38.5% for *Anaplasma/Ehrlichia* spp., 7.7% for *Mycoplasma* spp., 38.5% for *Bartonella* spp., and 2.6% for Piroplasmida. *Leishmania* spp. was detected in 15.4% of the cats, with 14.1% testing positive for *L. infantum*. The seroprevalence of *T. gondii* was 23.1%. The Delta variant (B.1.617.2) was identified in the cats from the park. Among the 52 captive mammals at the Belo Horizonte Zoo, 18% tested positive for SARS-CoV-2. Coinfections with hemopathogens were observed, with prevalences of 14.6% for *Anaplasma/Ehrlichia* spp., 17.5% for *Mycoplasma* spp., 42.5% for *Bartonella* spp., and 22.5% for Piroplasmida. *Leishmania* spp. was detected in 33.3% of the Canidae family. The Alpha (B.1.1.7) and Omicron (BA.1.) variants were identified in the zoo animals. Significant associations were found between SARS-CoV-2 infection and the presence of hemopathogens in the park cats ($p = 0.032$) and between SARS-CoV-2 and *Bartonella* spp. in the zoo mammals ($p = 0.000$). These findings highlight the importance of epidemiological surveillance in animals, aiming not only at animal health but also at public health, particularly in pandemic contexts like COVID-19.

Keyword: Coronavirus, animals, hemopathogens, PCR, sequencing, coinfection, One Health

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do genoma do SARS-CoV-2.....	29
Figura 2 – Número de eventos, países e espécies relatados de SARS-CoV-2 em animais.....	33
Figura 3 – Variantes relatadas de SARS-CoV-2 identificadas em animais.....	40
Figura 4 – Distribuição mundial de eventos de SARS-CoV-2 relatados ao WOA (até 30 de junho de 2023).....	43
Figura 5 – Localização geográfica das áreas onde as coletas foram realizadas: Município Belo Horizonte (S 19°48'57" W 43°57'15"), Parque Municipal Américo Renné Giannetti de Belo Horizonte (S 19°55'37" W 43°56'42"), Jardim Zoológico de Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (S 19° 51' 35", 0' 44" W 38").....	59
Figura 5A – Área de estudo - Parque Municipal Américo Renné Giannetti em Belo Horizonte, metrópole com mais de 2.500.000 habitantes. Espaço com cerca de 180.000 m ² , considerado um importante refúgio para fauna e flora.....	59
Figura 5B – Área de estudo - Jardim Zoológico da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte, com cerca de 1,4 milhão de m ²	60
Figura 6 – Organograma esquematizando a metodologia utilizada no presente estudo.....	65
Quadro 1 – Controles positivos utilizados em cada reação da PCR.....	71
Quadro 2 – Sequência de iniciadores utilizados para identificação dos agentes em estudo.	72
Quadro 3a – Programas utilizados para as reações de amplificação do tipo PCR convencional.	74
Quadro 3b – Programas utilizados para as reações de amplificação do tipo, semi-nested, nested PCR.	75
Figura 7 – Fluxograma esquematizando apresentando a sequência das reações de PCR realizadas para as amostras utilizadas no presente estudo.....	76
Figura 8 – Representação gráfica das características da população de cães e gatos amostrados em Belo Horizonte, Minas Gerais, tendo em conta uma amostra total de 86 animais, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.....	83
Gráfico 1 – Representação gráfica da idade dos cães e gatos amostrados em Belo Horizonte, Minas Gerais, no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.....	85
Figura 9 – Árvore filogenética de máxima verossimilhança. A árvore gerada apresenta um genoma (BHC22) de SARS-CoV-2 gerado em nosso estudo (círculo laranja) e genomas públicos disponíveis no banco de dados GISAID EpiCoV.....	87

Figura 10A – Representação gráfica das frequências de amostras positivas para hemopatógenos, por método molecular, em cães e gatos domésticos provenientes de Belo Horizonte Minas Gerais no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.....88

Figura 10B – Representação gráfica do percentual de detecção de um patógeno, dois ou mais patógenos e não detectados em cães e gatos domésticos provenientes de Belo Horizonte Minas Gerais no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.....89

Figura 11 – Eletroforeses em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR para *Ehrlichia* monocítica. Linha PPM: Padrão de tamanho molecular de 1Kb (Sinapse inc); Coluna 1: controle positivo *Ehrlichia canis*; Coluna 17: amostra de gatos com formação de banda na altura do fragmento esperado (443 pb); Coluna C-: controle negativo da reação, água livre de nuclease.....90

Figura 12 – Eletroforeses em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR para *Ehrlichia/Anaplasma* granulócitos e plaquetas. Linha M: Padrão de tamanho molecular de 1Kb (Kasvi); Coluna C+: controle positivo *Anaplasma phagocytophilum*; Colunas 2 a 11: amostras de cães domésticos com formação de bandas positivas; Coluna 12: controle negativo da reação, água livre de nucleasse.....91

Figura 13 – Eletroforeses em gel de agarose 3% dos produtos amplificados por PCR para *Mycoplasma* spp. Linha 1: Padrão de tamanho molecular de 100pb (Cellco); Coluna C+: controle positivo *Bartonella* spp; Colunas 1 a 3: amostras com formação de banda na altura do fragmento esperado (146 a 251pb); Coluna 4: amostra de gato doméstico; Coluna C-: controle negativo da reação, água livre de nucleasse.....91

Figura 14 – Eletroforeses em gel de agarose 2% dos produtos amplificados por PCR para *Mycoplasma* spp. Linha 1: Padrão de tamanho molecular de 1Kb (Kasvi); Coluna C+: controle positivo *Mycoplasma* spp; Colunas 1 a 27: amostras de cães domésticos; Colunas 14,16,19,20 e 21: amostras com formação de banda na altura do fragmento esperado (618pb); Coluna C-: controle negativo da reação, água livre de nucleasse.....90

Figura 15 – Eletroforeses em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por nested PCR para ordem Piroplasmida. PPM: Padrão de tamanho molecular de 1Kb (Kasvi); Coluna 1: controle positivo *Babesia bigemina*; Colunas 2 a 4: amostras de cães domésticos com formação de banda na altura do fragmento esperado (430pb); Colunas: 5: controle negativo da reação, água livre de nuclease.....91

Gráfico 2 – Frequência dos índices de reatividade apresentados pelos soros de gatos domésticos soropositivos por ELISA.93

Quadro 4 - Resultados da coinfeção com SARS-CoV-2 e outros patógenos detectados cães e gatos domésticos provenientes de Belo Horizonte Minas Gerais no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.94

Quadro 5 – Resultados das combinações de infecção e/ou soropositividade detectadas em cães domésticos provenientes de Belo Horizonte, Minas Gerais no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.96

Quadro 6 – Resultados das combinações de infecção e/ou soropositividade detectadas em gatos domésticos provenientes de Belo Horizonte Minas Gerais no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.96

Gráfico 3 – Frequências de amostras positivas para hemopatógenos detectadas por método molecular em gatos do Parque Municipal Américo Rene Giannetti, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, entre fevereiro e setembro de 2021.....121

Gráfico 4 – Percentual de detecção de um patógeno, 2 ou mais patógenos e não detectados em gatos provenientes do Parque Municipal Américo Rene Giannetti, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, Fev-Set/2021.....122

Figura 16 – Eletroforeses em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por nested PCR para *Ehrlichia monocítica*. Linha 1: Padrão de tamanho molecular de 1kb (Kasvi); Coluna 2: controle positivo *Ehrlichia canis*; Colunas 2 a 13: amostras de gatos do PqMARG; Colunas 7 e 12: amostra com formação de banda na altura do fragmento esperado (443 pb); Coluna 14: controle negativo da reação, água livre de nucleasse.....123

Figura 17 – Eletroforeses em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por nested PCR para *Ehrlichia granulocítica* e plaquetas. Línea 1: Padrão de tamanho molecular de 100pb (Cellco); Coluna 2: controle positivo *Anaplasma phagophytophyllum*; Colunas 2: controle negativo da reação, água livre de nucleasse; Colunas 3 a 19: amostras de gatos do PqMARG; Coluna 3, 11, 13,16,18 e 19: amostra com formação de banda na altura do fragmento esperado (~546 pb).....124

Figura 18 – Eletroforeses em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por nested PCR para ordem Piroplasmida. Línea 1: Padrão de tamanho molecular de 100 bp (Cellco); Coluna 2: controle positivo; Colunas 2 a 19: amostras de gatos do PqMARG; Coluna 16: amostra com formação de banda na altura do fragmento esperado (430pb); Colunas: 20: controle negativo da reação, água livre de nucleasse.....125

Quadro 7 – Combinação de coinfeções com SARS-CoV-2 observada nos mamíferos pertencentes ao plantel da FPMZB no período compreendido entre Nov/2021-Mar/2023...170

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Detalhamento das espécies alvo do presente estudo e quantidade de indivíduos, por espécie.	63
Tabela 2 – Análise da idade de cães e gatos amostrados em Belo Horizonte, Minas Gerais, tendo em conta uma amostra total de 86 animais, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.	84
Tabela 3 – Frequência e percentual de amostras coletadas por swab orofaríngeo e retal e amostras positivas para SARS-CoV-2 por RT-qPCR, em cães e gatos, recolhida em Belo Horizonte Minas Gerais no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.	86
Tabela 4 – Resultados das amostras positivas para SARS-CoV-2 em cães analisadas nos Laboratórios TECSA e no Laboratório de Biologia Integrativa do ICB.	86
Tabela 5 – Resultados das amostras positivas para SARS-CoV-2 em gatos analisadas nos Laboratórios TECSA e no Laboratório de Biologia Integrativa do ICB.....	87
Tabela 6 – Frequência de hemopatógenos e <i>Toxoplasma gondii</i> detectados em 48 cães e 38 gatos domésticos provenientes de Belo Horizonte Minas Gerais, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.....	93
Tabela 7 – Associações estatísticas entre a infecção por SARS-CoV-2 e outros patógenos observadas nos cães e gatos domésticos provenientes de Belo Horizonte Minas Gerais no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.....	95
Tabela 8 – Frequência de patógenos em gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG, tendo em conta uma amostra total de 78 gatos, recolhida no período compreendido entre fevereiro e setembro 2021.....	124
Tabela 9 – Associações estatísticas entre a infecção por SARS-CoV-2 e outros patógenos em gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti (PqMARG).....	125
Tabela 10 – Associações estatísticas entre a infecção por SARS-CoV-2 e outros patógenos observadas em mamíferos do plantel da FPMZB no período de novembro de 2021 a março de 2023.....	171

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE– Agente de Combate a Endemias
ACE2– *Angioten- sin I Converting Enzyme 2*
AEGP– *Anaplasma/Ehrlichia* granulócitos e plaquetas
AVMA– *American Veterinary Medical Association*
AZ– Animais do Zoológico
BH– Belo Horizonte
BLAST– *Basic Local Alignment Search Tool*
CCZ– Centro de Controle de Zoonoses
CDC– *Centers for Disease Control and Prevention*
CEUA Comitê de Ética no Uso de Animais
CMhm– ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’
CMt– ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’
COVID-19 – *Coronavirus disease 2019*
CoVs– Coronavírus
CT– *Cycle threshold*
DNA– Ácido desoxirribonucleico
EDTA– *Ethylenediamine tetraacetic acid*
EGC– Ehrliquiose Granulocitotrópica Canina
ELISA– *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
EM– *Ehrlichia* monocítica
EMH– Ehrliquiose Monocítica Humana
EPIs– Equipamentos de Proteção
EUA– Estados Unidos da América
FAO– *Food and Agriculture Organization*
FCoV–Coronavírus Felino
FeLV– Vírus da Leucemia Felina
FIV– Vírus da Imunodeficiência Felina
FPMZB Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica
GAPDH– Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GP– Gatos do Parque
IBGE– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBV– Avian infectious bronchitis virus
ICB– Instituto de Ciências Biológicas
IFAT– *Immunofluorescence Antibody Test*
IFN- γ – Interferon-gama
IgG– Imunoglobulina G
IgM– imunoglobulina M
IR– Índice de Reatividade
ITS1– Internal transcribed spacer 1
LBI– Laboratório de Biologia Integrativa
LC– Leishmaniose tegumentar cutânea,
LCD– Leishmaniose tegumentar cutânea difusa
LF– Leishmaniose felina
LMC– Leishmaniose tegumentar mucocutânea
LV– Leishmaniose visceral
M– Molar

MAPA– Ministério da Agricultura e Pecuária
MERS– *Middle East Respiratory Syndrome*
MG– Minas Gerais
Mhf– *Mycoplasma haemofelis*
mL– Mililitros
MS– Mato Grosso del Sur
MS– Ministério da Saúde do Brasil
nCoV– novo Coronavírus
ND– Não definida
NGS– Next-Generation Sequencing
nm- Nanômetro
nPCR– Reação em cadeia de polimerase *nested*
OMS– Organização mundial da saúde
ONG– Organização não-governamental
OR– Odds Ratio
pb– Pares de base
PBH– Prefeitura de Belo Horizonte
PBS– *Phosphate Buffered Saline*
PBS-T– *Phosphate Buffered Saline with Tween*
PCR – *Polimerase Chain Reaction*
PE– Pernambuco
PIF– Peritonite Infecciosa Felina
PqMARG– Parque Municipal Américo Renné Giannetti
PR– Paraná
RBD– *Receptor-binding domain*
RFLP-PCR– *Restriction fragment length polymorphism* PCR
RIFI– Reação de Imunofluorescência Indireta
rRNA– Ácido ribonucleico ribossômico
RT-qPCR – *Real Time quantitative PCR*
SARS-CoV-2– *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*
SARS–*Severe Acute Respiratory Syndrome*
SES– Secretaria de Estado de Saúde
SP– São Paulo
SRD– Sem raça definida
SST– Solução Salina Tamponada
TAE = Tampão Tris-Acetato-EDTA
Taq– *Taq DNA Polimerase*
TGEV– Transmissible gastroenteritis coronavírus
UFMG– Universidade Federal de Minas Gerais
USDA– *United States Department of Agriculture*
VNTs– *Virus Neutralization Titers*
WOAH– *World Organisation for Animal Health*
µg– Micrograma
µL– Microlitro
µM– Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo geral	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
4.1. Coronavírus	25
4.2. Infecções por Coronavírus em Animais	26
4.3. SARS-COV-2	27
4.4. COVID-19	30
4.4.1. Infecção por SARS-CoV-2	30
4.4.2. Pandemia da COVID-19.....	31
4.4.3. Ocorrência de SARS-CoV-2 em animais	33
4.4.4. SARS-CoV-2 em animais de companhia.....	34
4.4.5. SARS-CoV-2 em animais selvagens	36
4.4.6. Impacto da Coinfecção por SARS-CoV-2 em Animais	39
4.4.7. Diagnóstico molecular do SARS-CoV- 2.....	40
4.4.8. Monitoramento de SARS-CoV-2 em animais na abordagem Uma Só Saúde.....	41
4.5. Hemopatógenos em animais.....	44
4.5.1. Bactérias.....	44
4.5.1.1. Família Anaplasmatidae.....	44
4.5.1.2. <i>Anaplasma</i>	45
4.5.1.3. <i>Ehrlichia</i>	46
4.5.1.4. Micoplasmas hemotrópicos.....	47
4.5.1.5. <i>Bartonella</i>	48
4.5.2. Protozoários	49
4.5.2.1. Ordem Piroplasmida.....	49
4.5.2.2. <i>Leishmania</i>	50
4.6. Diagnóstico de hemopatógenos	52
4.7. <i>Toxoplasma gondii</i>	53
5. MATERIAL E MÉTODOS	56
5.1. Considerações éticas.....	56
5.2. Área de estudo	57
5.2.1. Município Belo Horizonte	57

5.2.2.	Parque Municipal Américo Renné Giannetti de Belo Horizonte (PqMARG).....	57
5.2.3.	Jardim Zoológico da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte – (FPMZB-BH)	58
5.3.	Animais do estudo	58
5.3.1.	Origem dos animais do estudo	58
5.4.	Captura dos Animais e coleta de amostras sanguíneas.....	60
5.4.1.	Cães e gatos domésticos do projeto PetCOVID-19	60
5.4.2.	Gatos do PqMARG	61
5.4.3.	Mamíferos pertencentes ao Jardim Zoológico da FPMZB-BH	62
5.5.	Processamentos das amostras	64
5.6.	Análises laboratoriais	64
5.6.1.	Locais de realização das análises laboratoriais	64
5.7.	Análises moleculares	65
5.7.1.	Diagnóstico molecular de SARS-CoV-2	65
5.7.1.1.	Procedimentos de RT-qPCR Laboratórios TECSA	65
5.7.1.2.	Procedimento de RT-qPCR LBI	66
5.7.1.2.1.	Extração de RNA	66
5.7.1.2.2.	RT qPCR	66
5.7.1.2.3.	Sequenciamento do genoma viral	68
5.7.1.2.4.	Classificação da linhagem SARS-CoV-2 e análises filogenéticas.....	69
5.8.	Diagnóstico molecular dos hemopatógenos no Laboratório ProtoVet.....	69
5.8.1.	Extração de DNA.....	69
5.8.2.	Amplificação do DNA.....	70
5.8.3.	Diagnóstico molecular de <i>Leishmania</i> spp (Gatos do PqMARG).....	77
5.8.3.1.	PCR convencional.....	77
5.8.3.2.	Tipificação por PCR-RFLP.....	78
5.8.4.	Sequenciamento nucleotídico	78
5.8.5.	Análises filogenéticas	79
5.9.	Análises sorológicas para <i>Toxoplasma gondii</i>	79
5.9.1.	Preparo de antígeno de <i>T. gondii</i> para ELISA	79
5.9.2.	Ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA.....	80
5.10.	Análise dos dados	81
6.	RESULTADOS: CAPÍTULO 1	82
6.1.	Resultados dos animais oriundos do Projeto PetCOVID-19, Município Belo Horizonte	82
6.1.1.	Características da população estudada.....	83

6.1.2.	Detecção da infecção por SARS-CoV-2 nos animais do Projeto PetCOVID-19.	85
6.1.3.	Diagnóstico molecular de hemopatógenos	88
6.1.4.	ELISA para detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em cães e gatos.....	92
6.1.5.	Coinfecções e exposição a múltiplos patógenos.....	94
6.1.5.1.	Coinfecção com SARS-CoV-2.....	94
6.1.5.2.	Coinfecção entre os outros patógenos detectados.	95
6.1.6.	DISCUSSÃO	97
7.	RESULTADOS: CAPÍTULO 2	107
7.1.	Resultados dos animais oriundos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti em Belo Horizonte.....	107
7.1.1.	Artigo original publicado no periódico <i>Acta Tropica</i> sob DOI: 10.1016/j.actatropica.2023.107056.	108
7.1.2.	Resultados e discussão que não constam no artigo publicado.....	121
7.1.2.1.	Diagnóstico molecular de hemopatógenos.....	121
7.1.3.	DISCUSSÃO	125
8.	RESULTADOS: CAPÍTULO 3	130
8.1.	Resultados dos mamíferos cativos pertencentes ao Jardim Zoológico da FPMZB-BH 130	
8.1.1.	Características da população estudada.....	131
8.1.2.	Artigo 1 aceito para publicação na revista <i>Virology Journal</i> (in press). Vigilância do SARS-CoV-2 em animais cativos no Zoológico de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil... 132	
8.1.3.	Artigo 2 – Artigo submetido para publicação na Revista <i>Journal of Zoological and Botanical Gardens</i>	144
8.1.4.	Resultados e discussão que não constam nos artigos publicados	170
8.1.4.1.	Coinfecção com SARS-CoV-2.....	170
8.1.5.	DISCUSSÃO	171
9.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	174
10.	CONCLUSÕES	177
	REFERÊNCIAS	179
	ANEXO 1	224
	ANEXO 2	225
	ANEXO 3	226
	ANEXO 4	228
	ANEXO 5	230
	ANEXO 6	232
	ANEXO 7	233

ANEXO 8.....237
ANEXO 9.....240

1. INTRODUÇÃO

As zoonoses representam uma preocupação significativa para a saúde pública. Cerca de 60% dos patógenos emergentes que afetam os seres humanos têm origem em animais, dos quais mais de 71% provêm da vida selvagem. Esses patógenos possuem a capacidade de se adaptar e mudar de hospedeiros, adquirindo novas variantes genéticas que podem aumentar seu potencial patogênico. Fatores como mudanças no comportamento humano, nas características socioeconômicas, ambientais ou ecológicas dos hospedeiros podem influenciar a transmissão desses patógenos (Cutler; Fooks; Poel, 2010).

O SARS-CoV-2, um coronavírus de origem zoonótica, foi detectado pela primeira vez em humanos na China, no final de 2019. A transmissão entre humanos levou à pandemia de COVID-19 (WHO, 2020), e as primeiras especulações sobre a origem do surto foram associadas a um mercado em Wuhan que vendia animais silvestres vivos (Zhu *et al.*, 2020). Além de seu grande impacto em humanos, animais domésticos e silvestres também podem ser infectados pelo vírus (Halfmann *et al.*, 2020), embora o papel desses animais na transmissão e manutenção do SARS-CoV-2 ainda seja pouco compreendido (OIE, 2020; Deng *et al.*, 2020).

Os primeiros casos de animais positivos para SARS-CoV-2 foram relatados em um gato e dois cães em Hong Kong e em outro gato na Bélgica (AVMA, 2020). Desde então, órgãos como o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e a WOAAH têm publicado atualizações frequentes sobre animais positivos para SARS-CoV-2 (Garigliany *et al.*, 2020; Barrs *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020; Klaus *et al.*, 2021; Palmer *et al.*, 2021; Jairak *et al.*, 2022; Fernández-Bastit *et al.*, 2022; Kuhlmeier *et al.*, 2022; Bellinati *et al.*, 2022). Estima-se que espécies como furões e gatos são altamente suscetíveis ao SARS-CoV-2, enquanto cães apresentam menor suscetibilidade, levantando questões sobre o papel desses animais como reservatórios (Shi *et al.*, 2020; Sharun *et al.*, 2021).

No Brasil, relatos de SARS-CoV-2 em animais domésticos incluem gatos e cães errantes positivos para anticorpos neutralizantes (Dias *et al.*, 2021), além de animais que testaram positivo por RT-qPCR (Epifanio *et al.*, 2021; Agopian *et al.*, 2022). Mais recentemente, estudos identificaram a presença de anticorpos em cães e gatos através de testes de ELISA e soroneutralização (Jarrah *et al.*, 2023). Animais silvestres também foram relatados como infectados, incluindo tamanduás-bandeira e saguis (WOAH, 2022).

Além do SARS-CoV-2, os hemopatógenos constituem uma categoria importante de patógenos sanguíneos, que afetam tanto animais domésticos quanto silvestres e podem resultar em doenças graves (Losos, 1986). Transmitidos principalmente por vetores hematófagos, esses patógenos incluem microrganismos como *Babesia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., hemoplasmas, *Bartonella* spp. e *Leishmania* spp., podendo comprometer o sistema imunológico dos hospedeiros (Kassab, 2021).

Por sua vez, *Toxoplasma gondii*, causador da toxoplasmose, é um parasito de alta prevalência em seres humanos e uma grande diversidade de animais. Em humanos imunocomprometidos, a toxoplasmose pode causar complicações severas, e a detecção desse parasito em animais, particularmente em áreas urbanas, é de grande importância. A sorologia para *Toxoplasma gondii* é fundamental para avaliar a exposição desses animais ao parasito, complementando a compreensão sobre a interação entre essas infecções e a imunossupressão associada (Bachand *et al.*, 2019). Nesse contexto, destaca-se a relevância de investigar possíveis coinfeções entre *Toxoplasma gondii* e hemopatógenos (*Babesia* spp, *Anaplasma* spp, *Ehrlichia* spp, Micoplasmas hemotrópicos, *Bartonella* spp. e *Leishmania* spp) em animais domésticos e silvestres, visto que essas infecções podem alterar a resposta imune dos animais e aumentar sua suscetibilidade a outras infecções, inclusive ao SARS-CoV-2.

2. JUSTIFICATIVA

A pandemia de COVID-19 trouxe à tona a necessidade urgente de entender melhor a interação entre humanos, animais e o ambiente, especialmente no contexto de "Uma Só Saúde", que integra a saúde humana, animal e ambiental. Embora haja relatos crescentes de infecção por SARS-CoV-2 em animais, tanto domésticos quanto silvestres, ainda existem lacunas significativas no entendimento sobre a dinâmica dessa transmissão em diferentes populações animais. No Brasil, a proximidade entre pessoas e animais, em especial animais de companhia e silvestres em cativeiro, ressalta a importância de investigar como esses grupos podem atuar como potenciais reservatórios do vírus, contribuindo para a circulação e possível evolução de variantes virais.

Este estudo tem relevância não apenas para a pesquisa básica, ao aprofundar o conhecimento sobre a infecção por SARS-CoV-2 em populações animais, mas também para a pesquisa aplicada, ao fornecer dados críticos para o desenvolvimento de estratégias de prevenção,

monitoramento e controle de zoonoses. Além disso, investiga-se o papel das coinfeções parasitárias, amplamente presentes nas populações estudadas, como possível fator de risco para a infecção viral, já que estas podem comprometer o sistema imunológico dos animais, aumentando sua susceptibilidade ao SARS-CoV-2. A integração desses conhecimentos contribui diretamente para políticas públicas e ações de vigilância epidemiológica no contexto de "Uma Só Saúde", especialmente em tempos de pandemia.

Essa abordagem é essencial para antecipar e mitigar possíveis surtos zoonóticos futuros, oferecendo uma compreensão abrangente das interações patogênicas entre vírus e parasitas em populações animais que convivem em proximidade com humanos. Assim, este estudo se propõe a preencher uma lacuna crítica na literatura e apoiar ações de saúde pública que envolvem tanto o controle de zoonoses quanto a preservação da saúde animal e ambiental.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a ocorrência de infecção por SARS-CoV-2 e outros patógenos em mamíferos domésticos e silvestres no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, com foco na vigilância epidemiológica e na abordagem integrada de Saúde Única, bem como identificar coinfeções e possíveis associações entre esses patógenos.

3.2. Objetivos específicos

- Detectar a infecção por Sars-CoV-2 nos mamíferos domésticos e silvestres no município de Belo Horizonte;
- Sequenciar e identificar estirpes de SARS-CoV-2 circulantes nos mamíferos domésticos e silvestres no município de Belo Horizonte;
- Traçar relações filogenéticas entre genomas de SARS-CoV-2 obtidos;
- Detectar molecularmente hemopatógenos dos gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Mycoplasma* hemotrópico, *Bartonella*, *Babesia*, *Theileria*, *Cytauxzoon* e *Leishmania* nos mamíferos domésticos e silvestres no município de Belo Horizonte;
- Caracterizar filogeneticamente os hemopatógenos detectados nos animais;
- Determinar a soroprevalência de *Toxoplasma gondii* nos animais domésticos e gatos do PQMARG no município de Belo Horizonte.
- Avaliar as coinfeções nos animais amostrados.
- Verificar possíveis associações de infecção por SARS-CoV-2 e hemopatógenos e parasitos nos animais amostrados;

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Coronavírus

Os coronavírus (CoVs) são membros de uma grande família de vírus que causam infecções respiratórias e gastrointestinais, a Coronaviridae (ordem Nidovirales), descrita desde finais dos anos de 1930 em animais de importância veterinária, e isolados pela primeira vez no homem no final dos anos de 1960 (Paules *et al.*, 2020; Gräf, 2020). Os representantes deste grupo adquirem seu nome pela aparência que apresentam na microscopia eletrônica, pois é muito parecido com uma coroa de espinhos devido à presença de projeções de proteínas de superfície ao redor do vírus (Weiss and Navas, 2005).

Os CoVs são vírus envelopados cujo genoma é composto por ácido ribonucleico (RNA) não segmentado de fita simples com sentido positivo (Ksiazek *et al.* 2003; ECDC technical report, 2020), capazes de infectar hospedeiros de diferentes ordens: de invertebrados a aves e mamíferos (Masters e Perlman, 2013). A partícula viral dos CoVs possui um envelope esférico lipídico com três proteínas, sendo elas: E (envelope), M (membrana) e S (proteína do tipo spike) que promovem a entrada celular destes vírus, ligando-se ao receptor e facilitando sua fusão com a membrana celular. Internamente há um capsídeo de simetria helicoidal, constituído pela proteína nucleocapsídeo (N) ligada ao genoma viral. A proteína N é a única presente no nucleocapsídeo; acredita-se que participe na replicação do material genético viral na célula e no seu empacotamento em partículas virais. Ainda não estão bem estabelecidas as funções das proteínas M e E, considera-se que elas poderiam participar da montagem e liberação do vírion (Díaz-Castrillón e Toro-Montoya, 2020).

Os coronavírus são divididos em duas subfamílias: Letovirinae e Orthocoronavirinae, esta última subdividida em quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* sendo que cada gênero pode levar a diferentes doenças, em diferentes espécies de animais e nos seres humanos (Chang *et al.*, 2019; Pal *et al.*, 2020; Khalil e Khalil, 2020). *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* infectam somente mamíferos, enquanto *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* infectam aves, ainda que alguns também infectam mamíferos (Woo *et al.* 2012). Até o momento, seis espécies de coronavírus foram descritas como infecciosas para os humanos, quatro pertencentes ao *Betacoronavirus* e duas ao gênero *Alfacoronavirus*. O *Betacoronavirus* SARS-CoV-2 é o segundo coronavírus descrito dentro da espécie "Severe acute

respiratory syndrome-related coronavirus " (Gorbalenya *et al.*, 2020) a causar surto de doenças de alto impacto.

Em 2002-2003, um surto de SARS (Síndrome Respiratória Aguda Grave) causou preocupação em todo o mundo, com casos relatados em vários países, incluindo China, Hong Kong e Canadá. O surto de SARS infectou mais de 8.000 pessoas e causou mais de 700 mortes em todo o mundo (Peiris *et al.*, 2003). Em 2012, um novo coronavírus, o MERS-CoV (Síndrome Respiratória do Oriente Médio), surgiu na Arábia Saudita e se espalhou para outros países do Oriente Médio, África, Ásia e Europa. O surto de MERS causou 2.494 casos e 858 mortes até 2021 (Al-Mulla *et al.*, 2021). Mas recentemente, em 2019, um novo surto de coronavírus (SARS-CoV-2) começou na cidade de Wuhan, na China, e se espalhou para se tornar uma pandemia global que afetou milhões de pessoas em todo o mundo. A COVID-19, a doença causada pelo vírus, já causou mais de 775 milhões de casos confirmados e mais de 7 milhões de mortes em todo o mundo até agosto de 2024 (WHO, 2024).

4.2. Infecções por Coronavírus em Animais

As infecções por coronavírus em animais são bastante comuns e afetam diversas espécies, incluindo aves, suínos, bovinos caninos e felinos. Essas infecções podem causar desde sinais clínicos leves, como resfriados, até doenças graves, como gastroenterite e síndromes respiratórias agudas (Woo *et al.*, 2014; Decaro and Lorusso, 2020; Licitra *et al.* 2020).

"Entre os coronavírus animais mais conhecidos estão o coronavírus suíno transmissível (TGEV), o coronavírus aviário (IBV), o coronavírus felino (FCoV) e o coronavírus canino (CCoV). Esses vírus são responsáveis por doenças respiratórias e gastrointestinais em suínos, aves, gatos e cães, respectivamente (Licitra *et al.*, 2014; Poudel *et al.* 2020; Larusso *et al.*, 2020), sendo causadores de uma variedade de sinais clínicos em animais, que podem ser desde leves até graves e potencialmente fatais. Os sintomas específicos dependem do tipo de coronavírus, da espécie animal afetada e do estágio da doença. O TGEV, por exemplo, pode causar diarreia grave em suínos jovens, enquanto o IBV pode causar infecções respiratórias e gastrointestinais em aves. Já o FCoV pode causar uma variedade de doenças em gatos (*Felis catus*), incluindo a peritonite infecciosa felina (PIF), que é uma doença inflamatória grave que afeta vários órgãos. A infecção por coronavírus em cães geralmente afeta apenas o trato entérico, causando enterite leve ou

assintomática e se resolve por conta própria (Licitra *et al.*, 2013; Decaro and Buonavoglia, 2018; Poudel *et al.*, 2020).

Vários estudos relataram a detecção de coronavírus em animais. Em Portugal, no início de 2015, descreveu-se um surto de diarreia aguda em vários suínos com uma propagação rápida para o norte do território. Das 44 granjas suínas que notificaram diarreias aquosas graves, detectou-se RNA de TGEV em 32 (72,7 %). Os sinais clínicos observados nos suínos infectados foram consistentes com aqueles tipicamente associados à infecção por TGEV, incluindo diarreia, vômito e desidratação (Mesquita *et al.*, 2015). Um estudo na região sudeste do Brasil realizou uma análise retrospectiva da presença de CoVs em 746 aves silvestres e documentou a presença de CoVs aviários relacionados às famílias gama e Delta circulando em regiões urbanas e avícolas do Brasil (Barbosa *et al.*, 2019). Em outro estudo realizado em São Paulo, foram coletadas 151 amostras de gatos domiciliados; essas amostras mostraram uma taxa de positividade de coronavírus felino (FCoV) de 64,2% (97/151) no ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-FCoV (Almeida *et al.*, 2019).

Estudos recentes têm se concentrado na caracterização genética e patogênese dos coronavírus animais, bem como na identificação de novas espécies de coronavírus em animais silvestres (Lau *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2017; Cui *et al.* 2019).

4.3. SARS-COV-2

Os coronavírus animais também podem causar doenças zoonóticas, ou seja, transmitidas dos animais para os seres humanos. Foi o caso do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), que foi transmitido de morcegos para civetas e posteriormente para humanos em 2002, e do coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), que foi transmitido de camelos para humanos em 2012 (Woo *et al.*, 2009; Cui *et al.* 2019).

SARS-CoV-2 é o agente causador da doença coronavírus 2019 (COVID-19), que se espalhou rapidamente pelo mundo desde o final de 2019 (Zhou *et al.*, 2020). A origem exata do SARS-CoV-2 ainda não foi completamente esclarecida, mas estudos sugerem que ele possa ter uma origem zoonótica. Acredita-se que morcegos sejam os hospedeiros naturais do vírus, e que ele tenha sido transmitido aos seres humanos por meio de um animal intermediário, como o pangolim (Lam *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020; Xiao *et al.*, 2020). Análises genéticas do vírus indicam que o vírus está agrupado dentro do subgênero *Sarbecovirus*, que faz parte do gênero *Betacoronavirus*,

e ele tem semelhanças com outros coronavírus encontrados em morcegos e em outros animais, como os coronavírus que causaram a SARS (síndrome respiratória aguda grave) e a MERS (síndrome respiratória do Oriente Médio) em humanos, com os quais compartilham um 79% e 50% de identidade de sequência genômica, respectivamente. No entanto, ainda não está claro como exatamente o SARS-CoV-2 surgiu e se espalhou para se tornar uma pandemia global (Wu *et al.*, 2020; Lu *et al.* 2020).

SARS-CoV-2 possui o "*Bauplan*" tradicional dos Orthocoronavirinae. Isso significa que a sua estrutura geral, organização genômica e ciclo de replicação são semelhantes aos demais coronavírus que pertencem a essa subfamília (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020; Yao *et al.*, 2020). Como membro da família Coronaviridae, SARS-CoV-2 possui um tamanho de partícula de aproximadamente 125 nanômetros de diâmetro com cerca de 29.903 nucleotídeos, que codifica para cerca de 27 proteínas diferentes e sua estrutura é composta por as quatro proteínas principais: proteína do envelope (E), proteína da membrana (M), proteína spike (S) e proteína nucleocapsídeo (N). Entre essas proteínas estruturais, a proteína S é crítica para a entrada do vírus mediado por receptor em células suscetíveis. O domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína S se liga à enzima conversora de angiotensina-2 (ACE2) na superfície das células, facilitando a entrada do vírion (Hoffmann, *et al.*, 2020). *In vitro*, foi demonstrado que ACE2 de até 44 mamíferos se une ao RBD (Liu *et al.*, 2020). Além dessas proteínas estruturais, o genoma do SARS-CoV-2 também contém vários quadros de leitura abertos (ORFs) que codificam para proteínas não estruturais, que são importantes para a replicação viral e modulação da resposta imune do hospedeiro (Walls *et al.*, 2020; Weiss and Leibowitz, 2020).

O genoma do SARS-CoV-2 é altamente conservado em relação aos outros coronavírus (CoVs). Ele possui cerca de 30 kilobases e mantém a ordem das principais regiões codificadoras: replicase (ORF1ab), seguida pelas proteínas spike (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N). A taxa de mutação é de 2 nucleotídeos por mês (Lu *et al.*, 2020). Mais de 72% do genoma codifica a proteína ORF1ab, que geram 16 proteínas não-estruturais. A proteína do nucleocapsídeo (N) é a mais expressa, de acordo com pesquisas transcriptômicas, seguida pelas regiões S, 7a, 3, 8, M, E, 6 e 7b (Figura 1). Comparado à linhagem RmYN02, regiões como ORF1ab, 3a, E, 6, 7a, N e 10 têm mais de 96% de similaridade, enquanto a região S mostra 71,8% de similaridade, caindo para 62,4% no RBD (Zhou *et al.*, 2020).

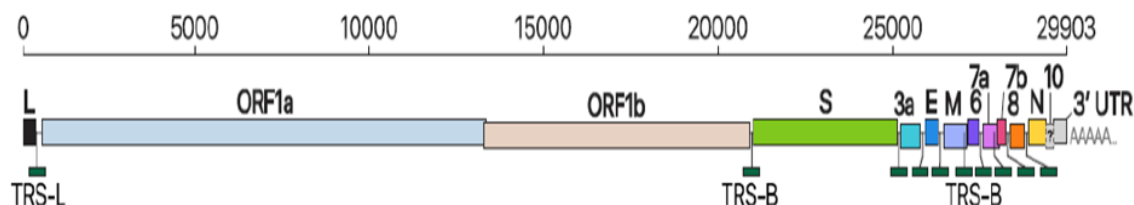


Figura 1 - Representação esquemática do genoma do SARS-CoV-2. As regiões codificadoras principais, incluindo ORF1ab, S, 3a, E, M, 6, 7a, 7b, 8, N e 10, assim como as sequências reguladoras de transcrição (TRSs), são destacadas em diferentes cores, conforme a ordem em que aparecem no genoma. (adaptado de Kim *et al*, 2020)

O ciclo de replicação do SARS-CoV-2 segue o padrão observado em outros coronavírus. Primeiro, o vírus entra nas células hospedeiras através da proteína Spike. Em seguida, ocorre a liberação do material genético viral no citoplasma da célula, seguida pela tradução e replicação do genoma viral. Por fim, há a montagem das novas partículas virais e sua liberação a partir da célula hospedeira (Zhang *et al.* 2020; Fiuza *et al.*, 2020). Embora o SARS-CoV-2 possua a mesma estrutura básica que outros coronavírus da família Coronaviridae, Subfamília Orthocoronaviridae, há algumas diferenças específicas em sua sequência genômica e em sua proteína spike que o tornam particularmente transmissível e patogênico em humanos (Hoffmann *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020). Estudos recentes sobre a patogenia do vírus indicam que a proteína ACE-2 do vertebrado atua como um receptor para aderência viral e fusão da membrana, permitindo a interação entre SARS-CoV-2 e o hospedeiro (Morais *et al*, 2020).

O sequenciamento genético do vírus tem sido fundamental para a identificação e monitoramento das variantes. À medida que o SARS-CoV-2 se espalha e se replica, podem ocorrer mutações em seu material genético (Lauring, Hodcroft, 2021). Essas mutações podem levar ao surgimento de variantes do vírus com características diferentes. Alguns exemplos conhecidos de variantes do SARS-CoV-2 incluem a variante Alfa (B.1.1.7), a variante Beta (B.1.351), a variante Gama (P.1) e a variante Delta (B.1.617.2). Essas variantes podem apresentar diferenças em termos de transmissibilidade, gravidade da doença ou resposta a tratamentos ou vacinas (Callaway, 2021; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2021; WHO, 2021)

Fatores específicos relacionados à virulência e os mecanismos moleculares subjacentes também têm sido estudados. Por exemplo, mutações na proteína Spike, especialmente no domínio

de ligação ao receptor (RBD), podem aumentar a afinidade do vírus pelo receptor ACE2 nas células hospedeiras, facilitando a entrada viral e aumentando a transmissibilidade. Além disso, algumas mutações podem ajudar o vírus a escapar da resposta imunológica, tornando as vacinas e os tratamentos menos eficazes. Estudos também apontam que a variante Delta (B.1.617.2) tem mutações que podem estar associadas a uma maior replicação viral e uma maior carga viral em indivíduos infectados, o que pode contribuir para uma maior transmissibilidade e possivelmente uma maior gravidade da doença (Liu *et al.*, 2021; Plante *et al.*, 2021).

A filogenia, filodinâmica e filogeografia são usadas nos estudos de evolução e disseminação geográfica do vírus, permitindo traçar as relações entre diferentes linhagens e entender como as variantes surgiram e se espalharam globalmente (Rambaut *et al.*, 2020). Essas informações são valiosas para orientar medidas de saúde pública, desenvolvimento de vacinas e adaptação de estratégias de controle da doença. É importante ressaltar que a pesquisa sobre o SARS-CoV-2 e suas variantes está em constante evolução. Novas variantes podem surgir à medida que o vírus continua se replicando e se espalhando (WHO, 2021).

4.4.COVID-19

4.4.1. Infecção por SARS-CoV-2

A COVID-19, uma doença provocada pelo SARS-CoV-2, é transmitida de indivíduo para indivíduo por meio das vias respiratórias superiores, principalmente por gotículas respiratórias expelidas durante a tosse, espirro ou fala de uma pessoa infectada. A doença pode causar uma ampla variedade de sintomas, desde sintomas leves semelhantes aos de um resfriado até doenças respiratórias graves, como pneumonia e síndrome respiratória aguda grave (SARS) (CDC, 2021, Guan *et al.*, 2020). Ao atingir as células pulmonares, o SARS-CoV-2 desencadeia uma forte resposta imunológica que causa inflamação dos sacos aéreos dos pulmões, conhecidos como alvéolos. A diminuição do número de linfócitos T devido à infecção e a apoptose dessas células causada pela resposta inflamatória podem levar à obstrução dos alvéolos afetados, levando ao desenvolvimento de um quadro semelhante à pneumonia. A gravidade da pneumonia, que pode evoluir para Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), depende de múltiplos fatores da infecção, como o grau de obstrução alveolar, o grau de obstrução em cada alvéolo e o sistema

imunológico e as características fisiológicas do hospedeiro (Rabaan *et al.*, 2020; Wiersinga *et al.*, 2020).

Clinicamente, os sintomas da COVID-19 começam em média cinco dias após a exposição ao vírus. Os sintomas iniciais são geralmente leves e podem incluir febre, tosse seca, fadiga, dor de garganta, dor de cabeça e perda de olfato ou paladar. É importante notar, no entanto, que muitas pessoas infectadas com SARS-CoV-2 podem ser assintomáticas ou apresentar sinais clínicos brandos, tornando a detecção e o controle da doença um desafio (Oran, Topol, 2020). À medida que a infecção progride, alguns pacientes podem desenvolver sintomas mais graves, como falta de ar, dor no peito e confusão mental. Esses sintomas podem indicar a progressão da doença para uma fase mais crítica, que pode evoluir para a Síndrome Aguda Respiratória Grave (SARS). Nessa fase grave, os pacientes podem necessitar de suporte ventilatório, como o uso de respiradores artificiais, devido à dificuldade respiratória significativa. Além dos sintomas respiratórios, a COVID-19 também pode afetar outros sistemas do corpo como: o gastrointestinal, o cardiovascular, e o neurológico (Guan *et al.*, 2020). Fatores como a idade do paciente, suas condições de saúde pré-existent e a presença de comorbidades são determinantes no curso da COVID-19. (Wu, McGoogan, 2020).

4.4.2. Pandemia da COVID-19

A pandemia da COVID-19 foi uma crise de saúde global causada pela disseminação do vírus SARS-CoV-2. O primeiro caso conhecido de COVID-19 ocorreu em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, na China. Desde então, a doença se espalhou rapidamente para outros países e se tornou uma pandemia global (Wu, McGoogan, 2020). Em janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 uma emergência de saúde pública de preocupação internacional e, em março de 2020, a pandemia foi declarada. A partir de então, os casos de COVID-19 e as mortes relacionadas à doença, continuaram a aumentar em todo o mundo (Guo *et al.* 2020). Até agosto de 2024, a COVID-19 resultou em aproximadamente 775 milhões de casos confirmados e mais de 7 milhões de mortes em todo o mundo (WHO, 2024). No entanto, a taxa de mortalidade varia de país para país e pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a idade média da população, a qualidade dos sistemas de saúde e as medidas de contenção implementadas pelos governos (Verity *et al.*, 2020; Williamson *et al.*, 2020). A taxa de letalidade global da

COVID-19 tem sido estimada em cerca de 2-3%, mas varia amplamente entre os países (Cao *et al.*, 2020).

O Brasil teve uma propagação significativa do vírus desde o início da pandemia. De acordo com dados do Ministério da Saúde do Brasil (MS), o país registrou um total de mais de 38 milhões de casos confirmados e mais de 712 mil mortes relacionadas à COVID-19 desde o início da pandemia (MS, 2024). O primeiro caso confirmado de infecção pelo SARS-CoV-2 no país foi registrado em 26 de fevereiro de 2020 na cidade de São Paulo (SP), em um homem de 61 anos que havia retornado de uma viagem à Itália (Aquino *et al.*, 2020). A taxa de letalidade por COVID-19 no Brasil até 2023 foi aproximadamente de 2% (Brasil COVID, 2023). No entanto, esses números podem subestimar a verdadeira extensão da pandemia no país, devido à subnotificação de casos e mortes, bem como a problemas na coleta e análise de dados, pois o país não adotou estratégias amplas de testagem na população (Aquino *et al.*, 2020; Szwarcwald *et al.*, 2022). O Brasil também enfrentou desafios no combate à pandemia, incluindo a disseminação de informações falsas, a resistência à vacinação e a falta de coordenação entre os governos federal, estadual e municipal (Szwarcwald *et al.*, 2022).

Minas Gerais é o segundo maior estado em termos de população no Brasil e encontra-se fortemente conectado aos estados de São Paulo e Rio de Janeiro com os quais faz divisa, ambos estados de importante atividade econômica do país e com uma alta incidência na transmissão da COVID-19. Fatores que desde o ponto de vista epidemiológico fazem com que o estado seja vulnerável à COVID-19 (Menezes, 2021). Segundo o IBGE, em 2022 a população era de 20 539 989 pessoas. O estado de Minas Gerais e sua capital, Belo Horizonte, foram profundamente impactados pela pandemia de COVID-19. Desde o início da pandemia, em março de 2020, Minas Gerais tem registrado mais de 4 milhões de casos confirmados e mais de 66 mil mortes relacionadas à COVID-19. A taxa de letalidade da doença em Minas Gerais foi de cerca de 2,6%. A cidade de Belo Horizonte, capital do estado, com uma população de 2.530.701 habitantes, também foi bastante afetada pela pandemia. No município, foram registrados mais de 921 mil casos confirmados e mais de 17 mil mortes relacionadas à COVID-19. A taxa de letalidade na cidade foi de cerca de 2,3% (IBGE, 2022; SES-MG, 2024; MS, 2024).

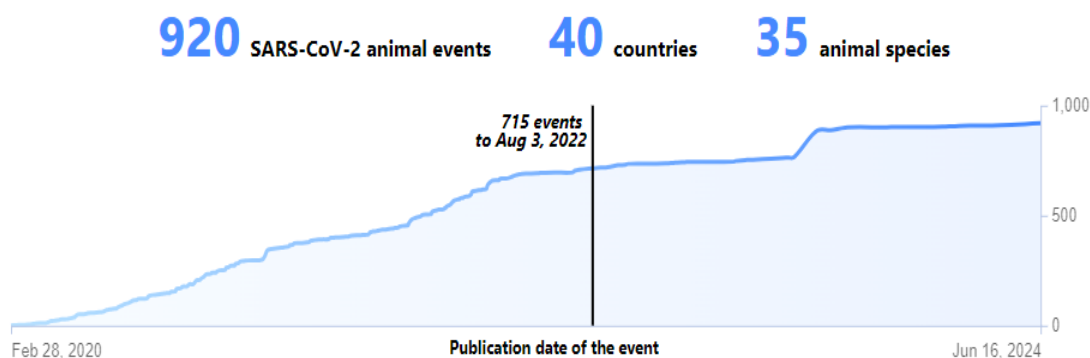
4.4.3. Ocorrência de SARS-CoV-2 em animais

O SARS-CoV-2 teve uma propagação rápida por todo o mundo, com altos níveis de circulação entre humanos. Durante o período de pandemia, vários estudos confirmaram a transmissão do SARS-CoV-2 de humanos para animais que compartilham o mesmo ambiente, destacando a necessidade de vigilância no contexto “*One Health*” ou Uma Só Saúde (Zhang *et al*, 2020; Hossain *et al.*, 2020; Conselho Consultivo Europeu sobre Doenças de Gatos (ABCD), 2020).

Dada a suposta origem zoonótica do SARS-CoV-2, a identificação de espécies animais suscetíveis, reservatórios e rotas de transmissão são tópicos de interesse público e científico global. O estabelecimento de reservatórios de infecção em animais criaria desafios significativos para o controle da infecção humana e poderia representar uma ameaça ao bem-estar e ao estado de conservação da vida animal (Delahay *et al.*, 2021).

Até junho de 2024, 40 países relataram 920 eventos de infecção por SARS-CoV-2 em 35 espécies animais (Figura 2). Embora a maioria das infecções seja relatada em animais de companhia, surtos também foram relatados em fazendas organizadas de visons, zoológicos e animais silvestres (Kumar *et al.* 2022).

Figura 2- Número de eventos, países e espécies relatados de SARS-CoV-2 em animais.



Fonte: Imagem do A Global Open Access Dataset of Reported SARS-CoV-2 Events in Animals. Last update: June 16, 2024

4.4.4. SARS-CoV-2 em animais de companhia

Cães e gatos domiciliados estão em contato permanente com os seus tutores e existem milhares de famílias que têm um ou outro na residência. Como resultado desse contato próximo, a Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH) relatou casos de animais de estimação com teste positivo para COVID-19 (Frazzini *et al.*, 2022). Segundo estudo recente, o risco de infecção para animais de companhia que vivem em residências com pessoas COVID-19 positivo é até oito vezes maior do que para animais de estimação sem exposição (Fritz *et al.*, 2021).

Os primeiros cães com teste positivo para COVID-19 foram identificados em Hong Kong entre fevereiro e março de 2020. O primeiro caso ocorreu em um cão macho castrado da raça Pomerânia, com 17 anos de idade e comorbidades, que testou positivo para SARS-CoV-2 em um teste de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). O cão pertencia a uma pessoa que havia sido diagnosticada com COVID-19, e as autoridades em Hong Kong acreditavam que o cão teria sido infectado pelo seu proprietário, tratando-se de uma possível transmissão de zoonose inversa. Foram coletados swabes nasais, orais e retais, além de uma amostra fecal para teste de covid-19. O animal apresentou teste fraco positivo para o vírus em amostras nasais e orais, as amostras retais e fecais foram negativas, assim como a tentativa de cultura do vírus que também não teve sucesso devido à baixa carga viral do animal. O sequenciamento genético do vírus isolado do cão e das pessoas residentes no domicílio foi altamente semelhante, indicando uma possível transmissão do vírus de humanos para o animal, mesmo sem o cão apresentar sintomas da doença. O segundo caso, um pastor alemão macho de dois anos e meio de idade com boa saúde, de uma residência em que o proprietário foi diagnosticado com COVID-19, também foi positivo para o RNA de SARS-CoV-2 em RT-qPCR, enquanto outro cão que habitava na mesma casa resultou negativo (AFCD, 2021; Sit *et al.*, 2020; WOAH, 2021; CDC, 2021)

Ainda em Hong Kong, 17 cães e 08 gatos de tutores positivos para a COVID-19 foram testados e a positividade foi confirmada em dois cães e um gato por ensaios moleculares e sorológicos, e o vírus foi isolado em um caso. Nenhum dos animais testados no estudo apresentou sinais clínicos da doença (ProMed-mail, 2020; Sit *et al.* 2020).

Em Wuhan, de janeiro a março de 2020, gatos foram investigados quanto à infecção por SARS-CoV-2 durante o surto de COVID-19 usando métodos sorológicos. Foram coletadas 102 amostras após o surto de COVID-19 e 39 antes do surto. 15 de 102 gatos testaram positivo por

ELISA e outros 11 apresentaram anticorpos neutralizantes (VNTs) para SARS-CoV-2, mostrando que gatos foram infectados pelo SARS-CoV-2 em Wuhan durante o surto (Zhang *et al.*, 2020).

Na Bélgica, em março de 2020, foi detectado RNA viral de SARS-CoV-2 em um gato, uma semana após seu proprietário testar positivo para COVID-19. O gato apresentou sinais respiratórios e gastrointestinais sugestivos de COVID-19, além de ter eliminado o vírus nas fezes e fluido gástrico. Durante a fase convalescente, foram encontradas imunoglobulinas contra o vírus em seu soro, reforçando que o gato foi infectado pelo SARS-CoV-2, desenvolveu a doença e conseguiu se recuperar. Este estudo sugere a possibilidade de transmissão do vírus do humano para o gato (Garigliany *et al.* 2020).

Em abril de 2020, o USDA e o CDC divulgaram a notícia de que dois gatos de estimação em Nova York testaram positivo para SARS-CoV-2 por RT-qPCR. Os gatos em questão viviam em duas áreas diferentes do estado de Nova York e apresentaram sinais leves de doença respiratória, ambos com espirros e coriza. O informe sugere que os gatos foram infectados por pessoas em suas casas ou em suas vizinhanças. Ambos gatos se recuperaram completamente da doença (CDC, 2020; UDCA, 2020).

Embora a maioria dos relatos de casos de gatos e cães positivos para SARS-CoV-2 seja de proprietários positivos para COVID-19, animais sem contato próximo com humanos também podem estar expostos à infecção pelo vírus. Neste sentido, um estudo realizado no Irã no início da pandemia testou 14 gatos e 08 cães errantes capturados em áreas próximas a hospitais utilizados para internação de pacientes com COVID-19. Embora o estudo não tenha conseguido estabelecer uma conexão direta entre esses animais de estimação e os hospitais, verificou-se que 14 (63,64%) dos 22 animais de estimação testaram positivo para COVID-19 por teste molecular (8 gatos e 5 cães), dos quais sete (31,8%) apresentaram sinais respiratórios leves, como tosse e espirros (Farnia *et al.*, 2020).

Além dos relatos de casos, os resultados das pesquisas experimentais indicam que o vírus SARS-CoV-2 se reproduz mais rapidamente em gatos do que em cães. Estes últimos apresentam baixa suscetibilidade para contrair e transmitir o vírus. Por sua vez, os gatos podem apresentar cargas virais elevadas tanto no palato, amígdalas, traquéia e pulmões, observando danos semelhantes aos casos fatais em humanos. Os resultados também demonstraram que há transmissão do vírus de gato a gato (Shi *et al.* 2020).

Descobertas recentes indicam que animais domésticos, como cães e gatos, são suscetíveis a variantes de SARS-CoV-2 identificadas em humanos (Ferasin *et al.* 2021; Gauntt 2021; Grimm 2021). No Texas, Estados Unidos, os primeiros casos de infecção por SARS-CoV-2 com a variante do Reino Unido (B.1.1.7) foram relatados em um gato doméstico e um cão Labrador vivendo na mesma casa com uma pessoa positiva para COVID-19. Embora os animais não apresentassem nenhum sinal clínico no momento das coletas, semanas depois ambos apresentaram sinais respiratórios leves como espirros (Gauntt, ,2021).

Na tentativa de evitar a infecção por SARS-CoV-2 nos animais de estimação e o abandono deles, a WOAHA recomenda que as pessoas que estão infectadas com o SARS-CoV-2, limitem o contato com seus animais de estimação. Se for possível, outra pessoa deve cuidar dos animais enquanto o doente se recupera. Deve-se garantir uma boa higiene, como lavar as mãos antes e depois de interagir com eles. Em áreas onde o vírus está circulando amplamente na comunidade, é aconselhável manter os animais de estimação em ambientes internos ou restritos, evitando o contato. Até o momento, não há evidências de que animais de estimação possam desempenhar um papel significativo na propagação do vírus para os seres humanos (WOAH, 2021).

4.4.5. SARS-CoV-2 em animais selvagens

Desde o início da pandemia de COVID-19, alguns animais em zoológicos e parques temáticos em todo o mundo foram infectados pelo SARS-CoV-2. As espécies incluem grandes felinos, primatas, furões, visons e outros animais (WOAH, 2021, WAZA, 2020, Delahay *et al.* 2020 ; Franklin and Bevins 2020 ; Leroy *et al.* 2020 ; Martínez-Hernández *et al.* 2020 ; Tiwari *et al.* 2020). Os casos em animais silvestres levantam preocupações sobre a possível transmissão do vírus de humanos para animais em risco de extinção e destacam a importância de medidas de segurança em zoológicos e em outras interações humanas com a vida selvagem (Oreshkova, *et al.* 2020; Padilla-Blanco *et al.*, 2021; Aguilo-Gisbert *et al.*, 2021; Hale *et al.*, 2022; Moreira *et al.*, 2022)

O primeiro caso documentado de infecção pelo SARS-CoV-2 em animais de zoológico ocorreu em um tigre malaio no zoológico do Bronx, em Nova York, em 4 de abril de 2020 (CDC, 2020). O tigre apresentou tosse seca, falta de apetite e dificuldade respiratória, e foi submetido a testes que confirmaram a infecção pelo vírus. Acredita-se que o tigre tenha sido infectado por um zelador/trabalhador COVID-19 positivo que estava assintomático no momento da exposição do

animal. Depois disso, outros tigres e leões no mesmo zoológico também testaram positivo para COVID-19, aumentando o número total de animais do zoológico positivos para SARS-CoV-2 para oito (National Geographic 2020). A sequência do genoma completo do SARS-CoV-2 isolado de um tigre malaio (SARS-CoV-2/tiger/NY/040420/2020) foi semelhante às sequências de SARS-CoV-2 encontradas em humanos (Wang *et al.* 2020b).

Em julho de 2020, no zoológico privado de Johannesburgo, na África do Sul, foi notificado dois casos de infecção pelo SARS-CoV-2 em dois pumas após entrar em contato com um tratador infectado. Os animais apresentaram sinais de anorexia, diarreia e secreções nasais, além de secreção ocular e tosse seca. Ambos os pumas se recuperaram totalmente após 23 dias (Koeppel *et al.*, 2022). Posteriormente, no Zoológico de Louisville, nos Estados Unidos, uma fêmea de leopardo da neve com cinco anos de idade exibindo sinais clínicos leves testou positivo para SARS-CoV-2. Acredita-se que a leopardo-das-neves tenha sido infectada por um tratador assintomático (Louisville Zoo, 2020).

Ainda nos Estados Unidos, gorilas do Parque Safari do Zoológico de San Diego testaram positivo para Covid 19. Todos os gorilas expostos exibiram sinais respiratórios leves, como tosse, congestão, coriza e letargia intermitente. Um dos gorilas infectados apresentou pneumonia e doenças cardíacas devido à sua idade avançada e às condições médicas latentes. O zoológico levantou a hipótese de os gorilas terem sido infectados por um membro assintomático da equipe de tratadores de vida selvagem apesar das precauções tomadas, como o uso de Equipamentos de proteção individual (EPI) pelos funcionários (Gibbons 202; San Diego Zoo Global 2021).

Um estudo experimental avaliou a suscetibilidade do cervo-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), à infecção pelo SARS-CoV-2. Os resultados mostraram que o cervídeo é altamente suscetível ao vírus. A inoculação intranasal em cervos resultou no estabelecimento de infecção viral subclínica junto com a disseminação viral por meio de secreções nasais e fezes. Além disso, o estudo mostrou que o cervo infectado era capaz de transmitir o vírus a animais de contato indireto (Palmer *et al.*, 2021).

Na Espanha, em novembro de 2020, o Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentação publicou um informe sobre o grupo de leões do zoológico de Barcelona (um macho de cinco anos e três fêmeas de 16 anos) que testaram positivo para infecção por SARS-CoV-2 por RT-PCR e testes sorológicos. Os leões apresentaram sinais clínicos sugestivos de COVID-19, como secreção nasal serosa, espirros e tosse, mas melhoraram rapidamente na primeira semana. Apenas uma leoa

que apresentou apatia pela segunda semana de infecção e leve acometimento pulmonar, o laudo não discute o que pode ter causado esse quadro no animal. Suspeita-se que os animais tenham sido infectados por dois criadores de leões que desenvolveram sintomas respiratórios leves e testaram positivo para o antígeno SARS-CoV-2 (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of Spain, 2020)

No Brasil, animais silvestres foram infectados com SARS-CoV-2 (um tamanduá-bandeira, peixes-bois das Índias Ocidentais e um sagui-de-cauda-preta). Os animais foram detectados como positivos por centros de pesquisas que executaram projetos sobre o estudo da suscetibilidade de espécies de animais domésticos e silvestres à infecção por SARS-CoV-2. Um dos projetos era realizado pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos. No contexto da pandemia do COVID-19 em 2020, o centro decidiu investigar a presença de SARS-CoV-2 em peixes-bois das Antilhas (*Trichechus Manatus manatus*) com o objetivo de verificar sua suscetibilidade e revisar os procedimentos de biossegurança e gerenciamento de saúde. Após a detecção de SARS-CoV-2 nos peixes-bois da unidade Ilha de Itamaracá/PE, os funcionários do centro foram testados e seis resultaram positivos para SARS-CoV-2. A fonte de infecção para os peixes-boi ainda não foi estabelecida (WOAH, 2022).

O Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, em outro projeto de pesquisa, no qual presta assistência veterinária a animais silvestres resgatados feridos e abandonados, monitoraram os animais que chegavam ao hospital para a presença de várias doenças incluindo SARS-CoV-2. Foi identificado em janeiro de 2022 um sagui-de-cauda-preta (*Mico melanurus*) e um tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) positivos a presença do ácido nucléico SARS-CoV-2 por RT-PCR. Neste evento não foi possível definir a fonte de infecção e a data de início (WOAH, 2022).

Recentemente, um estudo realizado no Parque Municipal das Mangabeiras em Belo Horizonte, Brasil, a partir da coleta de 40 amostras de swabes retais de quatis (*Nasua nasua*) de vida livre testadas pela RT-PCR, revelou a presença de RNA do SARS-CoV-2 em 02 (5%) quatis fêmeas que não apresentavam sinais clínicos de infecção. A sequência genômica do SARS-CoV-2 obtida da amostra indicou que a variante isolada pertencia à linhagem Zeta (B.1.1.28.2, P.2) (Stoffella-Dutra *et al.*, 2023).

As infecções por SARS-CoV-2 em animais, incluindo espécies silvestres, têm levantado preocupações sobre o potencial risco para uma ampla gama de mamíferos. Embora muitos animais infectados apresentem sinais leves ou são assintomáticos, ainda há preocupações sobre a

possibilidade de transmissão entre espécies e a potencial adaptação do vírus em diferentes hospedeiros. Os eventos relacionados a animais cativos e de vida livre destacaram o potencial de infecção e transmissão do SARS-CoV-2 entre animais e humanos, enfatizando a necessidade de vigilância contínua e medidas de biossegurança nos diversos ambientes, uma vez que tem implicações significativas para espécies de animais silvestres ameaçadas, bem como para aquelas sob cuidados humanos. As experiências nos Estados Unidos e em outros países enfatizaram a importância de uma abordagem “*One Health*” que considera a interconexão da saúde humana, animal e ambiental no gerenciamento e prevenção de futuros surtos de doenças zoonóticas (Barbosa *et al.* 2021; Delahay *et al.* 2021; Dhama *et al.* 2021; Martínez-Hernández *et al.* 2020).

4.4.6. Impacto da Coinfecção por SARS-CoV-2 em Animais

Coinfecções podem causar imunossupressão significativa no hospedeiro acometido, comprometendo a terapia e prognóstico da doença (Li, Zhou, 2013). Nesse sentido, a infecção por SARS-CoV-2 é prejudicial à imunidade do paciente, propiciando a infecção por patógenos secundários (Ginsburg, Klugman, 2020). No entanto, os tipos de agentes coinfectantes e a proporção de coinfecção em animais positivos para SARS-CoV-2 não são claros.

Estudos experimentais indicam que a coinfecção por SARS-CoV-2 e Influenza A em furões (*Mustela furo*) pode resultar em uma pneumonia mais grave e maior perda de peso corporal em comparação com a infecção isolada por cada vírus (Huang *et al.*, 2021). Além disso, há indícios de que a infecção prévia por SARS-CoV-2 pode aumentar a suscetibilidade dos furões a desenvolver sinais clínicos mais graves quando posteriormente infectados com o vírus da Influenza A (Vilas Boas de Melo *et al.*, 2022).

Em gatos, capturados em áreas urbanas da Espanha, a coinfecção com SARS-CoV-2 e outros patógenos também foi observada. Estudos revelaram que, entre os gatos soropositivos para SARS-CoV-2, alguns também apresentavam soropositividade para outros patógenos como *Toxoplasma gondii*, FIV e *Leishmania infantum*, sugerindo que animais imunossuprimidos podem ser especialmente suscetíveis à infecção (Villanueva-Saz *et al.*, 2022).

4.4.7. Diagnóstico molecular do SARS-CoV- 2.

Os testes de PCR para SARS-CoV-2 foram desenvolvidos empregando duas estratégias principais: a primeira foi direcionar regiões invariantes entre vários sarbecovírus, como o gene RdRp (RNA-dependent RNA polymerase), enquanto a segunda foi amplificar simultaneamente dois ou três alvos virais, como os genes E (envelope), N (nucleocapsid) e S (spike) (Tahan *et al.*, 2021). Essas moléculas alvo são essenciais para a detecção específica do SARS-CoV-2 em amostras das vias respiratórias superiores, como secreções nasofaríngeas e orofaríngeas, utilizando o RT-PCR quantitativo, reconhecido como o padrão ouro para confirmar a presença da COVID-19 (Oliveira *et al.*, 2020). Além disso, o ápice do avanço metodológico reside no sequenciamento de próxima geração (NGS), que possibilita a análise genômica completa do vírus e sua comparação com sequências humanas (John *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2021).

A análise genômica detalhada revelou a presença de múltiplas variantes genéticas do SARS-CoV-2 em animais (Figura 3) (Hamer *et al.*, 2021; Carlos *et al.*, 2021; Fernández-Bastit *et al.*, 2021; Jairak *et al.*, 2022; Panzera *et al.*, 2022). Algumas dessas variantes apresentam similaridades com estirpes humanas, sugerindo possível transmissão entre espécies. No entanto, outras variantes apresentam mutações exclusivas, sugestivas de adaptação viral em hospedeiros animais específicos (Klaus *et al.*, 2021; Tan *et al.*, 2022; Ribero *et al.*, 2022). A identificação dessas variantes tem implicações cruciais na compreensão da evolução viral e potenciais riscos para a saúde humana.

Figura 3 - Variantes relatadas de SARS-CoV-2 identificadas em animais



Fonte: Imagem do A Global Open Access Dataset of Reported SARS-CoV-2 Events in Animals. Last update: Jul 16, 2024

Os principais alvos moleculares utilizados em testes de detecção por RT-PCR são genes específicos do vírus, que codificam para proteínas essenciais à sua replicação e infecção. Um dos alvos frequentemente escolhidos é o gene que codifica a proteína de envelope viral (gene E). Essa proteína é fundamental para a montagem do vírus e a sua estruturação durante o ciclo de replicação. A escolha do gene E como alvo se baseia na sua alta conservação entre diferentes variantes do vírus. No entanto, o gene E do SARS-CoV 2 é considerado o menos específico e apresenta homologia de sequência significativa com outros coronavírus comuns (Zóka, Bekő, 2021; Tahan *et al.*, 2021).

Outro alvo crucial é o gene que codifica a RNA polimerase dependente de RNA (gene RdRp). Essa enzima é responsável por sintetizar novas cópias do genoma viral a partir do RNA fita negativa, um processo essencial para a replicação do vírus. Sua escolha como alvo molecular deve-se à sua importância fundamental no ciclo de vida do vírus e à sua presença em quantidades significativas, sendo uma molécula multicópia no genoma viral (Corman *et al.*, 2020).

A proteína de nucleocapsídeo viral (gene N) também desempenha um papel central na organização do RNA fita negativa e na proteção do genoma do genoma. Sua detecção em testes moleculares é valiosa para identificar a presença do vírus em amostras clínicas. A ampla conservação do gene N entre diferentes estirpes do vírus torna-o um alvo confiável e sensível para detecção (Holshue *et al.*, 2019; Abbasi *et al.*, 2020).

Além disso, a proteína Spike (gene S) do SARS-CoV-2, que desempenha um papel fundamental na ligação do vírus às células hospedeiras, também é frequentemente alvo de detecção. Embora seja menos comum como alvo único, a detecção do gene S pode ser útil para identificar mutações específicas na proteína Spike, como aquelas encontradas em variantes do vírus (Chen *et al.*, 2020). A análise das sequências genéticas desses alvos permite a identificação confiável do vírus, auxiliando no diagnóstico e monitoramento da infecção por SARS-CoV-2 em amostras clínicas e ambientais. Portanto, os alvos moleculares específicos do SARS-CoV-2 são fundamentais para a compreensão e controle da pandemia.

4.4.8. Monitoramento de SARS-CoV-2 em animais na abordagem Uma Só Saúde

O monitoramento e a vigilância de infecção por SARS-CoV-2 em animais desempenham um papel importante na saúde pública. A detecção precoce e o acompanhamento de patógenos

zoonóticos em animais podem ajudar a prevenir a sua disseminação para humanos e permitir a implementação de medidas de controle eficazes. Isso é particularmente relevante quando se considera Uma Só Saúde (“*One Health*”) (Ohia, Uwalaka, 2021).

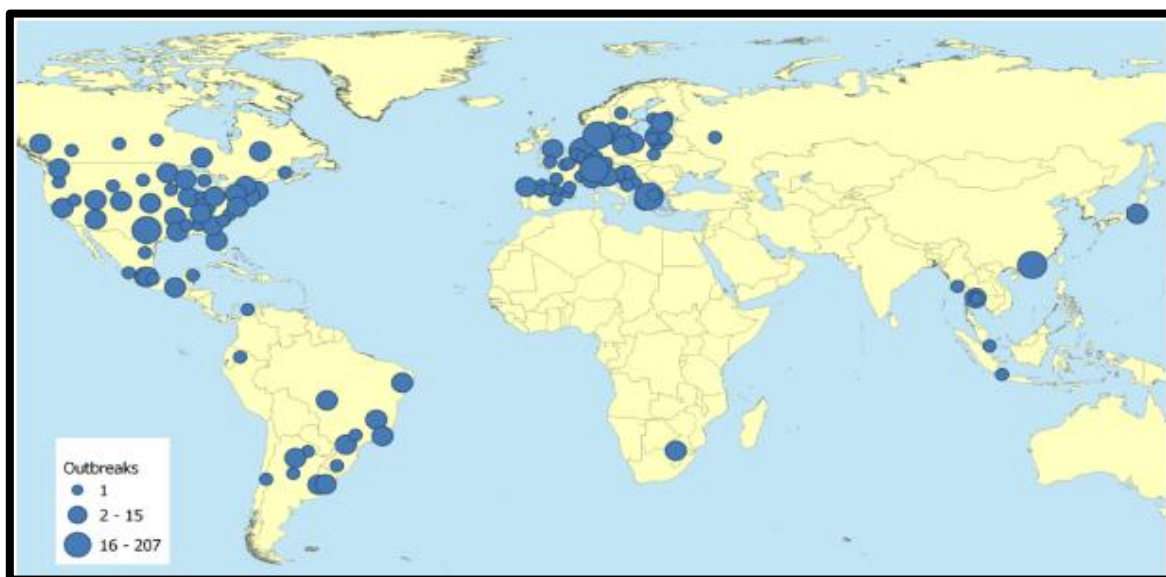
O conceito de “*One Health*” ou Uma Só Saúde se refere a uma abordagem integrada que reconhece a conexão entre a saúde humana, animal, vegetal e ambiental. Reconhece-se que a saúde de humanos, animais e ecossistemas está intimamente ligada e que a abordagem integrada é necessária para prevenir e controlar doenças (FAO, OMS, OIE, 2019). A vigilância em animais, juntamente com a vigilância em humanos, faz parte dessa abordagem, visando identificar e monitorar a presença de patógenos potencialmente perigosos. Essa abordagem é particularmente relevante no contexto de infecções zoonóticas como SARS-CoV-2, onde entender e abordar a saúde dos animais e seus ambientes pode ajudar a prevenir e controlar a propagação de doenças que afetam os seres humanos (Davis *et al.*, 2017). Por isso, estudos em Uma Só Saúde levam em consideração o trânsito e a adaptação dos patógenos a hospedeiros diversos que convivem em um mesmo ambiente. As espécies sentinelas são aquelas indicadoras da saúde do ambiente em que está inserida e capaz de refletir as perturbações ambientais (Tabor e Aguirre, 2004).

Em termos de monitoramento e vigilância, autoridades e organizações em todo o mundo estão ativamente envolvidas no rastreamento e estudo do SARS-CoV-2 em animais. Isso envolve programas de vigilância em andamento para detectar e investigar casos de infecções em animais, especialmente em espécies próximas aos humanos ou com potencial para transmissão zoonótica significativa. Os esforços de monitoramento incluem testar animais que estão em contato com humanos infectados, conduzir vigilância em populações de animais e investigar casos de transmissão de animal para humano. Essas atividades auxiliam na compreensão dos potenciais riscos e dinâmica do vírus em diferentes espécies animais, contribuindo para estratégias e intervenções de saúde pública (WHO, 2021, FAO, 2020 WOA, 2020).

A WOA é uma organização intergovernamental que tem 182 países membros com o objetivo de combater doenças animais, melhorando a saúde animal globalmente. Também estabeleceu os requisitos para definir um caso confirmado para SARS-CoV-2 nos animais, sendo de notificação obrigatória ante às Autoridades Veterinárias nacionais e Autoridades de Saúde Pública, assim como aos parceiros relevantes da comissão “*One Health*”. Além disso, definiu como caso confirmado laboratorialmente aquele animal (com ou sem sinais clínicos), no qual se detecte o ácido nucleico viral de uma amostra tomada diretamente do animal, com suspeita de associação

ou contato prévio, com SARS-CoV-2, testando na amostra duas regiões genômicas específicas em um nível que indique a presença de vírus infeccioso ou testando uma região genômica seguida de sequenciamento de um alvo secundário, ou se o SARS-CoV-2 foi isolado de uma amostra coletada diretamente de um animal. Sequências completas do genoma obtidas devem ser depositadas em bancos de dados publicamente disponíveis sem demora. Mensalmente a WOAH emite boletins informativos com dados epidemiológicos que demonstram a situação global do SARS-CoV-2 em diversas espécies animais, ressaltando a importância da vigilância contínua em animais (Figura 4) (WOAH, 2023)

Figura 4 - Distribuição mundial de eventos de SARS-CoV-2 relatados ao WOAH (até 30 de junho de 2023).



* O tamanho do ponto no mapa é proporcional ao número de surtos relatados.

Fonte: Imagem do Boletim informativo SARS-COV-2 in animals – situation report 22 da World Organisation for Animal Health (WOAH, founded as OIE).

No Brasil os casos de SARS-CoV-2 em animais, devem ser notificados ao Serviço Veterinário Oficial do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), órgão responsável pela gestão das políticas públicas de estímulo à agropecuária, pelo fomento do agronegócio e pela regulação e normatização de serviços vinculados ao setor (Brasil, 2021). Entidade que se encarrega através do seu Sistema Nacional de Informação Zoossanitária do envio de notificações imediatas de doenças e pelos Informes Semestrais e Anuais que são enviados pelo Brasil conforme a Instrução Normativa MAPA nº 50, de 23 de setembro de 2013 (Brasil, 2013)

Ante o atual contexto, uma ação de vigilância entre os serviços humanos e animais é necessária para lidar com a ameaça do SARS-CoV-2 e outras doenças zoonóticas. Essa abordagem é conhecida como vigilância integrada e envolve o monitoramento contínuo de doenças em ambas as populações, incluindo detecção de novas variantes, identificação de reservatórios animais, prevenção de transmissão reversa e resposta rápida a surtos (Dhama, *et al.* 2020; Tiwari *et al.*, 2020)

É importante ressaltar que a maioria das infecções por SARS-CoV-2 em humanos é resultado da transmissão de pessoa para pessoa, e o risco de contrair o vírus diretamente de animais é considerado baixo, essa vigilância é essencial para identificar potenciais reservatórios do vírus, monitorar sua evolução e entender melhor as interações entre humanos, animais e o meio ambiente. Com a queda dos casos humanos após as campanhas de vacinação, a vigilância integrada torna-se ainda mais relevante para mitigar os riscos associados ao SARS-CoV-2 e outras doenças infecciosas emergentes (CDC, 2023).

4.5. Hemopatógenos em animais

4.5.1. Bactérias

4.5.1.1. Família Anaplasmataceae

A família Anaplasmataceae, que está inserida na ordem Rickettsiales e inclui dois importantes gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia*. Essa família é composta por bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias que infectam as células hospedeiras, principalmente células do sistema imunológico, replicando-se no citoplasma. A infecção por Anaplasmataceae pode levar a uma variedade de doenças, que vão desde infecções assintomáticas a doenças graves, afetando uma variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo humanos, animais domésticos e animais silvestres. As bactérias são transmitidas principalmente por carrapatos, mas também podem ser transmitidas por piolhos e pulgas (Dumler *et al.*, 2001; Rikihisa, 2010). Dentro da família Anaplasmataceae, algumas das espécies mais importantes incluem: *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma marginale*, *Ehrlichia chaffeensis* e *Ehrlichia canis* (Silveira *et al.* 2012).

4.5.1.2. *Anaplasma*

A anaplasmosse é uma doença que afeta humanos e diversos animais domésticos e silvestres, sendo o agente transmitido principalmente por carrapatos infectados, mas também por moscas como vetores mecânicos, e ocasionalmente de forma iatrogênica e transplacentária (Dumler *et al.*, 2001; Kocan *et al.*, 2015; Little, 2010). O gênero *Anaplasma* foi descrito pela primeira vez em 1910 e inclui espécies como *A. phagocytophilum*, *A. marginale* e *A. platys*, que infectam hospedeiros vertebrados variados, incluindo humanos, ruminantes, carnívoros e aves (Theiler, 1910; Fernandes, 2018).

Anaplasma phagocytophilum é transmitido principalmente por carrapatos do gênero *Ixodes* e afeta neutrófilos, sendo a causa da Anaplasmosse Granulocítica Humana (Dumler *et al.*, 2001; Losos, 1986). Sua soroprevalência varia entre 0% e 55% na América do Norte, 20,4% na Europa e 43,8% no Brasil, dependendo da área geográfica e população estudada (Carrade *et al.*, 2009; Maksimović *et al.*, 2021; Silveira *et al.*, 2017). *Anaplasma platys*, transmitido por *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, causa Trombocitopenia Cíclica Canina e foi relatado pela primeira vez em 1978. Estudos no Brasil mostraram 20% de prevalência de *A. platys* e 10% de *A. phagocytophilum* em gatos domésticos (Harvey *et al.*, 1978; Pinto *et al.*, 2018). Em cães, *A. phagocytophilum* foi detectado em 10,9% dos casos, e *A. platys* apresentou uma variação de prevalência entre 7,1% e 88% (Silveira *et al.*, 2017; Malheiros *et al.*, 2016).

Os ruminantes são particularmente suscetíveis a *A. marginale*, que causa anemia hemolítica e é transmitido por carrapatos ixodídeos, sendo fator limitante para a pecuária bovina em várias partes do mundo. Estudos mostraram que até 79,3% de cervídeos podem estar infectados com *A. marginale* (Fernandes, 2018; Raoult, Parola, 2007; Silveira *et al.*, 2011). Os sinais clínicos de anaplasmosse podem incluir febre, perda de peso, letargia, e anemia, com possíveis consequências fatais em casos graves (Trincheiras *et al.*, 2020). O diagnóstico é mais sensível com PCR em sangue total, enquanto a cultura sanguínea, embora padrão-ouro, é menos disponível e sensível. A análise microscópica e a sorologia também são usadas, mas a terapia precoce e a imunossupressão podem causar resultados falsos-negativos (Dumic *et al.*, 2022).

4.5.1.3. *Ehrlichia*

A erliquiose é uma doença infecciosa causada por rickettsias do gênero *Ehrlichia*, pertencente à ordem Rickettsiales e à família Anaplasmataceae. As espécies mais conhecidas são *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii* e *E. muris*, que parasitam principalmente monócitos e neutrófilos em humanos e animais (Losos, 1986). Identificada pela primeira vez em cães na Argélia em 1935 (Sinnott, 2007), a erliquiose é considerada um problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais (Zhang *et al.*, 2017). A transmissão ocorre predominantemente pela picada de carrapatos infectados, com o patógeno se multiplicando em células intestinais e glândulas salivares dos carrapatos, enquanto no hospedeiro definitivo, ocorre a multiplicação nos granulócitos ou monócitos (Rikihisa, 2010; Dumler, 2012).

Entre as espécies, *E. canis* e *E. chaffeensis* causam erliquiose monocítica, afetando monócitos, enquanto *E. ewingii* provoca erliquiose granulocítica, afetando neutrófilos (Varela, 2003). A erliquiose monocítica canina (EMC), causada por *E. canis*, é transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, pode ser fatal (Macieira *et al.*, 2005; Costa-Junior *et al.*, 2007). Estudos na Sérvia e no Brasil revelaram soroprevalências variando entre 3,57% e 20% para *E. canis*, com uma prevalência geral de 11,06% em cães não domiciliados na Sérvia (Bogićević *et al.*, 2017) e detecção de *E. canis* em canídeos e felídeos silvestres no Brasil (De Paiva Diniz *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2018).

A infecção por *Ehrlichia* em gatos é menos estudada, mas já foram encontrados relatos de DNA de *Ehrlichia* spp. com alta similaridade a *E. canis* (Breitschwerdt *et al.*, 2002; Braga *et al.*, 2012; Maia *et al.*, 2015). No Brasil, estudos identificaram 41,5% de gatos soropositivos para *E. canis* por imunofluorescência e 9,4% positivos por PCR (Braga *et al.*, 2014), enquanto Pinto *et al.* (2018) encontraram 8,33% de infecção em gatos por PCR. *Ehrlichia chaffeensis*, causadora da erliquiose monocítica humana, tem como vetores principais *Amblyomma americanum* e *Dermacentor variabilis* e também foi identificada em cervos-do-pantanal e veados-catingueiros no Brasil (Machado, 2006; Silveira *et al.*, 2012).

Ehrlichia ewingii é responsável por causar a Erliquiose Granulocitotrófica Canina (EGC) e já foi relatada em seres humanos, sendo apontados como hospedeiros acidentais (Buller *et al.*, 1999). O primeiro estudo a fornecer evidências de infecção canina causada por *E. ewingii* no Brasil foi feito por Oliveira *et al.*, (2009c), quem identificaram no estado de Minas Gerais, 5/100 (5%) cães positivos por nested-PCR para o gene 16S rRNA de *E. ewingii*.

4.5.1.4. Micoplasmas hemotrópicos

O interesse no estudo dos micoplasmas hemotrópicos, ou hemoplasmas, cresceu globalmente devido à sua relevância como patógenos emergentes na medicina veterinária e humana. Estes patógenos são difíceis de cultivar *in vitro*, sendo frequentemente detectados por métodos moleculares. Os hemoplasmas podem ser encontrados isoladamente ou em coinfecção com outros microrganismos e estão associados a distúrbios hematológicos significativos em animais domésticos e silvestres, além de poderem atuar como agentes oportunistas (Messick, 2004; Kaewmongkol *et al.*, 2017; Maggi *et al.*, 2013). As hemoplasmoses causam desde anemia severa até infecções crônicas assintomáticas, com sinais clínicos variando de hemólise e febre a morte súbita em casos agudos (Messick, 2004).

Os hemoplasmas são bactérias pequenas, gram-negativas e sem parede celular, pertencentes à ordem Mycoplasmatales, família Mycoplasmataceae e gênero *Mycoplasma* (Euzéby, 1997). Estas bactérias parasitam uma ampla gama de animais, incluindo mamíferos e aves, e têm formatos pleomórficos com genomas pequenos (Benedetti *et al.*, 2020). A transmissão ocorre por meio de vetores como pulgas, carrapatos, piolhos e moscas, sendo mais prevalente em países tropicais devido às condições climáticas que favorecem a manutenção dos vetores (Macieira *et al.*, 2008; Willi *et al.*, 2010). Além disso, a infecção pode ser adquirida por contato com sangue infectado e há evidências de transmissão vertical e direta, especialmente em gatos (Foley, 2022).

As principais espécies de hemoplasmas que afetam felinos incluem *Mycoplasma haemofelis* (Mhf), *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (CMhm) e *Candidatus Mycoplasma turicensis* (CMt), sendo Mhf a mais patogênica. CMhm e CMt podem causar anemia em hospedeiros imunossuprimidos ou com doenças concomitantes como o FeLV (Tasker *et al.*, 2010; Willi *et al.*, 2005). Em cães, *Mycoplasma haemocanis* e *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* são os principais patógenos, causando anemia infecciosa canina (Wengi *et al.*, 2008). Casos de infecção cruzada entre espécies de hemoplasmas e evidências de zoonose, como a detecção de Mhf em um ser humano imunocomprometido no Brasil, destacam a importância clínica desses patógenos (dos Santos *et al.*, 2008). A prevalência de hemoplasmas varia mundialmente, com estudos no Brasil mostrando taxas de infecção em gatos de 6,5% a 44% e em cães de 5,8% a 59,1% (de Bortoli *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2021; Fernandes *et al.*, 2022). Infecções foram também documentadas em animais silvestres brasileiros, incluindo canídeos, felídeos, primatas não humanos e marsupiais (André *et al.*, 2011; Bonato *et al.*, 2015; Massini *et al.*, 2019).

4.5.1.5. *Bartonella*

Bartonella é um gênero de bactérias gram-negativas intracelulares facultativas, pertencente à família Bartonellaceae, ordem Rhizobiales e classe Alphaproteobacteria. Com mais de 23 espécies conhecidas, essas bactérias infectam mamíferos domésticos, silvestres e humanos (Diaz *et al.*, 2012; Staggemeier *et al.*, 2014; Álvarez-Fernández *et al.*, 2018). Caracterizadas como bacilos curvos ou cocobacilos, aeróbicos e de crescimento lento, as *Bartonella* colonizam tecidos, especialmente endotélios vasculares, células vermelhas do sangue e células fagocíticas, demonstrando uma significativa capacidade de invasão e persistência intracelular (Dehio, 2004; Ereemeeva *et al.*, 2007; Drummond *et al.*, 2023). Estas características, junto com a transmissão por diversos vetores como flebotomíneos, piolhos, pulgas e carrapatos, tornam as *Bartonella* patógenos emergentes (Maggi, Breitschwerdt, 2005).

Entre as espécies mais associadas a doenças humanas estão *Bartonella henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. quintana* e *B. bacilliformis*. *Bartonella henselae* e *B. clarridgeiae* causam a doença da arranhadura do gato, transmitida por arranhões ou mordidas de gatos infectados, enquanto *B. quintana* é responsável pela febre das trincheiras. *B. bacilliformis* causa a doença de Carrión, caracterizada por febre, anemia hemolítica e lesões cutâneas. Outras espécies como *B. koehlerae*, *B. elizabethae* e *B. alsatica* estão associadas a casos esporádicos de endocardite (Chomel *et al.*, 2006; Minnick *et al.*, 2014; Köseoğlu *et al.*, 2022).

Estudos moleculares revelaram grande diversidade dentro do gênero *Bartonella*, com prevalência variando entre espécies e regiões (Kaiser *et al.*, 2011). Gatos são reservatórios principais de *B. henselae*, *B. clarridgeiae* e *B. koehlerae*, sendo a pulga *Ctenocephalides felis* o principal vetor. No Brasil, estudos confirmam a presença dessas bactérias em gatos, com a prevalência variando de 1,6% a 97% (Furquim *et al.*, 2021). Cães podem ser infectados por várias espécies, incluindo *B. vinsonii berkhoffii*, embora seu papel como reservatórios ainda não esteja totalmente esclarecido. Ruminantes e animais silvestres, como roedores e morcegos, também participam do ciclo de transmissão (Breitschwerdt, 2014; Gonçalves-Oliveira *et al.*, 2020). O diagnóstico de bartonelose pode ser desafiador, mas métodos moleculares, como PCR direcionada a genes específicos, são ferramentas valiosas para a detecção de *Bartonella* devido à dificuldade de cultivo (Drummond *et al.*, 2023; Maggi *et al.*, 2005; Köseoğlu *et al.*, 2022).

4.5.2. Protozoários

4.5.2.1. Ordem Piroplasmida

Os piroplasmas são agentes transmitidos por carrapatos que afetam animais domésticos e silvestres em todo o mundo (Baneth *et al.*, 2020; Far *et al.*, 2021). O nome "piroplasma" deriva da forma piriforme dos merozoítos, que parasitam as hemácias do hospedeiro (Mehlhorn, Schein, 1993). Atualmente, a classificação dos piroplasmídeos é baseada não apenas na morfologia e nos vetores, mas também em técnicas moleculares e análises filogenéticas (Baneth *et al.*, 2020; Far *et al.*, 2021).

Os gêneros de piroplasmídeos incluem *Babesia*, *Theileria*, *Cytauxzoon* (Yabsley, Shock, 2012) e *Rangelia*, e são responsáveis por doenças em humanos e animais, incluindo espécies de produção, companhia e vida selvagem (Yabsley, Shock, 2012; Soares *et al.*, 2014). *Babesia* e *Rangelia vitalii* são piroplasmídeos de canídeos (Schnittger *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2011), enquanto felídeos podem ser afetados por *Babesia*, *Cytauxzoon* e *Theileria* (Alvarado-Rybak *et al.*, 2016). Animais silvestres também são suscetíveis aos piroplasmídeos (Alvarado-Rybak, Solano-Gallego, Millán, 2016).

Os piroplasmas possuem um ciclo de vida complexo que envolve reprodução sexual no intestino do carrapato, proliferação assexuada nas glândulas salivares do carrapato e reprodução assexuada em células sanguíneas do hospedeiro vertebrado (Jalovecka *et al.*, 2018). Como parasitos intracelulares obrigatórios, eles se reproduzem nas células eritrocíticas, levando à destruição dessas células e à liberação de toxinas, o que pode causar anemia, febre, icterícia e outros sintomas graves (Homer *et al.*, 2000). O gênero *Theileria* se distingue de *Babesia*, *Cytauxzoon* e *Rangelia* nos hospedeiros vertebrados por infectar leucócitos antes de parasitar hemácias (Mans *et al.*, 2015).

A prevalência dos piroplasmídeos em gatos domésticos varia globalmente e está relacionada à espécie envolvida, idade e resposta imunológica do hospedeiro (Silva-Santos *et al.*, 2014). No Brasil, foram identificados os gêneros *Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon* (Maia *et al.*, 2013; André *et al.*, 2014; André *et al.*, 2015; Malheiros *et al.*, 2016; André *et al.*, 2017; Pedrassani *et al.*, 2019).

Babesia spp. foram relatadas em quase todos os continentes, exceto Austrália e Antártica, com mais de dez espécies descritas em felinos (Penzhorn, Oosthuizen, 2020). A prevalência molecular varia de 0,8% na Itália (Spada *et al.*, 2014) a 39,5% na Tailândia (Do *et al.*, 2021).

Espécies como *B. vogeli*, *B. canis* e *B. vulpes* foram identificadas em felinos (Criado-Fornelio *et al.*, 2003), além de *B. microti*, *B. gibsoni*, *B. hongkongensis* e *B. bigemina* (Spada *et al.*, 2014; Akram *et al.*, 2019; Bosman *et al.*, 2019; André *et al.*, 2015). Espécies primárias dos felídeos incluem *B. felis*, *B. leo*, *Babesia* sp. cat Western Cape e *B. lengau* (Bosman *et al.*, 2007; Alho *et al.*, 2017; Salim *et al.*, 2018; Bosman *et al.*, 2019).

Informações sobre o gênero *Theileria* em felinos são limitadas. apenas três estudos documentaram a presença de *Theileria spp.* em gatos domésticos, todos localizados na América do Sul (André *et al.*, 2014; André *et al.*, 2015; Sacristán *et al.*, 2019). Dois desses estudos foram realizados em Brasil, revelando prevalências de 3% e 5,96% (André *et al.*, 2014; André *et al.*, 2015). Nesses estudos, a *T. equi* é a espécie mais documentada (André *et al.*, 2014; Sacristán *et al.*, 2019), mas também foram encontradas *Theileria* sp. e *T. cervi*, o que sugere a presença de novos genótipos de piroplasmídeos circulantes em gatos, que podem estar filogeneticamente relacionados aos agentes encontrados em ruminantes domésticos e selvagens (André *et al.*, 2015). A caracterização clínica e a patogenicidade ainda não são totalmente compreendidas.

A Cytauxzoonose felina é causada pelo gênero *Cytauxzoon*, descrito pela primeira vez em 1976 (Wagner, 1976). É uma doença grave em gatos domésticos no sul e sudeste dos EUA, com prevalência molecular global variando de 0,3% (Haber *et al.*, 2007) a 30,3% (Brown *et al.*, 2010). Cinco espécies de *Cytauxzoon* são conhecidas, incluindo *C. manul*, *C. felis*, *C. europaeus*, *C. otrantorum* e *C. banethi* (Ketz-Riley *et al.*, 2003; Reichard *et al.*, 2005; Panait *et al.*, 2021). No Brasil, *C. felis* foi identificado em felídeos domésticos e silvestres em várias regiões, geralmente não associada a gravidade como nos EUA (Pedrassani *et al.*, 2019; Maia *et al.*, 2013; Sebastiani, 2021; André *et al.*, 2009; Furtado *et al.*, 2017; Peixoto *et al.*, 2007).

4.5.2.2. *Leishmania*

A leishmaniose é uma doença global causada por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae. A transmissão ocorre principalmente pela picada de flebotomíneos (*Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo) (WHO, 2010). Outras formas de transmissão relatadas incluem carrapatos, pulgas (Coutinho *et al.*, 2005; Dantas-Torres *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2009), e transfusões sanguíneas (Owens *et al.*, 2001). É a segunda principal causa de morte entre parasitoses em humanos e a terceira em morbidade, com maior incidência em regiões tropicais e subtropicais (Pace, 2014; Akhoundi *et al.*, 2017; Solano-Gallego

et al., 2009). Os protozoários têm duas formas morfológicas principais: o promastigota, que se multiplica no vetor invertebrado, e o amastigota, localizado nas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (Brasil, 2005; Bates, 2007).

As leishmanioses humanas subdividem-se em visceral (LV) e tegumentar, que inclui a forma cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e cutânea difusa (LCD) (Reithinger & Davies, 1999). As manifestações clínicas variam de acordo com a espécie de *Leishmania* e a resposta imunológica do hospedeiro (Sánchez-Saldanã *et al.*, 2004).

A leishmaniose visceral no Brasil é causada por *Leishmania (Leishmania) infantum* (Brasil, 2009). Os cães domésticos são os principais reservatórios do protozoário e um problema significativo de saúde pública. A infecção também foi observada em outros animais, como gatos e canídeos selvagens (Fernández-Bellon *et al.*, 2006; Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Sobrino *et al.*, 2008). O aumento de casos diagnosticados em gatos domésticos sugere que eles podem desempenhar um papel relevante na transmissão do agente (Pennisi & Persichetti, 2018; Pereira *et al.*, 2020).

O primeiro caso de leishmaniose felina foi relatado por Sargent *et al.* (1912) na Argélia. Desde então, a prevalência tem aumentado, com variações de 1,3% em Portugal e Catar, a até 25% no Brasil e Irã (Pennisi Persichetti, 2018; Akhtardanesh *et al.*, 2017; Benassi *et al.*, 2017; Berenguer *et al.*, 2020; Foroughi-Parvar *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2019). A mudança de hospedeiros dos flebotomíneos devido ao uso de repelentes em cães pode estar influenciando esse aumento (Maia *et al.*, 2010; Basso *et al.*, 2016). A detecção em gatos é complicada pelos sinais clínicos inespecíficos e a possibilidade de infecção assintomática (Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Alcover *et al.*, 2021).

A infecção por *L. infantum* está associada à resposta imune do hospedeiro. Em cães, a doença progressiva é caracterizada por altos níveis de anticorpos e uma resposta celular enfraquecida, com baixa produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Maia & Campino, 2018). Em gatos, a resposta imune inclui produção de IFN- γ , que pode justificar a menor predisposição à doença clínica (Solano-Gallego *et al.*, 2016; Priolo *et al.*, 2019; Tirado *et al.*, 2021). Os sinais clínicos da leishmaniose variam, podendo ser assintomáticos ou sintomáticos, e incluem perda de peso, apatia, fraqueza, febre irregular, alterações no apetite, e sintomas cutâneos, como úlceras na pele e alterações nas orelhas e extremidades. Outros sintomas podem incluir arritmias cardíacas, conjuntivite e hemorragias (Alvar *et al.*, 2004).

No ambiente silvestre ao redor do mundo, 189 espécies de dez ordens foram infectadas naturalmente por *Leishmania*, com *L. infantum* em 98 espécies e *L. (Viannia)* spp. em 52. Carnívoros e roedores foram os hospedeiros mais relevantes, embora os sinais clínicos sejam frequentemente não relatados (Azami-Conesa *et al.*, 2021).

4.6. Diagnóstico de hemopatógenos

O diagnóstico de hemopatógenos é essencial para a detecção e tratamento eficaz das doenças causadas por esses organismos no sangue dos hospedeiros. Entre os métodos utilizados, o exame direto de esfregaços de sangue e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são os mais comuns (Moody, Chiodini, 2000). No entanto, a detecção de hemoparasitos por esfregaço sanguíneo é limitada, apresentando baixa sensibilidade e subjetividade. Este método depende fortemente das habilidades técnicas dos profissionais e exige a presença de hiperparasitemia. Além disso, a observação prolongada do esfregaço, que idealmente deve ocorrer logo após a coleta da amostra, pode comprometer a eficácia do diagnóstico (Normand *et al.*, 2020).

Em contraste, a PCR oferece uma sensibilidade significativamente maior, superando os métodos diretos parasitológicos como o esfregaço sanguíneo (Barbet, 1995; Böse *et al.*, 1995; Figueroa & Buening, 1995). A técnica pode ser aprimorada com o uso de *nested* PCR (nPCR), que emprega iniciadores internos para aumentar a sensibilidade do teste. A *semi-nested* PCR, uma variação que utiliza um iniciador interno junto com um da primeira reação, também melhora a detecção dos hemoparasitos (Silveira, 2012).

Somado ao diagnóstico molecular, a bioinformática desempenha um papel crucial no diagnóstico ao aplicar técnicas computacionais para interpretar informações genéticas e moleculares relacionadas aos hemoparasitos. Ferramentas como o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) permitem a identificação de semelhanças entre sequências de DNA ou proteínas ao comparar sequências-alvo com as armazenadas em bancos de dados, como o GenBank (Lesk, 2008). *Softwares* como o BioEdit, amplamente utilizado pela comunidade científica, auxiliam na análise da qualidade das sequências e na construção de "contigs", que são fragmentos de DNA sobrepostos oriundos da mesma fonte genética (Pereyra *et al.*, 2021; Houbraken *et al.*, 2020; Heker *et al.*, 2016). Outras ferramentas, como CLUSTALW e MEGA, facilitam o alinhamento múltiplo de sequências de DNA, permitindo a identificação de semelhanças e a realização de estudos filogenéticos (Tamura *et al.*, 2011; Hillis *et al.*, 1996).

O diagnóstico da leishmaniose envolve técnicas parasitológicas e sorológicas, incluindo pesquisa direta em lesões, exame histopatológico e imunofluorescência indireta. A sorologia, como ELISA, pode apresentar reações cruzadas, enquanto a PCR é mais sensível e específica para detectar DNA do parasito. A PCR, combinada com a técnica de RFLP, ainda pode ser eficaz para identificar diferentes espécies de *Leishmania*, embora o sequenciamento de nucleotídeos seja cada vez mais utilizado para uma identificação mais precisa. (Da Cruz, 2014). A identificação precisa das espécies de *Leishmania* é essencial para o controle da doença e para a compreensão do papel de hospedeiros não primários na transmissão. A expansão urbana e a presença de cães e gatos infectados em áreas endêmicas reforçam a importância da rápida identificação das espécies de *Leishmania* para um diagnóstico eficaz e para estratégias de controle (Ahui-Baraja *et al.*, 2021; Pereira, Maia *et al.*, 2021; Azami-Conesa *et al.*, 2021).

Portanto, a combinação de técnicas de PCR com análise bioinformática é fundamental para a confirmação precisa de diagnósticos e para a realização de estudos filogenéticos, proporcionando uma compreensão mais detalhada das amostras positivas e dos hemopatógenos envolvidos. (Hillis *et al.* em 1996).

4.7. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular da família Sarcocystidae, causador da toxoplasmose, uma infecção zoonótica com ampla prevalência global. Este parasito é notável por sua resistência e capacidade de infectar diversos mamíferos e aves. Felinos domésticos e silvestres servem como hospedeiros definitivos, onde ocorrem tanto o ciclo sexual (gametogonia) quanto o assexual (esquizogonia) do parasito. Por outro lado, outros animais de sangue quente atuam como hospedeiros intermediários, abrigando apenas a fase assexuada do ciclo (Schlüter *et al.*, 2014; Ferroglio *et al.*, 2014).

A transmissão de *T. gondii* ocorre principalmente de duas formas: pela ingestão de oocistos esporulados presentes em vegetação, água e solo, excretados nas fezes dos felinos, e pela ingestão de cistos teciduais encontrados na musculatura dos hospedeiros intermediários. Uma terceira forma, menos comum, é a transmissão vertical, na qual taquizoítos são transferidos da placenta para o feto ou pelo leite materno, podendo resultar em infecção congênita e aborto (Dubey, 2008; 2009a).

A infecção por *T. gondii* apresenta uma ampla distribuição geográfica e pode afetar uma variedade de espécies. Em hospedeiros imunocompetentes, geralmente causa infecção assintomática, embora isso possa depender do tipo de cepa infectante. Já em indivíduos imunossuprimidos, a infecção pode provocar sinais clínicos graves (Desmonts & Remington, 1980; Dubey, 2009b). A prevalência de *T. gondii* em animais de zoológico e de vida livre, particularmente felinos silvestres, contribui para a disseminação do parasito dentro dos ecossistemas. Esses animais podem representar uma fonte potencial de infecção para outros animais e humanos (Ullmann *et al.*, 2010; Dubey, 1991).

No Brasil, o crescimento urbano tem levado à degradação de áreas florestais e à preservação de pequenos remanescentes de vegetação, criando condições propícias para a convivência de hospedeiros domésticos e silvestres. Esta interação entre ambientes urbanos e silvestres pode levar ao surgimento de doenças e ao desequilíbrio ecológico devido à predação e desaparecimento de espécies nativas (Dubey *et al.*, 2003; Lehmann *et al.*, 2003; da Silva *et al.*, 2010). Estudos realizados no país revelaram a presença de *T. gondii* em 53,7% dos mamíferos silvestres não voadores e 21,5% dos morcegos selvagens, bem como em 52,8% dos gatos domésticos examinados. A presença do DNA do parasito foi confirmada tanto em animais selvagens quanto domésticos, evidenciando a circulação de *T. gondii* e o papel crucial desses animais na perpetuação do ciclo de vida do parasito (Fournier *et al.*, 2014).

Em humanos, a infecção é mais comum em áreas rurais e em regiões com menor desenvolvimento socioeconômico, sendo a principal via de transmissão a ingestão de carne contaminada com bradizoítos, particularmente carne de suínos, ovinos e aves, frequentemente consumidas cruas ou mal cozidas. A contaminação de hortaliças e água também contribui para o risco de infecção, ampliado pela alta quantidade de gatos no país, que são hospedeiros definitivos do parasito (Jones & Dubey, 2012; Hill & Dubey, 2013). A presença de gatos em áreas urbanas e rurais contribui para a contaminação ambiental por oocistos, expondo tanto humanos quanto outros animais ao parasito (Jones *et al.*, 2007; Nash *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2009; Shapiro *et al.*, 2019).

Os sintomas da toxoplasmose variam com o estado imunológico do indivíduo. Pessoas saudáveis podem apresentar sintomas leves ou ser assintomáticas, enquanto gestantes infectadas enfrentam riscos significativos, incluindo aborto espontâneo, malformações congênitas, e danos neurológicos e oculares no feto (Boughattas *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2021). Medidas de controle, como a gestão da população felina e a conscientização sobre práticas de higiene e alimentação

seguras, são essenciais para a prevenção da infecção. Cozinhar adequadamente carnes e lavar bem alimentos também são práticas recomendadas para reduzir o risco de transmissão (Elbez-Rubenstein, 2009; Dubey, 2021).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Considerações éticas

O presente trabalho está inserido no projeto multidisciplinar “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”, e possui três projetos:

- 1- “Estudo multicêntrico para a vigilância de SARS-CoV-2 em animais de companhia com interface à Uma Só Saúde (Projeto PetCOVID-19): coorte prospectiva de mamíferos domiciliados para avaliação de risco de transmissão zoonotrófica no Brasil”, o estudo inclui cinco capitais brasileiras Belo Horizonte (MG), Campo Grande (MS), Curitiba (PR), Recife (PE), São Paulo (SP). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (número CEUA: 184/2021) da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (Anexo 1) como parte do estudo multicêntrico Pet-COVID-19 (CNPq nº 402341/2020-1). O consentimento por escrito foi obtido do proprietário antes que os animais fossem incluídos no estudo. Todos os procedimentos foram elaborados para reduzir o sofrimento dos animais, e todos os proprietários foram informados sobre os possíveis riscos e como proteger a equipe de pesquisa da infecção por SARS-CoV-2 por meio do uso adequado de equipamentos de proteção individual.
- 2- “Investigação de patógenos em gatos comunitários no município de Belo Horizonte, Minas Gerais”, parceria entre Secretaria Municipal de Saúde/Gerência de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte e Universidade Federal de Minas Gerais, CEUA 185/2016 e SisGen: AAD865B (Anexos 2 e 3).
- 3- “Levantamento do vírus Sars-Cov-2 e coinfecção com parasitos em mamíferos pertencentes à Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: caracterização parasitológica e molecular baseada na perspectiva de Uma Só Saúde”; no Anexo 4 pode ser consultado o termo de parceria de pesquisa entre a UFMG e a Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas como parte do serviço prestado pela Universidade Federal de Minas Gerais

(UFMG) à Fundação Parque Municipal e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZB), sob o código de ramal Siex-UFMG 302557.

5.2. Área de estudo

5.2.1. Município Belo Horizonte

Belo Horizonte é um município brasileiro e capital do estado de Minas Gerais, situado a 850 metros de altitude (S 19°48'57" W 43°57'15") (Figura 5). O município se estende por 331,4 km², com população estimada pelo IBGE para 1º de julho de 2021 de 2.530.701 habitantes com uma densidade demográfica de 7 580,2 habitantes por km², tornando-se o sexto município mais populoso do país. A cidade é composta totalmente por zona urbana, formada por 487 bairros, dispostos em nove administrações regionais. O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do município é considerado alto, segundo dados do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD), com valor de 0,810, o segundo maior de Minas Gerais e o vigésimo do Brasil. O município é o principal polo econômico de Minas Gerais e frequentemente apontado como a terceira maior cidade em importância econômica do país. O clima de Belo Horizonte é classificado como tropical com estação seca (Aw segundo Köppen). A temperatura média anual está em torno de 22 °C sendo que o verão é moderadamente quente, com alta precipitação, enquanto o inverno é agradável, praticamente sem precipitação (Mundoeducação, 2022).

5.2.2. Parque Municipal Américo Renné Giannetti de Belo Horizonte (PqMARG)

O Parque Municipal Américo Renné Giannetti é o patrimônio ambiental mais antigo de Belo Horizonte. Conhecido como Parque Municipal, se localiza no hipercentro, região mais adensada da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (S 19°55'37" W 43°56'42") (Figura 5, 5A), com área de 182 mil m², próximo à região hospitalar, perto de hospitais, laboratórios de diagnósticos, Faculdade de Medicina, e Centro de Saúde do estado. O PqMARG atualmente serve como refúgio para várias espécies da fauna silvestre, doméstica e sinantrópica o que faz dele um ecossistema bem representativo. O espaço abriga aproximadamente 70 espécies de vertebrados, incluindo mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes. Animais como gambás de orelha branca e o mico-estrela, podem ser observados no parque pelos visitantes (PBH, 2023).

5.2.3. Jardim Zoológico da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte – (FPMZB-BH)

O Jardim Zoológico da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica, existente desde 1959, está localizado na região da Pampulha da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (S 19° 51' 35", 0' 44" W 38") (Figura 5, 5B), é considerado um importante espaço de lazer e principalmente de educação ambiental para visitantes de Belo Horizonte e de outras cidades do país. O Zoológico de BH possui aproximadamente três mil animais de mais de 250 espécies entre répteis, aves, anfíbios e mamíferos. A aquisição e permuta de animais passou a ser controlada por órgãos ambientais, mantendo o controle rígido das espécies e de regras sanitárias. Desde então o Zoo passou a participar de uma rede que lida com a conservação das espécies da fauna silvestre e que traça planos de manejo e diretrizes que são seguidas por entidades de conservação nacionais e internacionais (PBH, 2022).

5.3. Animais do estudo

5.3.1. Origem dos animais do estudo

Foram estabelecidas parcerias para obtenção das amostras biológicas em animais de vida livre e de cativeiro com as seguintes entidades: Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) e Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica, ambas coordenadas pela Prefeitura Municipal de Belo Horizonte (PBH).

No Projeto PetCOVID-19 foram incluídos animais de companhia cujo tutor estivesse em isolamento domiciliar, com diagnóstico laboratorial confirmado para SARS-CoV-2 através de RT-qPCR ou resposta imunológica apenas por IgM (caracterizando doença ativa), até sete dias da data do diagnóstico, residente em (MG). Sendo considerados como animais de companhia os mamíferos domésticos como cães e gatos.

Figura 5 – Localização geográfica das áreas onde as coletas foram realizadas: Município Belo Horizonte (S 19°48'57" W 43°57'15"), Parque Municipal Américo Renné Giannetti de Belo Horizonte (S 19°55'37" W 43°56'42"), Jardim Zoológico de Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (S 19° 51' 35", 0' 44" W 38").

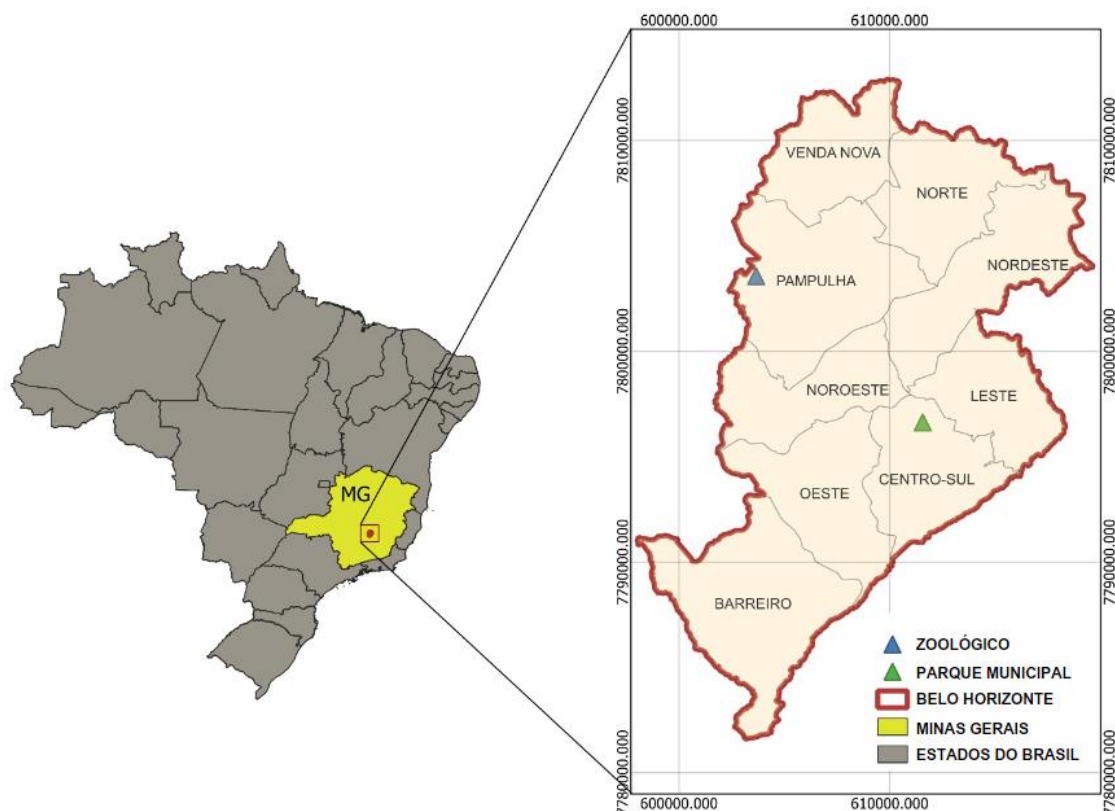


Figura 5A - Área de estudo - Parque Municipal Américo Renné Giannetti em Belo Horizonte, metrópole com mais de 2.500.000 habitantes. Espaço com cerca de 180.000 m², considerado um importante refúgio para fauna e flora.



Fonte: Prefeitura de Belo Horizonte

Figura 5B - Área de estudo - Jardim Zoológico da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte, com cerca de 1,4 milhão de m².



Fonte: Prefeitura de Belo Horizonte

5.4. Captura dos Animais e coleta de amostras sanguíneas

5.4.1. Cães e gatos domésticos do projeto PetCOVID-19

Os tutores dos animais de companhia participantes do projeto foram recrutados através de demanda espontânea, com a divulgação da pesquisa em redes sociais, canais de divulgação das instituições de pesquisa, universidades e laboratórios envolvidos. Todos os tutores ou familiares voluntários receberam, por e-mail ou aplicativo de comunicação, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 5)

Foram coletadas amostras biológicas com intervalo médio de sete dias, de pelo menos um animal de companhia da residência. A cada visita foi realizada a anamnese e aplicado o questionário *in loco* para avaliação do quadro clínico do animal (Anexo 6). De cada animal foram coletados swabes nasal, orofaríngeo e retal (para RT-qPCR), além de sangue total (para diagnósticos parasitológicos) e sangue para obtenção de soro (para soroneutralização e diagnósticos sorológicos), totalizando cinco amostras por animal. Caso a amostra inicial fosse positiva, uma segunda coleta foi realizada duas semanas após a primeira, no mesmo local.

Foram considerados positivos para COVID-19 os animais que tinham ao menos um swabe positivo à RT-qPCR. As amostras obtidas através de swabe foram conservadas em tubos estéreis contendo meio de transporte viral (COPAN™ eNAT (COPAN Diagnostics, CA, USA) sob refrigeração (2-8°C) por até 72h, congeladas em -20°C por até 30 dias ou em -80°C por tempo indeterminado e foram processadas através do método de RT-qPCR. As amostras de sangue total e soro foram mantidas congeladas a -20°C até seu processamento.

Todas as amostras foram identificadas com o nome do município Belo Horizonte, se são cães ou gatos com a letra inicial da palavra e o número consecutivo segundo ordem como eram coletados na sua residência (BHC01, BHG01...)

5.4.2. Gatos do PqMARG

As amostras estudadas foram provenientes de gatos capturados pela Secretaria Municipal de Belo Horizonte que desenvolvem um Programa de Controle Ético da População Animal. As coletas foram realizadas desde fevereiro até setembro de 2021. Os gatos foram capturados de segunda a quarta no PqMARG, exceto em situações onde as condições climáticas não eram favoráveis para o trabalho ou feriados, por uma equipe de Agentes de Combate a Endemias (ACEs) pertencentes ao CCZ da PBH, treinados para o manejo de animais. As buscas ativas dos animais foram realizadas por toda a área do parque PqMARG sendo o recolhimento de gatos em diversos pontos como: Carandaí, o Coreto, a Administração, o Teatro, o Imaco, a área dos Brinquedos, Ezequiel Dias, entre outras (Carvalho, 2018). Foram capturados por meio de puçá, captura manual e por gatoeiras, o método dependeu principalmente do comportamento dos gatos, sendo que; o uso de armadilhas (gatoeiras) devidamente montadas foram utilizadas para os gatos que se apresentaram ariscos e agressivos; foram capturados diretamente com as mãos, com o auxílio de luvas para proteção aqueles gatos que se apresentaram dóceis; e no caso de aqueles gatos de comportamento dócil, mas que se tornam ariscos em situações de estresse, foi utilizado o puçá.

Como parte do Programa de Controle Ético da População Animal, os gatos capturados foram esterilizados. Só eram castrados gatos considerados saudáveis. No momento da sedação para a cirurgia de esterilização foram realizadas as coletas das amostras biológicas por um médico veterinário responsável pela manutenção das amostras até a entrega ao laboratório do CCZ ou na própria instalação do PqMARG. O profissional do CCZ utilizou os equipamentos de proteção

individual (EPIs): avental descartável, luva descartável, máscara e *face shield*. As amostras de sangue foram coletadas preferencialmente através da punção da veia jugular, sendo sangue total em tubo com EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) em um volume mínimo de 1 mL por animal e sangue em tubo sem EDTA para a obtenção de soro. Também foram coletadas pele de orelha durante o procedimento de marcação do animal, armazenadas em microtubos contendo álcool 70%. As amostras foram mantidas congeladas a -20°C até seu processamento.

Além disso, a idade do animal foi estimada mediante a observação de características como o porte e dentição dos animais (Carvalho, 2018). Para a pesquisa do Vírus SARS-CoV-2 foram coletadas amostras de swabes orofaríngeos e retal em tubos contendo a solução inativadora do vírus de tiocianato de guanidina, fornecida pelo Laboratório de Biologia Integrativa do ICB.

Todas as amostras foram identificadas como Gato do Parque (GP) e o número consecutivo segundo como eram levados para a castração (GP01, GP02...)

5.4.3. Mamíferos pertencentes ao Jardim Zoológico da FPMZB-BH

No Jardim Zoológico as coletas foram realizadas entre novembro de 2021 a março de 2023. Foram avaliados indivíduos da Classe Mammalia pertencentes ao plantel da FPMZB de acordo com a necessidade de manejo dos mesmos. A captura e contenção dos animais foi realizada pela equipe de médicos veterinários pertencentes ao Zoológico.

As amostras biológicas foram coletadas na FPMZB após a contenção física e /ou química pela equipe de médicos veterinários da Fundação. As coletas de material foram realizadas em consonância com a programação do manejo do plantel de mamíferos do Zoo, e oportunamente, quando houve a necessidade de contenção física e/ou química, foram solicitadas a coleta de todas as espécies de mamíferos presentes no zoológico sendo pelo menos um espécime de cada uma delas. Os dados sobre as espécies animais e a quantidade de espécimes solicitadas encontram-se na Tabela 1, porém os espécimes amostrados dependeram do manejo usual e necessário do zoo.

Tabela 1- Detalhamento das espécies alvo do presente estudo e quantidade de indivíduos, por espécie.

ANIMAL	NOME CIENTÍFICO	TOTAL	QUANTIDADE SOLICITADA
Leão	<i>Panthera leo</i>	1	1
Onça pintada	<i>Panthera onca</i>	2	2
Onça parda	<i>Puma concolor</i>	2	2
Gato palheiro	<i>Leopardus braccatus</i>	4	2
Lobo guará	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	6	3
Furão	<i>Galictis cuja</i>	1	1
Gorila	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	7	4
Chimpanzé	<i>Pan troglodytes</i>	1	1
Barrigudo	<i>Lagothrix lagotricha</i>	1	1
Bugio	<i>Alouatta sp</i>	9	5
Macaco prego	<i>Sapajus apella</i>	6	3
Macaco aranha	<i>Ateles sp</i>	1	1
Parauacu	<i>Pithecia sp</i>	1	1
Mico leão preto	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	4	2
Sagui imperador	<i>Saguinus imperator</i>	4	2
Mico leão dourado	<i>Leontopithecus rosalia</i>	6	3
Talapoin	<i>Miopithecus talapoin</i>	2	1
Órix	<i>Oryx gazella</i>	2	1
Cervo dama	<i>Dama dama</i>	7	3
Cervo nobre	<i>Cervus elaphus</i>	3	2
Cervo do pantanal	<i>Blastocerus dichotomus</i>	2	1
Veado catingueiro	<i>Subulo gouazoubira</i>	3	1
Tamanduá bandeira	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	7	3
Tamanduá mirim	<i>Tamandua tetradactyla</i>	1	1
Cateto	<i>Pecari tajacu</i>	3	2
Paca	<i>Cuniculus paca</i>	7	3
Cutia	<i>Dasyprocta azarae</i>	2	2
Anta	<i>Tapirus terrestris</i>	4	2
Ouriço	<i>Erinaceus europaeus</i>	7	3
Zebra	<i>Equus quagga burchellii</i>	1	1
Cobo meia lua	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	1	1
Rinoceronte	<i>Ceratotherium simum</i>	1	1
Elefante	<i>Loxodonta africana</i>	3	1
Hipopótamo	<i>Hippopotamus amphibius</i>	3	1
Camelo	<i>Camelus bactrianus</i>	1	1
Lhama	<i>Lama glama</i>	1	1

Os recipientes para coleta dos diferentes materiais foram fornecidos pelo laboratório de Protozoologia Veterinária-PROTOVET. Todas as amostras foram identificadas como Animais do Zoológico (AZ) e número consecutivo segundo sua chegada ao laboratório (AZ01, AZ02...), em caso de chegar mais de uma amostra no mesmo dia o pesquisador decidiu a ordem consecutiva para eles, sempre fazendo coincidir nome/espécie do animal com o código de identificação. As amostras foram armazenadas até a realização das análises.

Em tubos a vácuo com ou sem anticoagulante (EDTA), foram coletados, por punção da veia jugular, 5 mL de sangue de cada espécime, armazenados a -20°C até seu processamento. Amostras biológicas (swabe nasal, oral e retal) que foram avaliadas para SARS-CoV-2 foram coletadas em tubos contendo o líquido preservante de DNA/RNA Shield™ (Zymo Research, USA) disponibilizada pelo Laboratório de Biologia Integrativa (LBI) e conservados a -80 °C até seu processamento.

5.5. Processamentos das amostras

As amostras sanguíneas foram processadas da seguinte maneira:

- a) Uma alíquota da amostra sangue total acondicionada em microtubos de 1,5 mL, devidamente identificados e congelados em temperatura de -20° C para extração de DNA. O restante foi centrifugado para obtenção de plasma e congelado como estoque.
- b) Na amostra de sangue sem anticoagulante após formação do coágulo, os tubos foram centrifugados e os soros separados e aliquotados, congelados em temperatura de -20° C, para posterior análise sorológica.

5.6. Análises laboratoriais

5.6.1. Locais de realização das análises laboratoriais

As análises laboratoriais referentes à pesquisa do SARS-CoV-2 foram realizadas no TECSA Laboratório Credenciado Nacional (Belo Horizonte, Brasil); Laboratório de Retrovírus pertencente ao Departamento de Medicina Preventiva, Escola Veterinária da UFMG e no Laboratório de Biologia Integrativa (LBI) pertencente ao Departamento de Genética, Ecologia e Evolução.

Os testes sorológicos para *Toxoplasma gondii* foram realizados no Laboratório de Toxoplasmose, pertencente ao Departamento de Parasitologia, os dois últimos pertencentes ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

As análises laboratoriais dos hemopatógenos foram realizados no Laboratório de Parasitologia Veterinária (ProtoVet), pertencente ao Departamento de Medicina Veterinária

Preventiva da Escola de Veterinária, UFMG. Na Figura 6, encontra-se um organograma esquematizando a metodologia utilizada no presente estudo.

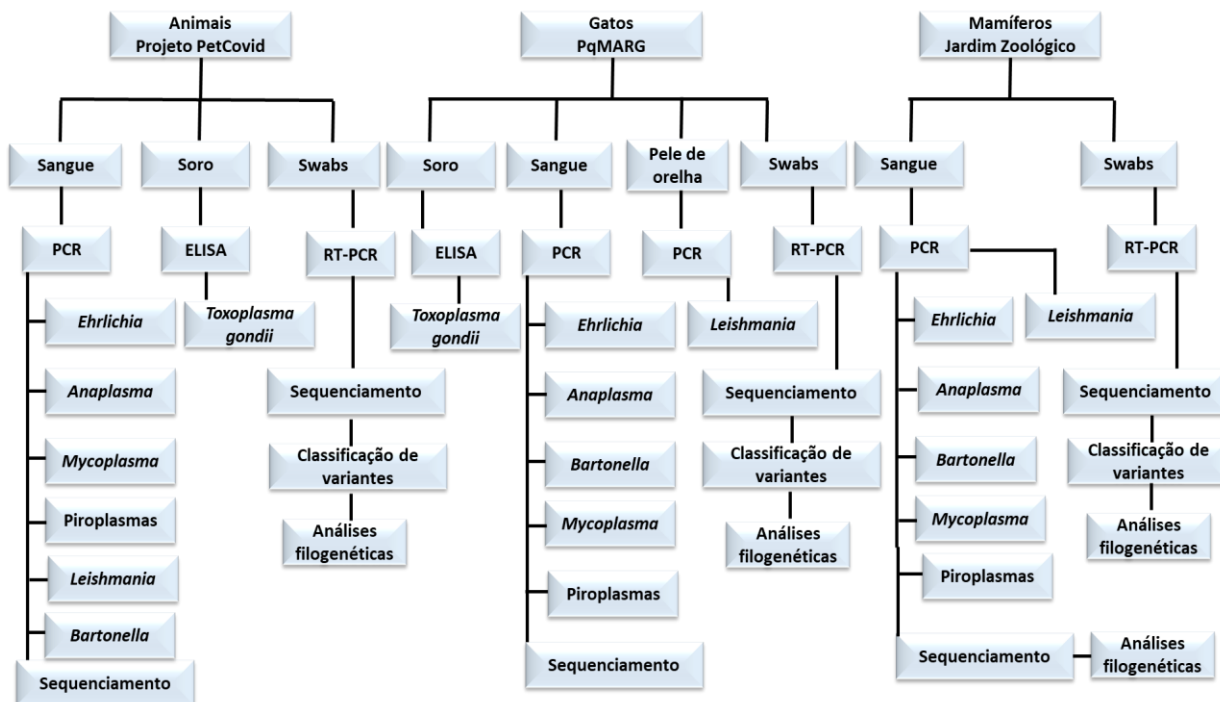


Figura 6 - Organograma esquematizando a metodologia utilizada no presente estudo

5.7. Análises moleculares

5.7.1. Diagnóstico molecular de SARS-CoV-2

A realização dos testes moleculares para avaliar a presença de RNA específico para SARS-CoV-2 foram realizados nos Laboratórios TECSA (Belo Horizonte, Brasil) em parte das amostras obtidas pelo projeto PetCovid e o restante das amostras no LBI do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

5.7.1.1. Procedimentos de RT-qPCR Laboratórios TECSA

O RNA total das amostras de swabe foi extraído usando um kit comercialmente disponível (Maxwell® RSC simply RNA Tissue Kit, Promega Co., Madison, WI, USA) e uma plataforma

automatizada (Maxwell® RSC 48, Promega Co., Madison, WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os testes de SARS-CoV-2 RT-qPCR foram realizados usando um kits comercialmente disponíveis (GoTaq® 1-Step RT- Promega Co., Madison, WI, EUA) e (2019-nCoV, Integrated DNA Technologies – IDT, Coralville, IA, EUA) visando duas regiões: 2019 nCoV_N1 (F: GACCCCAAAATCAGCGAAAT, R: TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG e P: ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC) e 2019 nCoV_N2 (F: TTACAAACATTGGCCGCAAA, R: GCGCGACATTCCGAAGAA e P: ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG) conforme descrito anteriormente para a detecção de SARS-CoV-2 (Epifanio *et al.* 2021). A RT-qPCR foi realizada em termociclador comercial (QuantStudio™ 1 – Bloco de 0,2 mL de 96 poços, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). A ciclagem consistiu em um estágio de transcrição reversa a 50°C por 15 minutos, inativação da transcriptase reversa e ativação da DNA polimerase a 95°C por 2 minutos, seguido por 45 ciclos de 95°C por 3 segundos e 55°C por 30 segundos. Um valor limite de ciclo (valor CT) inferior a 40 foi definido como um resultado de teste positivo (Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit (IVD), FDA, 2021). Todas as amostras foram testadas em duplicata e só foram consideradas positivas para SARS-CoV-2 quando pelo menos dois genes foram amplificados. Às amostras com apenas um alvo amplificado foram consideradas inconclusivas.

5.7.1.2. Procedimento de RT-qPCR LBI

5.7.1.2.1. Extração de RNA

O procedimento de extração de RNA das amostras coletadas foi feito a partir dos tubos de coleta contendo amostras de swabes e meio de transporte (tiocianato de guanidina ou DNA/RNA Shield™). O RNA total das amostras de swabes foi extraído usando um kit comercialmente disponível (PureLink™ RNA Mini Kit, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo as recomendações do fabricante segundo o protocolo para purificação de RNA de amostras líquidas. Cada lote de extração incluiu um controle negativo contendo água livre de nuclease no lugar da amostra.

5.7.1.2.2. RT qPCR

As amostras de RNA extraído foram testadas para a presença de dois alvos do gene do nucleocapsídeo (N1 e N2) do SARS-CoV-2 além de um gene constitutivo (*Housekeeping gen*)

como controle endógeno (β -actina) por meio de ensaio RT-qPCR. A sequência dos iniciadores e sondas fluorescentes utilizados no diagnóstico foram sugeridas pelo CDC dos EUA (EUA 200001)⁷⁶. Para o alvo N1, as sequências dos iniciadores direto, reverso e da sonda utilizadas foram, respectivamente: 5'-GACCCCAAAATCAGCGAAAT-3', 5'-TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG-3', e 5'-FAMACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-3'. Para o alvo N2, as sequências dos iniciadores direto, reverso e da sonda utilizadas foram, respectivamente: 5'-TTACAAACATTGGCCGCAAA-3', 5'-GCGCGACATTCCGAAGAA-3' e 5'-FAMACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG-3'. Para o alvo β -actina (Kessler *et al.*, 2009), as sequências dos iniciadores direto, reverso e da sonda utilizadas foram, respectivamente: F 5'-CAACCGTGAGAAGATGACTCAGA-3', R 5'-CCCAGAGTCCATGACAATACCA-3' e P 5'-FAMTCTCTGTACGCTTCTGGCCGCACC-3'. Para o diagnóstico via RT-qPCR foi utilizado o kit iTaq™ Universal Probes One-Step – BIO-RAD. As amostras foram diagnosticadas em placas com capacidade de 96 poços (Ultralux).

Cada placa continha um controle negativo da mistura (água livre de nuclease), um controle negativo da extração (água livre de nuclease) e um controle positivo (plasmídeos com sequências dos três alvos). A mistura da PCR foi preparada de acordo com as instruções do fabricante e contendo, para cada alvo: 5 μ L do reagente Master Mix iTaq universais sondas DNA polimerase (2x), 0,25 μ L da enzima transcriptase reversa (RT) iScript™, 0,75 μ L do *pool* iniciador para os três alvos, além de 4 μ L do RNA a ser testado, resultando num volume total de 10 μ L por reação.

As PCR em tempo real foram realizadas no aparelho CFX Opus 96, BIO-RAD, CA, USA de acordo com a seguinte ciclagem como descrito anteriormente por Lu *et al.*, 2020 com modificações: transcrição reversa a 50°C por 10 minutos (ciclo único), inativação da transcriptase reversa e ativação da DNA polimerase a 95°C por 3 minutos (ciclo único) e 45 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos) e anelamento (55°C por 30 segundos) e extensão (60°C por 30 segundos). A amplificação dos três alvos para cada amostra foi analisada no *software* do instrumento de PCR em tempo real utilizado. Alvos com *Cycle Threshold* (CT) de amplificação $\leq$ 40 foram considerados detectáveis. Os resultados de cada amostra foram interpretados da seguinte maneira: detecção dos dois alvos virais e do controle endógeno: amostra positiva para o SARS-CoV-2; detecção de um dos alvos virais e do controle endógeno: amostra indeterminada; detecção apenas do controle endógeno: amostra negativa para o SARS-CoV2; ausência de detecção do

controle endógeno: amostra inválida (Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit (IVD), 2021).

5.7.1.2.3. Sequenciamento do genoma viral

A análise foi realizada no Laboratório de Biologia Integrativa do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras consideradas positivas para o SARS-CoV-2 foram triadas com base no CT da amplificação de RT-qPCR. Amostras com $CT \leq 30$ foram consideradas elegíveis para os procedimentos de amplificação do genoma viral, montagem de bibliotecas e sequenciamento (WHO, 2021). O kit utilizado foi QIAseq® SARS-CoV-2 Primer Panel - QIAGEN, uma abordagem de sequenciamento por amplificação via PCR de acordo com as instruções do fabricante descritas no QIAseq SARS-CoV-2 Primer Panel Handbook 03/2021. As amostras foram convertidas em cDNA por meio de transcrição reversa e submetidas primeiramente à amplificação dos genomas virais e preparação das bibliotecas de DNA, seguido da quantificação e verificação da integridade das bibliotecas de DNA, posteriormenete foi realizado o sequenciamento do genoma viral, montagem dos genomas e determinação das linhagens (QIAseq SARS-CoV-2 Primer Panel Handbook 03/2021).

As amostras que testaram positivo para SARS-CoV-2 por RT-PCR, com valores de ciclo umbral (C_t) >30 , mesmo considerando que apresentam altos valores de C_t , foram também sequenciadas com o sequenciamento de nova geração (NGS) usando um procedimento para amostras com CT altos com o protocolo xGen™ SARS-CoV-2 Amplicon Panel xGen SARS-CoV-2 S Gene Amplicon Panel (Integrated DNA Technologies, Estados Unidos), realizado de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado em um MiSeq (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos).

Os dados gerados após o sequenciamento foram filtrados com Trimmomatic v0.39 (Bolger *et al.*, 2014), para aparar bases de baixa qualidade (Phred score < 30) e remover *reads* curtos (< 50 nucleotídeos), bem como adaptadores e sequências de primers. Posteriormente, as leituras foram mapeadas contra o genoma de referência SARS-CoV-2 (número de acesso: NC_045512.2) com o programa Bowtie2 (Langmead *et al.*, 2019). Os arquivos de mapeamento foram manipulados com *samtools* (Li, 2011), enquanto a opção de consenso *bcftools* (Li, 2011) foi usada para estimar as sequências consensuais do genoma. Locais de baixa cobertura foram mascarados com *bedtools* (Quinlan e Hall, 2010). Bases com menos de 10x de profundidade de sequenciamento foram

mascaradas. Sequências com menos de 70% de amplitude de cobertura do genoma foram removidas de análises posteriores.

5.7.1.2.4. Classificação da linhagem SARS-CoV-2 e análises filogenéticas

Os genomas gerados no presente estudo foram submetidos ao programa Pangolin v.3.1.14 para classificação de linhagens. Para corroborar os resultados encontrados no Pangolin, as sequências consenso foram classificadas usando o aplicativo da web NextClade v2.8.1 (Aksamentov *et al.*, 2021). Todos os genomas foram depositados no banco de dados GISAID EpiCoV. Para confirmar a classificação da linhagem, foi criado um conjunto de dados de referência com genomas públicos disponíveis no banco de dados GISAID EpiCoV. Este conjunto de dados possui genomas humanos, felinos, caninos e animais silvestres das linhagens Alpha, Zeta, Gamma, Delta e Ômicron. O conjunto de dados foi alinhado com o minimapa v e uma filogenia de máxima verossimilhança foi inferida usando o programa IQ-tree v2.0.3 sob o modelo GTR+F+I+G4.

5.8. Diagnóstico molecular dos hemopatógenos no Laboratório ProtoVet.

5.8.1. Extração de DNA

A extração de DNA de sangue total foi realizada com o “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega®, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante para 300µL de sangue total. Após a extração a qualidade e a concentração das amostras foram determinadas através da análise em NanoDrop (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek®), e os DNAs armazenados em freezer -20°C até seu processamento através da PCR. Para avaliar a eficiência das extrações dos materiais genéticos foram submetidas à amplificação do gene constitutivo da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), GAPDH-F- 5'- CCTTCATTGACCTCAACTCAT-3'; GAPDH-R- 5'- CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3' (400pb), com um ciclo de amplificação de 95°C por 5 min; 35 ciclos de 95°C por 15 s, 50°C por 30s e 72°C for 30s; extensão final de 72 °C for 5 min. os produtos de PCR foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% (Birkenheuer *et al.*, 2023).

5.8.2. Amplificação do DNA

Diversos tipos de PCRs foram realizados para as amplificações do DNA devidamente extraídas de acordo com o hospedeiro alvo:

- Convencional: *Ehrlichia canis*, *Bartonella* spp, *Mycoplasma* spp. hemotrópicos, *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’, *Cytauxzoon felis* e *Leishmania* spp.
- Semi-Nested-PCR: *Babesia vogeli*,
- Nested-PCR: *Anaplasma/Ehrlichia* de granulócitos e plaquetas, *Ehrlichia monocítica*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma phagocytophilum*, protozoários da Ordem Piroplasmida
- RFLP- PCR- Análise de polimorfismo de fragmentos de restrição utilizando a PCR: *Leishmania* spp.

As reações de amplificação foram realizadas conforme padronizado por Silveira *et al.*, (2014), utilizando o reagente GoTaq Green Master Mix (Promega®, EUA), iniciadores específicos e DNA-amostra (volume final de 10µL: 5µL mix, 3,6µL água, 0,4µL primers (iniciadores) *forward* + *reverse*, e 1µL (10-20ng) DNA-amostra). Nas reações, que são compostas por segunda reação, o volume final de 10µL é composto por 9µL do Mix + 1µL do produto obtido na primeira reação. As amostras de controles positivos estão descritas no Quadro 1 e os controles negativos das reações foram a água de milli-Q ultrapura DNase e RNase free que acompanha o kit do reagente GoTaq Green Master Mix. As sequências dos iniciadores utilizados, alvos, tamanho esperado dos fragmentos dos produtos amplificados, assim como as referências utilizadas estão descritas no Quadro 2. As PCRs foram realizadas em aparelho termociclador automático (Bio-Rad®, USA) com os programas especificados no Quadro 3a e 3b. Para melhor compreensão da dinâmica das PCRs realizadas um fluxograma foi elaborado (Figura 7).

Quadro 1- Controles positivos utilizados em cada reação da PCR

Reação	Controle positivo
GAPDH	DNA de cão sem infecção.
Piroplasmida	Bezerro experimentalmente infectado com <i>Babesia bigemina</i>
<i>Cytauxzoon felis</i>	Felídeo positivo com sequenciamento confirmado
<i>Babesia vogeli</i>	Cão experimentalmente infectado
<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> de granulócitos e plaquetas (AEGP)	Cultivo de <i>A. phagocytophilum</i> em células IDE8
<i>Anaplasma platys</i>	Cão positivo com sequenciamento confirmado
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Cão positivo com sequenciamento confirmado – MSP4 e MSP2
<i>Anaplasma marginale</i>	Amostra de sangue de bovino experimentalmente infectado com <i>A. marginale</i>
<i>Ehrlichia</i> monocítica	Amostra de sangue de cão naturalmente infectado com <i>Ehrlichia canis</i> , confirmado por sequenciamento nucleotídico seguido de análises filogenética
<i>Ehrlichia canis</i>	Cão positivo com sequenciamento confirmado
<i>Mycoplasma</i> spp. hemotrópico	Amostra de sangue de ruminante naturalmente infectado com <i>Mycoplasma</i> spp. confirmado por sequenciamento nucleotídico seguido de análises filogenéticas
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	Felídeo positivo com sequenciamento confirmado
‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’	Felídeo positivo com sequenciamento confirmado
‘ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ’	Felídeo positivo com sequenciamento confirmado
<i>Leishmania</i> spp.	Cultivo de medula de um cão com LVC Cepa MCAN/BR2000/BH400 <i>Leishmania infantum</i> Cepa PH8 of <i>Leishmania amazonensis</i> Cepa M2903 of <i>Leishmania braziliensis</i>
<i>Bartonella</i> spp.	Felídeo positivo com sequenciamento confirmado

Quadro 2- Sequência de iniciadores utilizados para identificação dos agentes em estudo.

Ordem/Gênero/ Espécie	Sequência (5' para 3')	Iniciador	Alvo	Produto (pb)	Referência
Piroplasmida					
1ª reação	CGGGATCCAACCTGGTTGATCCTGCCC GAATTCCTTGTTACGACTTCTC	RIB-19 RIB-20	18S rRNA	1700	Zahler <i>et al.</i> , 2000
2ª reação	ACCTCACCAGGTCCAGACAG GTACAAAGGGCAGGGACGTA	BAB-rumF BAB-rumR		430	Silveira <i>et al.</i> , 2011
Cytauxzoon felis	CGAATCGCATTGCTTTATGCTCCAA TTGATACTCCGGAAAGAG	Cytaux F+R	18S rRNA	284	Birkenheuer <i>et al.</i> , 2006
Babesia vogeli					
1ª reação	GCATTTAGCGATGGACCATTCAAG ATGCCCCCAACCGTTCCTATTA	BvB1F BvB1_793-772R	18S rRNA	~340	Birkenheuer <i>et al.</i> 2003
2ª reação	GTTCGAGTTTGCCATTTCGTT ATGCCCCCAACCGTTCCTATTA	BCV2-F 793-772R		192	
Anaplasma/Ehrlichia de granulócitos e plaquetas					
1ª reação	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTCTT CCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC	GE3a GE10r	16S rRNA	932	Massung <i>et al.</i> 1998
2ª reação	AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCTGGC AGTATTAAAAGCAGCTCCAGG	GE9f GE2		546	
Anaplasma platys					
1ª reação	AGTTTGATCATGGCTCAG CCATGGCGTGACGGGCAGTGT	8-F 1448-R	16S rRNA	*	Ramos <i>et al.</i> , 2009
2ª reação	GATTTTTGTCGTAGCTTGCTATG TAGCACTCATCGTTTACAGC	PLATYS-F EHR16S-R		678	
Anaplasma phagocytophilum					
1ª reação	ATGAATTACAGAGAATTGCTTGTAGG TTAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTATG	MSP4AP5 MSP4AP3	msp4	849	De la Fuente <i>et al.</i> , 2005
2ª reação	CTATTGGYGGNGCYAGAGT GTTTCATCGAAAATTCCGTGGTA	msp4f msp4r		381	

Quadro 2. Continuação.

Ordem/Gênero/ Espécie	Sequência (5' para 3')	Iniciador	Alvo	Produto (pb)	Referência
<i>Anaplasma marginale</i>					
1ª reação	GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGATTGT TTACCCGGATCCTTAGCTGAACAGGAAT CTTGC	MSP45 MSP43	msp4	872	de la Fuente <i>et al.</i> 2008
2ª reação	CGCCAGCAAACCTTTTCCAAAATATGGGG ACACAGGCAAAT	AnapF AnapR	msp4	294	Silveira <i>et al.</i> 2012
<i>Ehrlichia monocítica</i>					
1ª reação	ACGGACAATTGCTTATAGCCTTACAAC TTTATGGATTAGCTAAAT	NS16SCH1F NS16SCH1 R	16S rRNA	1195	Kawahara <i>et al.</i> , 2009
2ª reação	GGGCACGTAGGTGGACTAG CCTGTTAGGAGGGATACGAC	NS16SCH2F NS16SCH2 R		443	Kawahara <i>et al.</i> , 2009
<i>Ehrlichia canis</i>	CCATAAGCATAGCTGATAACCCTGTTAC TGGATAATAAAACCGTACTATGTATGCT	Ehr1401F Ehr1780R	virB9	377	Azhahianambi <i>et al.</i> , 2018
<i>Mycoplasma hemotrópico</i>	ATACGGCCCATATTCCTACG TGCTCCACCACTTGTTCA	HBTF HBTR	16S rRNA	618	Criado-Fornelio <i>et al.</i> , 2003
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	CGTGGAAGCTAGAGCTTCGCGAGC ATGGTATTGCTCCATCAGACTTTTCG	OH-OK 00CB-r1	16SrRNA	274	Watanabe <i>et al.</i> , 2008
‘<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>’	ATGCCCCCTCTGTGGGGGATAGCCG ATGGTATTGCTCCATCAGACTTTTCG	CA-B2f 00CB-r1	16S rRNA	202	Watanabe <i>et al.</i> , 2008
‘<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i>’	AGAGGCGAAGGCGAAAAC CTACAACGCCGAAACACAAA	CMt-F CMt-R	16S rDNA	138	Peters <i>et al.</i> , 2008
<i>Leishmania spp.</i>	CTGGATCATTTT CCGATG TGATACCACTTA TCGCACTT	LITSR L5.8S	ITS1	300-350	El Tai <i>et al</i> 2000
<i>Bartonella spp.</i>	CTCTTTCTTCAGATGATGATCC AACCAACTGAGCTACAAGCCCT	BartF BartR	16S-23S rRNA região intergênica	145-232	Jensen <i>et al.</i> 2000

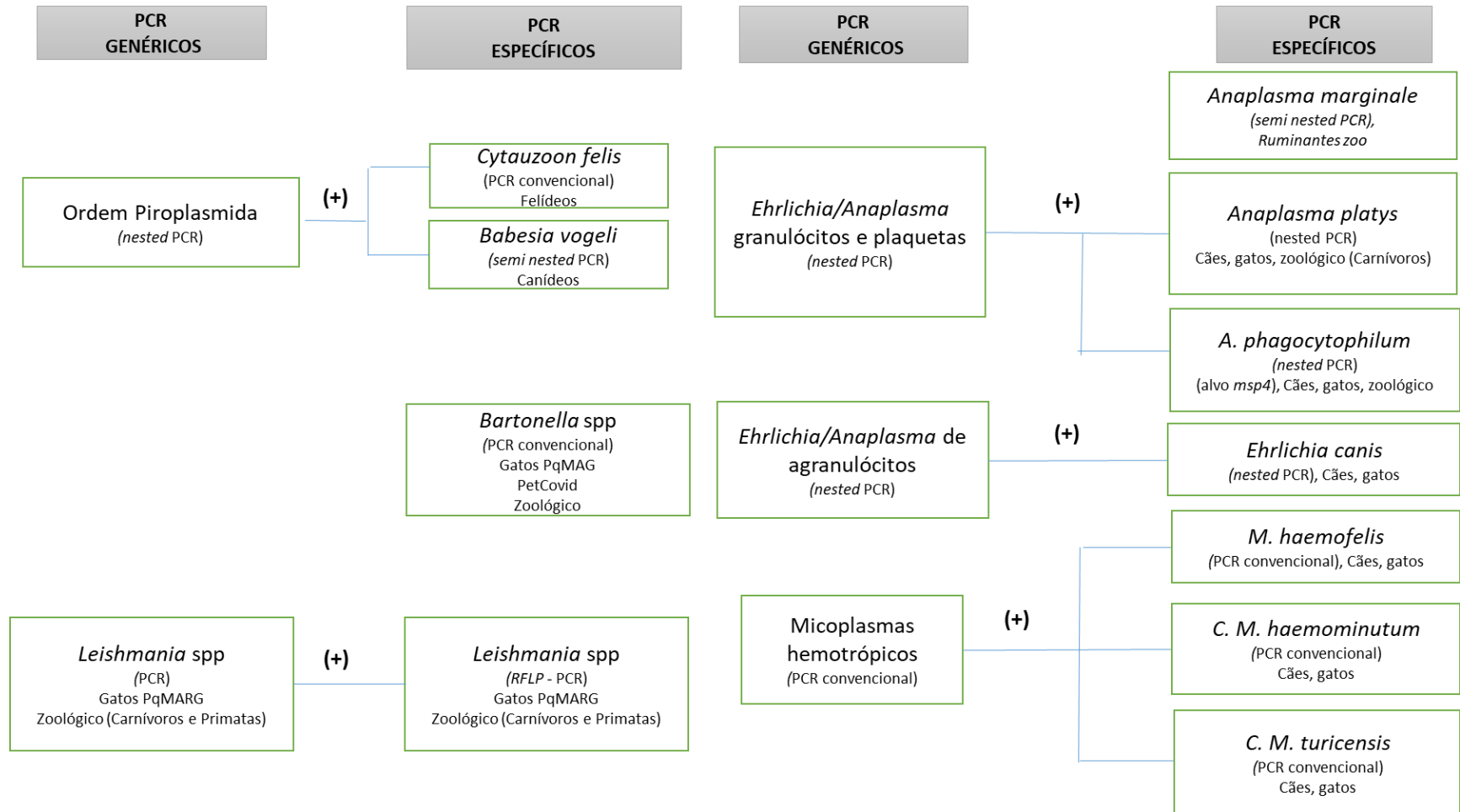
Quadro 3a. Programas utilizados para as reações de amplificação do tipo PCR convencional.

Etapas	<i>Bartonella</i> spp.	<i>Micoplasmas</i> <i>hemotrópicos</i>	<i>M.</i> <i>haemofelis</i> e '<i>C. Mycoplasma</i> <i>haemominutum</i>'	'<i>C. Mycoplasma</i> <i>turicensis</i>'	<i>E. canis</i>	<i>C. felis</i>
Desnaturação inicial	95°C (2')	94°C (10')	94°C (5')	95°C (2')	94°C (4')	95°C (5')
Desnaturação	95°C (1')	95°C (30")	94°C (45")	95°C (10")	94°C (30")	95°C (45")
Anelamento	60° (1')	60°C (30")	58°C (45")	58°C (30")	63° (30")	59°C (45")
Extensão inicial	72°C (30")	72°C (30")	72°C (45")	72°C (30")	72°C (30")	72°C (1')
Ciclos	45x	39x	35x	30x	35x	40x
Extensão final	72°C (5')	72°C (10')	72°C (5")	72°C (5')	72°C (2')	72°C (5")
Hold	4°C (∞)	10°C (∞)	8°C (∞)	8°C (∞)	12°C (∞)	8°C (∞)

Quadro 3b- Programas utilizados para as reações de amplificação do tipo, semi-*nested*, *nested* PCR

Etapas	Piroplasmida / <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> de granulócitos e plaquetas	<i>Anaplasma platys</i>		<i>A. phagocytophilum</i> / <i>A. marginale</i>	<i>Babesia vogeli</i>	
	1ª e 2ª Reação	1ª Reação	2ª Reação	1ª e 2ª Reação	1ª Reação	2ª Reação
Desnaturação inicial	95°C (2')	95°C (5')	95°C (5')	95°C (5')	95°C (5')	95°C (2')
Desnaturação	94°C (30")	95°C (30")	95°C (30")	95°C (45")	95°C (45")	94°C (30")
Anelamento	55°C (30")	53°C (30")	55°C (30")	58°C (45")	58°C (54")	55°C (30")
Extensão inicial	72°C (1')	72°C (1'30")	72°C (1'30")	72°C (45")	72°C (45")	72°C (1')
Ciclos	40x	34x	34x	50x	30x	40x
Extensão final	72°C (5')	72°C (5")	72°C (5")	72°C (5")	72°C (5")	72°C (5')
Hold	12°C (∞)	10°C (∞)	10°C (∞)	4°C (∞)	4°C (∞)	12°C (∞)

Figura 7 - Fluxograma esquematizando apresentando a sequência das reações de PCR realizadas para as amostras utilizadas no presente estudo.



Os produtos amplificados foram misturados ao revelador GelRed (Biotium®, USA) diluído em água milli-Q ultrapura DNase e RNase *free*, na proporção de 1:400 (5µL produto + 2µL corante) e posteriormente submetidos a eletroforese (30 minutos, 100V) em gel de agarose 1%, 1,5% ou 2%, de acordo com o tamanho dos amplicons gerados, utilizando o tampão de corrida TAE 0,5X. Para a determinação dos fragmentos do amplicons foram utilizados marcadores de tamanho molecular de 100pb ou de 1kb (Promega®, USA), variando de acordo com o tamanho das bandas investigadas. Os resultados obtidos após a eletroforese foram visualizados através de um transluminador de luz ultravioleta e registrados pelo fotodocumentador L-PIX (Loccus Biotenologia LTDA/Brasil). As amostras foram consideradas positivas após análise comparativa com a banda referente ao controle positivo.

5.8.3. Diagnóstico molecular de *Leishmania* spp (Gatos do PqMARG).

Aproximadamente 25 mg de pele de orelha de cada gato do PqMARG foram usados para extração de DNA genômico total (Ortega *et al.*, 2017). A extração foi realizada com o kit Puregene® Core Kit A (Gentra® Puregene® Kits) (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. O DNA obtido foi ressuspensão em 100 µL de tampão de eluição e congelado a -20 °C até a sua utilização. A concentração e a qualidade do DNA foram determinadas usando o Nanodrop (Nanodrop® 2000, Thermo Fisher Scientific).

5.8.3.1. PCR convencional

O gene ribossômico ITS1 específico para *Leishmania* foi amplificado usando os primers LITSR (5-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3) e L5·8S (5-TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT-3). A reação de amplificação foi realizada no volume de 25µL utilizando o reagente GoTaq® Green Master Mix, 2X (Promega®, EUA), iniciadores específicos e DNA-amostra (12,5µL mix, 9,5µL água, 1µL dos iniciadores *forward* e *reverse*, e 1µL de solução de DNA. Todos os testes incluíram um controle negativo sem DNA e controles positivos, listados no Quadro 2. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, 37 ciclos a 94°C por 30s, 53°C por 1 min, 72 °C por 1 min, e uma extensão final durante 72°C por 6 min. Os amplicons de cerca de 300-350 fragmentos de pares de bases (pb) foram visualizados usando um transluminador em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

5.8.3.2. Tipificação por PCR-RFLP

Para identificação de espécies de *Leishmania*, os produtos de PCR (5 µL) foram digeridos com uma enzima endonuclease *HaeIII* 2U, por 1h a 37°C (Restriction Endonuclease *HaeIII* (SigmaAldrich® Inc., USA) de acordo com as instruções do fabricante. A mistura de digestão em banho de gelo contém 1,5 µl de tampão da enzima 10X, 2,5 µl água livre de nuclease e 1,0 µl de enzima. Os fragmentos de restrição (3 µl) + 3 µl de tampão da amostra 2X (0,5% de azul de bromofenol, 0,5% de xileno-cianol, 400mM de Ficoll) foram analisados em gel de poliacrilamida 5% conforme o descrito por Sambrook *et al.*, (1989) a 100 volts em TAE1X [pH 8,0; 0,04 M Tris-acetato, 1 mM EDTA] em 5% de acrilamida/bis-acrilamida, até a completa migração dos fragmentos amplificados de interesses. O produto padrão de restrição de PCR obtido com as espécies *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* como controle positivo e água como controle negativo, permitindo a identificação das espécies de *Leishmania* foram submetidos a eletroforese. Foi utilizado um marcador de tamanho molecular de 50pb ou 100pb (DNA Ladder Plus, Promega®, USA). Após a eletroforese, os fragmentos foram visualizados por coloração em nitrato de prata, de acordo com o protocolo descrito por Santos *et al.*, (1993), fixação (etanol absoluto 10 %, ácido acético 0,5%) por 10 min, coloração (absoluto 10%, acético 0,5%, nitrato de prata 0,2%) por 7-10 min, lavagem rápida em água mili-Q e revelação (hidróxido de sódio 3% p/v e 0,3% de Formaldeído 37% v/v) até visualização das bandas de interesse. Após a revelação, os géis foram novamente transferidos para a solução fixadora e fotografados para a documentação e análises dos resultados.

5.8.4. Sequenciamento nucleotídico

Todos os produtos de PCR positivos foram posteriormente purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Biotechnology Brazil, São Paulo, Brasil) e Biospin Gel Extraction/PCR Purification Kit seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, cada amostra purificada foi submetida a uma nova eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com GelRed, para confirmação da pureza das amostras, além da dosagem em Nanodrop (BioTek Epoch™). O sequenciamento dos amplicons purificados foi realizado no sequenciador automático capilar pelas empresas CT Vacinas/UFMG, Belo Horizonte, Brasil e a ACTGene (Rio Grande do

Sul, Brasil) (<https://actgene.com.br/>). Nos *nested* PCR foram usados os iniciadores da segunda reação. As amostras foram preparadas de acordo com as recomendações das empresas encarregadas do sequenciamento. Cada um dos amplicons foi sequenciado duas vezes, sendo uma vez com o iniciador direto, e uma com o reverso, totalizando duas sequências/amostra, o que permitirá a formação de sequências de consenso.

As sequências foram alinhadas, editadas e analisadas usando o programa *BioEdit*, v7.0.5.3 (Hall., 1999). A identidade de cada sequência foi confirmada por comparação com as sequências disponíveis no GenBank usando o software *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul *et al.*, 1990). Após a comparação da identidade, as sequências analisadas foram caracterizadas em gênero ou espécie, de acordo com o grau de similaridade com os dados já depositados no Genbank e usadas para posterior análise filogenética. As sequências de nucleotídeos amplificadas foram depositadas no GenBank.

5.8.5. Análises filogenéticas

As reconstruções filogenéticas foram feitas depois da obtenção, análise e comparação dos produtos do sequenciamento com sequências depositadas no GenBank. Os programas CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) e MEGA X (Kumar *et al.*, 2004) foram utilizados para alinhamento e análise filogenética, respectivamente.

5.9. Análises sorológicas para *Toxoplasma gondii*

As análises sorológicas para *T. gondii* foram realizadas nas amostras de cães e gatos do projeto PetCOVID e nos gatos do PqMARG.

5.9.1. Preparo de antígeno de *T. gondii* para ELISA

O antígeno a utilizado foi preparado a partir de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* sonificados seguindo o protocolo descrito por Buery *et al.*, (2014) com modificações, seguido de dosagem de proteínas pelo método de Lowry *et al.*, (1951).

Primeiramente os camundongos foram submetidos a eutanásia com 2 a 3 dias de infecção, para obter os taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH), a partir da lavagem da cavidade peritoneal dos camundongos. O material obtido foi centrifugado por 10 minutos a 1400g e o sobrenadante

desprezado. Logo, os pellets formados contendo os taquizoítos foram concentrados em um só tubo, os taquizoítos foram ressuspensos em 2 mL de PBS pH 7,2, depois colocados em banho de gelo.

Em seguida, os taquizoítos foram sonicados por ultrassom (Ultrasonic Homogeneizer - 4710; Coler-Palmer Instrument Co.) em 5 ciclos de 40 hertz (em banho de gelo) durante 1 minuto e com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo para o rompimento das formas parasitárias, procedimento que foi acompanhado através do microscópio. A suspensão com os taquizoítos rompidos foi centrifugada a 10000g a 4°C durante 30 minutos e a concentração de proteínas do antígeno obtido foi determinada pelo método de Lowry *et al.*, (1951). Logo depois o antígeno foi estocado a -20°C até o momento do seu uso.

5.9.2. Ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA

Para a detecção de anticorpos IgG específicos anti-*T. gondii* foi realizado o teste imunoenzimático (ELISA-IgG) indireto segundo Clementino *et al.*, (2007) com algumas modificações.

Numa primeira etapa, as placas de poliestireno de 96 orifícios (SARSTEDT®, Nümbrecht, Germany) foram sensibilizadas com 100 µL em cada poço do antígeno diluído (de acordo com a concentração padronizada: 1,0 ug/poço), em tampão apropriado carbonato/bicarbonato (Coating Buffer) (pH 9,6). Seguida de uma incubação overnight a 4° C. No dia seguinte, a solução do antígeno foi descartada, as placas foram lavadas 2 vezes com solução de lavagem Tween 20 a 0,05% (SST) e secada por inversão em papel absorvente. Após a secagem se colocou a solução bloqueadora com PBS-Caseína 2% a 37 °C por 30 minutos e logo em seguida, a placa foi lavada 2 vezes com SST, secada e colocados os soros.

Tanto os soros a serem testados, como os dois soros controle positivos e os seis soros controle negativos foram diluídos em PBS-T/Caseína 0,25% (PBS-Tween 20 à 0,05% + Caseína até 0,25%), na diluição de 1:100, e distribuídos 100 µL por poço da placa, seguida da incubação a 37°C por 45 minutos. Os soros foram ensaiados em duplicata. Além disso, se colocaram 100 µL de PBS-T/Caseína 0,25% (sem soros) em alguns poços, sendo o branco para zerar o aparelho.

Após a incubação, foram realizadas uma série de 4 lavagens com SST. Logo, foram adicionados a cada poço da placa 100 µL de conjugado anti-IgG do animal a ser testado marcado com peroxidase (SIGMA, produto no A-3415) diluído a 1:1500 em PBS-T/Caseína 0,25%, e posteriormente incubada por 45 minutos a 37 °C. Depois deste período, as placas foram lavadas 4

vezes com SST e secadas por inversão. A reação foi revelada por adição de 100 µL do substrato (2 µg de o-phenilenodiamino (SIGMA) em 10 mL de solução de ácido cítrico e 2 µL de H₂O₂) por poço. Após 20 minutos a reação foi interrompida com 25 µL de H₂SO₄ (4 N) por poço e a leitura realizada em leitor de ELISA (BioTek Epoch™) com filtro de 490nm. foram utilizados como controles brancos, poços de cada placa, com antígeno, conjugado e substrato, sem soro.

O ponto de corte (cut off) para o ELISA foi a média de absorbância de seis amostras de soro do animal a ser testado negativos para *T. gondii* (testados em cada placa) mais três desvios padrão. A média de absorbância dos soros testados em duplicata foi dividida pelo valor do ponto de corte de cada placa para determinar o índice de reatividade (I.R.). Soros com valores de I.R. ≥ 1,0 foram considerados positivos enquanto soros com I.R. < 1,0 foram considerados negativos para a presença de anticorpos anti-*T. gondii*. O IR é uma medida quantitativa que reflete a concentração de anticorpos específicos na amostra, permitindo a identificação de animais expostos ao parasito (Rêgo *et al.*, 2016).

5.10. Análise dos dados

Os dados obtidos foram compilados e analisados utilizando o software Excel 2016 (Microsoft Corporation, WA, EUA) para organização e tabulação, enquanto a análise estatística foi realizada no software Stata versão 16.0 (StataCorp LLC, Texas, EUA), seguindo os procedimentos descritos por Fávero & Belfiore (2017). A frequência de positividade foi calculada e apresentada em percentuais. Para avaliar as associações entre as variáveis, incluindo os resultados dos testes moleculares, sorológicos, sexo e idade, foram utilizados os testes do qui-quadrado (χ^2) e o teste exato de Fisher. O teste do qui-quadrado foi empregado quando as frequências esperadas em todas as células das tabelas de contingência eram ≥ 5 , enquanto o teste exato de Fisher foi utilizado quando as frequências esperadas eram < 5 ou em casos onde a frequência observada era igual a zero. A medida de associação entre as variáveis foi determinada por meio da *odds ratio*, calculada através de modelos de regressão logística, para verificar se a presença de coinfeções representava um fator de risco para a infecção por SARS-CoV-2. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

6. RESULTADOS: CAPÍTULO 1

6.1. Resultados dos animais oriundos do Projeto PetCOVID-19, Município Belo Horizonte

Parte dos resultados da pesquisa que envolve o Projeto PetCOVID-19, já foram publicados nas seguintes referências:

Silva Filho, A.P., Kmetiuk, L.B., Bicalho, G.C., Castillo, A.P., Soares, L.F., Vasconcelos, P., Santos, A.P.S., Carvalho, O.V., Reis, J.K.P., Silveira, J.A.G., Araujo, R.N., Aguiar, R.S., Brandespim, D.F., Pettan-Brewer, C., Biondo, A.W.*, Barbosa, D.S. (2023). **First reported cases of SARS-CoV-2 infection in owned dogs in Belo Horizonte, Brazil.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 75(3), 531-534. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12890>

Galhardo, J.A., Barbosa, D.S., Kmetiuk, L.B., de Carvalho, O.V., Teixeira, A.I.P., Fonseca, P.L.C., de Araújo E Santos, L.C.G., Queiroz, D.C., Miranda, J.V.O., da Silva Filho, A.P., Castillo, A.P., Araujo, R.N., da Silveira, J.A.G., Ristow, L.E., Brandespim, D.F., Pettan-Brewer, C., de Sá Guimarães, A.M., Dutra, V., de Moraes, H.A., Dos Santos, A.P., Agopian, R.G., de Aguiar, R.S., Biondo, A.W. (2023). **Molecular detection and characterization of SARS-CoV-2 in cats and dogs of positive owners during the first COVID-19 wave in Brazil.** Scientific Reports, 13(1), 14418. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41285-0>

Spanhol, V., Resende, C.F., Claudino, M., Melo, A., Moura, A., Fernandes, P., Souza, B.M., Mendes, A., Castillo, A., Nicolino, R.R., Gonçalves Silveira, J.A., Alcantara, L., Van Voorhis, W.C., Reis, J. **Seroprevalence of Anti-Sars-Cov-2 Antibodies in Cats and Dogs of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.** Disponível em SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4921244>

6.1.1. Características da população estudada

Os resultados obtidos nesta etapa de trabalho foram apresentados a seguir separadamente pela espécie animal amostrada.

Como parte do Projeto PetCovid de janeiro de 2021 a agosto de 2022, divulgamos uma pesquisa com tutores de animais que testaram positivo para COVID-19 (no máximo 07 dias) em Belo Horizonte, Minas Gerais. Após sermos contatados por proprietários positivos para SARS-CoV-2, de imediato marcamos visitas. No período assinalado, foram coletadas amostras por swabe orofaríngeo e retal de 86 animais, sendo que 48 (55,8%) eram cães (22 machos e 26 fêmeas) e 38 (44,2%) eram gatos (19 machos e 19 fêmeas) (Figura 8). Em relação a idade, 03 cães e 05 gatos apresentavam entre 0 – 12 meses de vida, 09 cães e 07 gatos entre 13 – 24 meses de vida e 36 cães e 26 gatos com idade superior a 24 meses de vida (Gráfico 1). Somente em um gato não foi possível obter a idade (Tabela 2).

Figura 8 - Representação gráfica das características da população de cães e gatos amostrados em Belo Horizonte, Minas Gerais, tendo em conta uma amostra total de 86 animais, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.

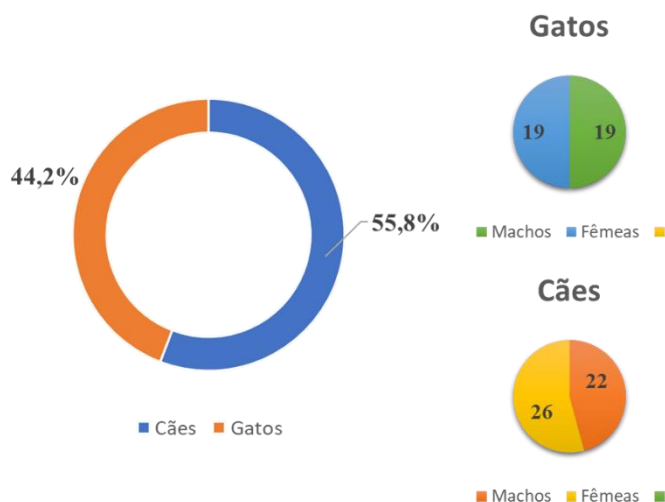
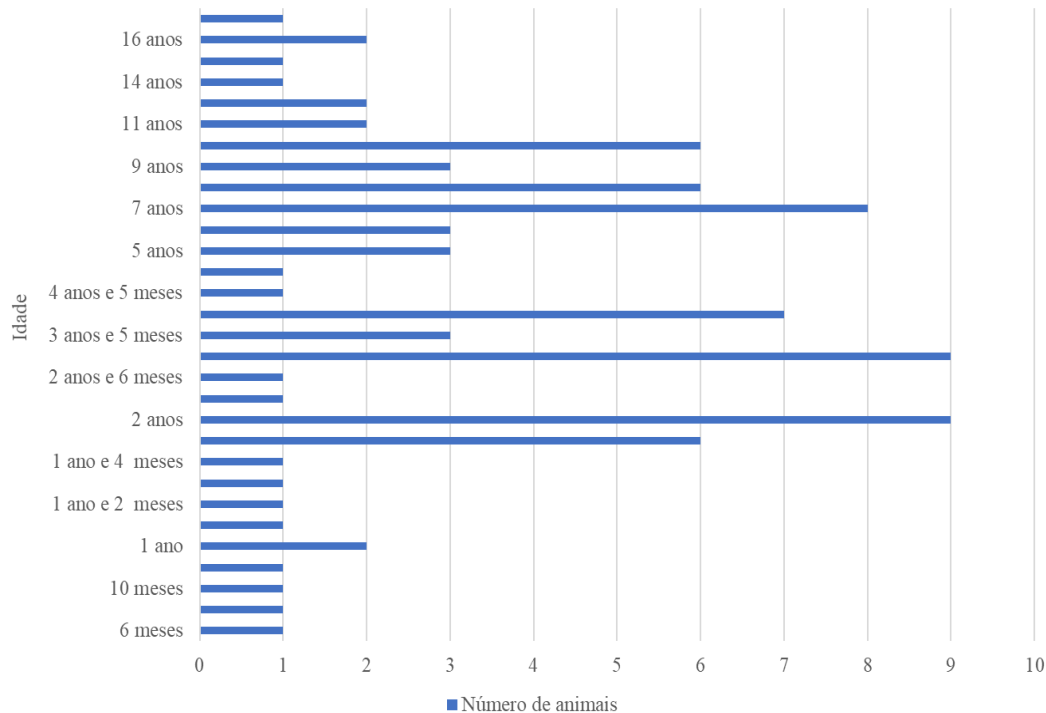


Tabela 2- Análise da idade de cães e gatos amostrados em Belo Horizonte, Minas Gerais, tendo em conta uma amostra total de 86 animais, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.

Idade*	Cães	Gatos	Total
6 meses	1	0	1
9 meses	1	0	1
10 meses	0	1	1
Menos de um ano	0	1	1
1 ano	0	2	2
1 ano e 3 meses	1	0	1
1 ano e 2 meses	1	0	1
1 ano e 3 meses	1	0	1
1 ano e 4 meses	1	0	1
1 ano e 5 meses	3	3	6
2 anos	4	5	9
2 anos e 4 meses	0	1	1
2 anos e 6 meses	0	1	1
3 anos	4	5	9
3 anos e 5 meses	1	2	3
4 anos	2	5	7
4 anos e 5 meses	1	0	1
4 anos e 10 meses	1	0	1
5 anos	2	1	3
6 anos	2	1	3
7 anos	6	2	8
8 anos	4	2	6
9 anos	1	2	3
10 anos	4	2	6
11 anos	2	0	2
13 anos	1	1	2
14 anos	1	0	1
15 anos	1	0	1
16 anos	2	0	2
ND	0	1	1
Total	48	38	86

* Segundo dados informados pelos tutores.

Gráfico 1- Representação gráfica da idade dos cães e gatos amostrados em Belo Horizonte, Minas Gerais, no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.



6.1.2. Detecção da infecção por SARS-CoV-2 nos animais do Projeto PetCOVID-19.

Do total de animais amostrados, 9,3% (8/86) tiveram diagnóstico confirmado para SARS-CoV-2, sendo 7/48 (14,6%) cães e 1/38 (2,6%) gatos, como observado na Tabela 3. Todos os swabes foram submetidos a RT-PCR em tempo real; dos swabes orofaríngeos (n=86), 8,14% (n=7) foram positivos, e dos retais (n=86), 4,7% (n=4) foram positivos. A descrição de cada um dos animais positivos encontra-se relatada nas Tabelas 4 e 5. Em todos os casos, os tutores testaram positivo para SARS-CoV-2 e os animais de estimação não tiveram acesso à rua. Importante ressaltar que nenhum dos animais positivos para SARS-CoV-2 apresentou alteração clínica durante anamnese e exame físico.

Além do primeiro exame, o estudo também realizou uma "retestagem" dos *pets* entre 7 e 14 dias após o primeiro teste para acompanhar sua evolução. De acordo com o especialista, assim como os humanos, os animais passam a testar negativo para a presença do SARS-CoV-2 depois de

um período de tempo. Todas as amostras foram negativas para SARS-CoV-2 no RT-PCR durante esse período.

Tabela 3- Frequência e percentual de amostras coletadas por swab orofaríngeo e retal e amostras positivas para SARS-CoV-2 por RT-qPCR, em cães e gatos, recolhida em Belo Horizonte Minas Gerais no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.

Espécie	Amostras examinadas		Amostras positivas	
	n	%	n	%
Cães	48	55,8	7	14,6
Gatos	38	44,2	1	2,6
Total	86	100	8	9,3

Tabela 4- Resultados das amostras positivas para SARS-CoV-2 em cães analisadas nos Laboratórios TECSA e no Laboratório de Biologia Integrativa do ICB.

Animal	Sexo/idade	Amostras positivas	Ct valor	Data
BHC06	Macho/2 anos	swab orofaríngeo	N1: 33 N2: 31	janeiro/2021
BHC09	Macho/16 anos	swab orofaríngeo	N1: 35 N2: 34	fevereiro/2021
BHC15	Fêmea/15anos	swab orofaríngeo	N1: 32 N2: 33	julho/2021
BHC22	Fêmea/2 anos	swab retal	N1:35 N2:35	janeiro/2022
BHC 41	Macho/7 anos	swab orofaríngeo	N1: 35 N2: 36	junho/2022
		swab retal	N1: 37 N2: 38	
BHC 42	Fêmea/7 anos	swab orifaríngeo	N1:37 N2:37	julho/2022
		swab retal	N1: 37 N2: 38	
BHC 46	Fêmea/7 anos	swab orifaríngeo	N1:38 N2:37	julho/2022
		swab retal	N1: 39 N2: 38	

*CT positivo = < 40

Tabela 5- Resultados das amostras positivas para SARS-CoV-2 em gatos analisadas nos Laboratórios TECSA e no Laboratório de Biologia Integrativa do ICB.

Animal	Sexo/idade	Amostras positivas	Ct valor	Data
BHG 36	Fêmea/8 anos	swab orofaríngeo	N1: 35 N2: 35	junho/2022

Entre as sete amostras positivas de cães, os valores médios de Ct foram 35,8 para o gene alvo nCoV_N1 e 35,7 para o gene alvo nCoV_N2. Um genoma viral foi sequenciado com sucesso para a amostra BHC22. As ferramentas Pangolin e NextClade classificaram o genoma gerado em nosso estudo como a VOC Ômicron BA.1 (EPI_ISL_17700572) (Figura 9).

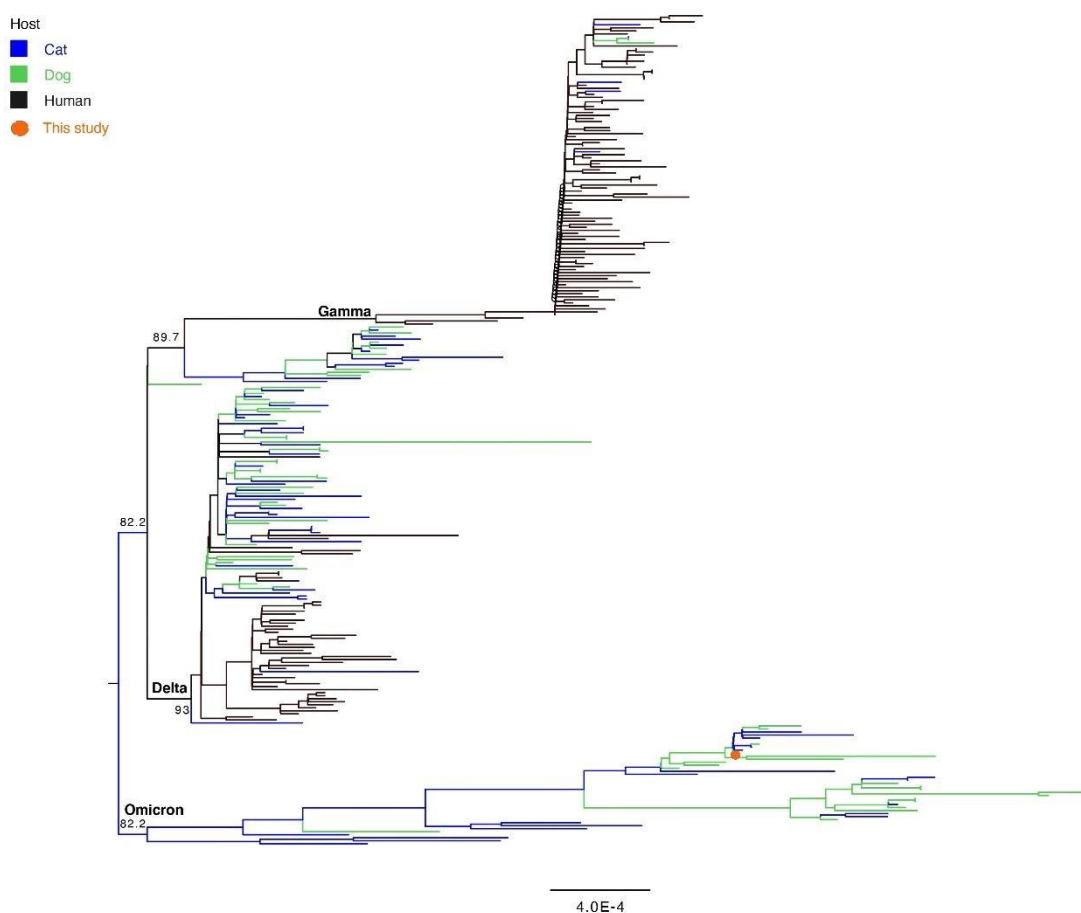


Figura 9. Árvore filogenética de máxima verossimilhança. A árvore gerada apresenta um genoma (BHC22) de SARS-CoV-2 gerado em nosso estudo (círculo laranja) e genomas públicos disponíveis no banco de dados GISAID EpiCoV (n = 267). Cada ramo é preenchido de acordo com o hospedeiro do qual foi isolado. Gatos são representados em azul,

cães em verde e humanos em preto. Valores de bootstrap para os ramos mais importantes são apresentados com a classificação de VOC.

6.1.3. Diagnóstico molecular de hemopatógenos

Como resultado da pesquisa de hemopatógenos em cães e gatos domiciliados em Belo Horizonte, Minas Gerais, no período de janeiro de 2021 a agosto de 2022, a Figura 10A revela os resultados positivos encontrados. O Anexo 7 identifica os animais, detalhando o número de identificação, data de coleta, sexo, idade e positividade molecular para patógenos transmitidos por vetores. Para os cães 45,8% (22/48) dos animais testados foram positivos para pelo menos um dos patógenos, 33,4% (16/48) dos animais testaram positivo para mais de um patógeno estudado neste trabalho. No caso dos gatos 31,6% (12/38) dos animais testados foram positivos para pelo menos um dos patógenos, 18,4% (7/38) dos animais testaram positivo para mais de um patógeno (Figura 10B.). Todas as amostras foram positivas na PCR para GAPDH o que demonstrou que o DNA foi devidamente extraído.

Figura 10A– Representação gráfica das frequências de amostras positivas para hemopatógenos, por método molecular, em cães e gatos domésticos provenientes de Belo Horizonte Minas Gerais no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.

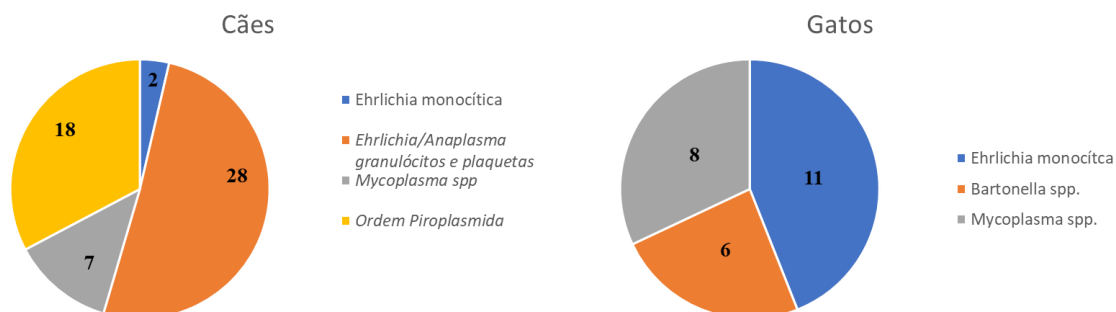
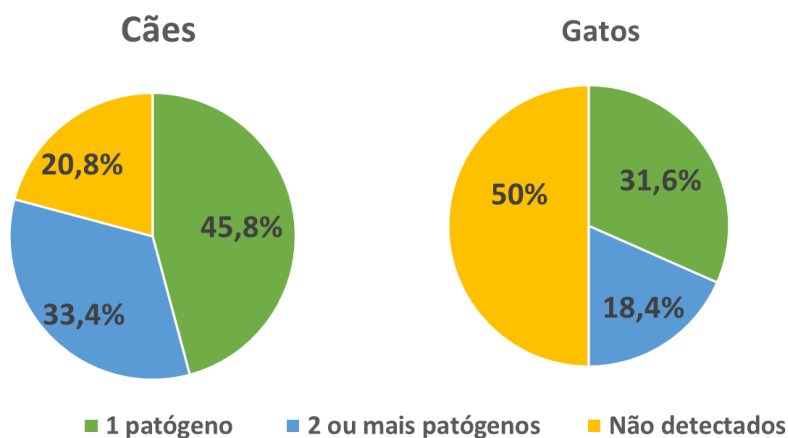


Figura 10B– Representação gráfica do percentual de detecção de um patógeno, dois ou mais patógenos e não detectados em cães e gatos domésticos provenientes de Belo Horizonte Minas Gerais no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.



Para bactérias pertencentes à família Anaplasmataceae, em cães das 48 amostras estudadas, 4,2% (2/48) apresentaram resultado positivo para *Ehrlichia* monocítica (Tabela 6). Já para *Anaplasma/Ehrlichia* de granulócitos e plaquetas, 58,3% (28/48) animais apresentaram resultado positivo, 2,1 % (1/48) para reação específica para a espécie *A. phagocytophilum*, e 12,5 % (6/48) para reação específica para a espécie *A. platys*. Nos gatos, 28,9% (11/38) apresentaram resultado positivo para *Ehrlichia* monocítica (EM), sendo 2,6% (1/38) identificado com *E. canis* (Tabela 6). Já para AEGP nenhum dos animais apresentaram resultado positivo. A Figuras 11 e 12 apresentam alguns dos resultados obtidos na PCR.

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR para *Ehrlichia monocítica*. Linha PPM: Padrão de tamanho molecular de 1Kb (Sinapse inc); Coluna 1: controle positivo *Ehrlichia canis*; Coluna 17: amostra de gatos com formação de banda na altura do fragmento esperado (443 pb); Coluna C-: controle negativo da reação, água livre de nucleasse.

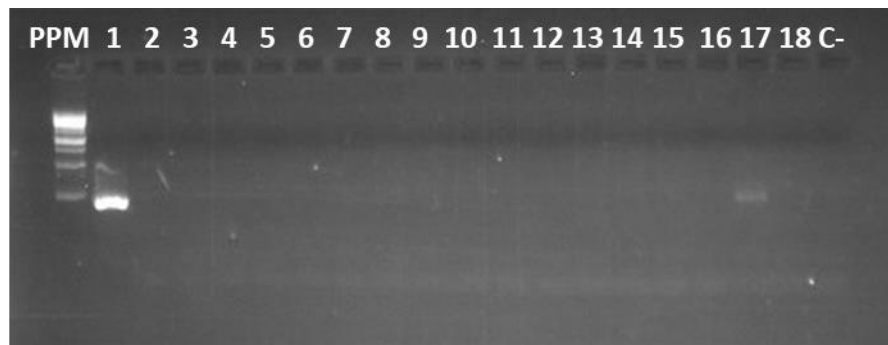
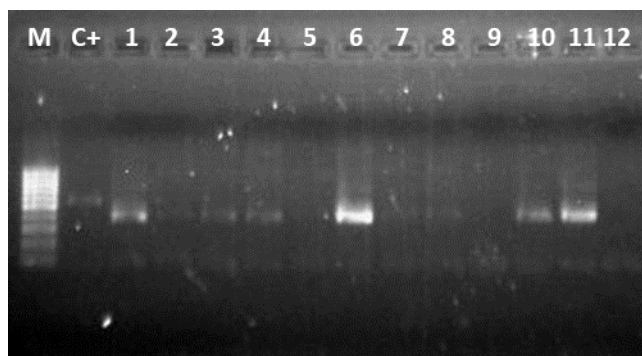


Figura 12- Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR para *Anaplasma/Ehrlichia* granulócitos e plaquetas. Linha M: Padrão de tamanho molecular de 1Kb (Kasvi); Coluna C+: controle positivo *Anaplasma phagocytophilum*; Colunas 2 a 11: amostras de cães domésticos com formação de bandas positivas; Coluna 12: controle negativo da reação, água livre de nucleasse.



A bactéria *Bartonella* spp. foi detectada no 15,8% (6/38) dos gatos (Figura 13). Em relação aos micoplasmas hemotrópicos, foi feita uma PCR alvo para o gênero *Mycoplasma*. O gênero *Mycoplasma* nos cães foi detectado em 14,6% (7/48) das amostras (Figura 14) e nos gatos foi detectado em 21,1% (8/38) sendo que, cinco (13,2%) foram positivos na reação específica para ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (CMhm), três (7,9%) para a espécie *Mycoplasma haemofelis* (Mhf) e nenhum para ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ (CMt) (Tabela 6).

Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose 3% dos produtos amplificados por PCR para *Mycoplasma* spp. Linha 1: Padrão de tamanho molecular de 100pb (Cellco); Coluna C+: controle positivo *Bartonella clarridgeiae* (146 pb); Colunas 1 a 3: amostras com formação de banda na altura do fragmento esperado (146 a 251pb); Coluna 4: amostra de gato doméstico; Coluna C-: controle negativo da reação, água livre de nucleasse.

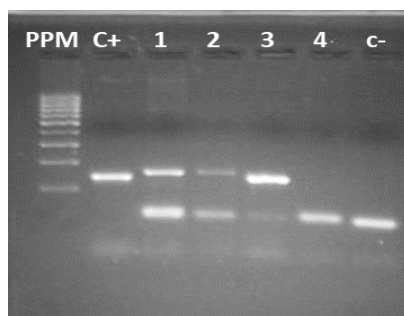
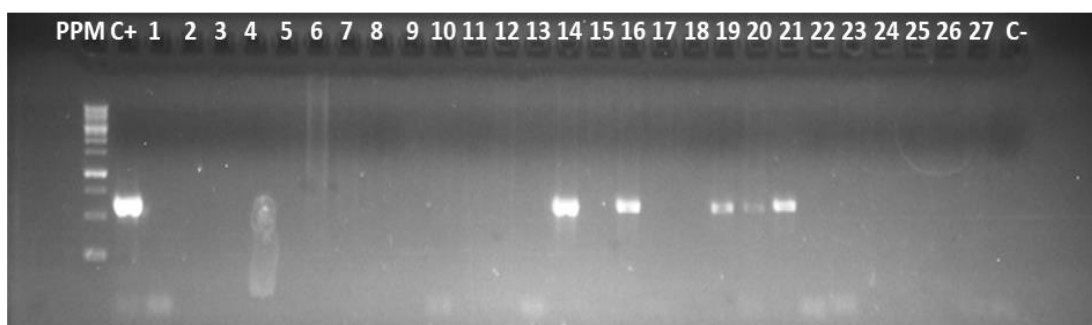
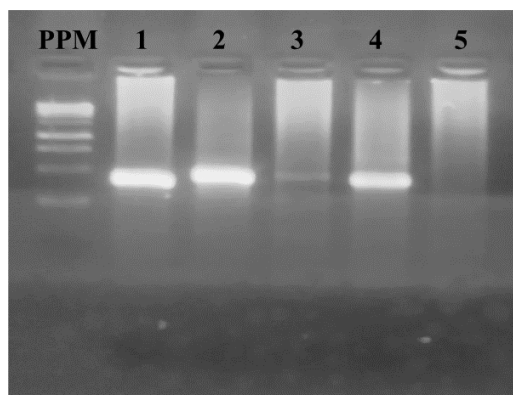


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados por PCR para *Mycoplasma* spp. Linha 1: Padrão de tamanho molecular de 1Kb (Kasvi); Coluna C+: controle positivo *Mycoplasma* spp; Colunas 1 a 27: amostras de cães domésticos; Colunas 14,16,19,20 e 21: amostras com formação de banda na altura do fragmento esperado (618pb); Coluna C-: controle negativo da reação, água livre de nucleasse.



Para detecção de piroplasmídeos foi utilizado um iniciador genérico capaz de detectar infecção por espécies de *Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon*. Dos 48 cães testados, 18 (37,5%) animais foram positivos na PCR genérica. Nenhuma das amostras testadas para gatos mostrou positividade para os piroplasmídeos (Tabela 6). A Figura 15 apresenta alguns dos resultados obtidos. Nenhuma das amostras de cães e gatos testou positivo para *Leishmania* spp.

Figura 15- Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por nested PCR para ordem Piroplasmida. PPM: Padrão de tamanho molecular de 1Kb (Kasvi); Coluna 1: controle positivo *Babesia bigemina*; Colunas 2 a 4: amostras de cães domésticos com formação de banda na altura do fragmento esperado (430pb); Colunas: 5: controle negativo da reação, água livre de nuclease.



6.1.4. ELISA para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães e gatos.

Dos 38 gatos que tiveram amostras de soro submetidas aos testes sorológicos para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, 06 foram considerados reagentes pelo ELISA sendo que a soroprevalência encontrada foi de 15,8% (Tabela 6). Para os cães, nenhuma amostra foi considerada reagente para anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

O índice de reatividade (IR) variou de 0,00 a 5,18 sendo que soros que apresentaram $IR < 1,00$ (84,2%) (32/38) foram considerados negativos. Entre os que apresentaram $IR \geq 1,00$ (15,8%), em 50% (3/6) o IR estava entre 2,00 e 2,99; 16,7% (1/6) o IR estava entre 3,00 e 3,99 e 33,3% (2/6) com $IR \geq 4$ (Gráfico 2).

Gráfico 2- Frequência dos índices de reatividade apresentados pelos soros de gatos domésticos soropositivos por ELISA.

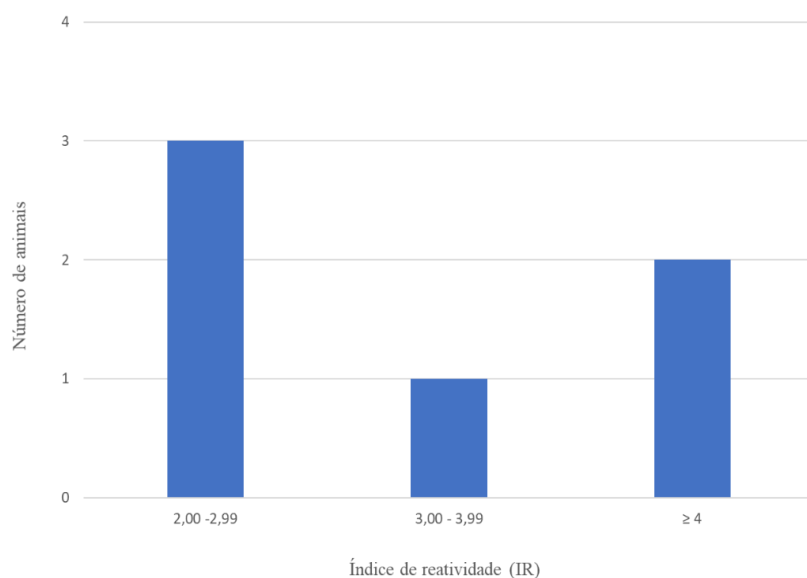


Tabela 6- Frequência de hemopatógenos e *Toxoplasma gondii* detectados em 48 cães e 38 gatos domésticos provenientes de Belo Horizonte Minas Gerais, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.

Hemopatógeno	Número de Cães positivos	%	Número de Gatos positivos	%
<i>Ehrlichia monocítica</i>	2	4,7	11	28,9
<i>Ehrlichia canis</i>	-	-	1	2,6
<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> granulócitos e plaquetas	28	58,3	0	0
<i>Anaplasma platys</i>	6	12,5	-	-
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	1	2,1	-	-
<i>Bartonella</i> spp.	-	-	6	15,8
Micoplasmas hemotrópicos	7	15,6	8	21,1
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	-	-	5	13,2
‘ <i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma</i> <i>haemominutum</i> ’	-	-	3	7,9
Piroplasmas	18	37,5	0	0
<i>Toxoplasma gondii</i>	0	0	6	15,8

-. negativo

6.1.5. Coinfecções e exposição a múltiplos patógenos

6.1.5.1. Coinfecção com SARS-CoV-2

Do total de animais testados, a coinfecção com SARS-CoV-2 e outros patógenos foram detectados em cinco cães (10,4%) e um gato (2,6%). Um cão: um macho coinfectado com *Ehrlichia* monocítica e Piroplasma, um macho coinfectado *Anaplasma/Ehrlichia* de granulócitos e plaquetas e Piroplasma e duas fêmeas coinfectadas com AEGP e Piroplasma e um cão fêmea coinfectada apenas com *Mycoplasma* hemotrópico. O gato era uma fêmea coinfectada com *Bartonella* spp. e *Mycoplasma* spp. hemotrópico (Quadro 4).

Quadro 4 - Resultados da coinfecção com SARS-CoV-2 e outros patógenos detectados cães e gatos domésticos provenientes de Belo Horizonte Minas Gerais no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.

Animal	SARS-CoV 2	<i>E. monocítica</i>	<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> granulócitos e plaquetas	Piroplasma	<i>Bartonella</i> spp.	<i>Mycoplasma</i> spp.
BHC06	+	+	-	+	-	-
BHC09	+	-	+	+	-	+
BHC15	+	-	+	+	-	-
BHC22	+	-	+	+	-	-
BHC46	+	-	-	-	-	+
BHG36	+	-	-	-	+	+

Em relação às coinfecções encontradas, não foram observadas associações significativas entre as variáveis detalhadas na Tabela 7.

Tabela 7- Análise estatística de possíveis associações entre fatores selecionados e a positividade para SARS-CoV-2, além de outros patógenos, em cães e gatos domésticos de Belo Horizonte, Minas Gerais, de janeiro de 2021 a agosto de 2022.

Fator	Cães	Gatos
	Valor P	Valor P
	SARS-CoV-2 positividade	SARS-CoV-2 positividade
Idade	0.326	-
Sexo	0.597	0.500
<i>Ehrlichia</i> monocítica positivo	0.273	0.711
AEGP positivo	0.311	-
<i>A. phagocytophilum</i> positivo	0.864	-
<i>A. platys</i> positivo	0.455	-
<i>Mycoplasma</i> spp. hemotrópico positivo	0.733	0.211
Piroplasma positivo	0.227	-
<i>Toxoplasma gondii</i>		0.842
Hemopatógenos	0.454	0.447
Coinfecções	0.270	0.447

Associações com valor de $P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

AEGP: *Anaplasma*/ *Ehrlichia* sp. granulócitos/plaquetas

6.1.5.2. Coinfecção entre os outros patógenos detectados.

Além disso, foi detectada nos cães a presença de outras coinfecções ou exposições entre os patógenos (Quadro 5). As combinações mais comuns entre dois agentes foram para: AEGP + Piroplasmas (13/16), *E. monocítica* + Piroplasmas (1/16), AEGP + *Mycoplasma* spp. (1/16), combinações detectadas entre três agentes foi para: *E. monocítica* + *A. platys* + *Mycoplasma* spp. (1/16). Com relação aos gatos, foi detectada a presença de outras coinfecções ou exposições incluindo: *E. monocítica* + *T. gondii* (3/7), AEGP + *Mycoplasma* spp. hemotópico (2/7) e *Bartonella* spp. + *Mycoplasma* spp. hemotópico (2/7). Os resultados de positividade associados ao patógeno estão listados no quadro 6.

Quadro 5- Resultados das combinações de infecção e/ou soropositividade detectadas em cães domésticos provenientes de Belo Horizonte, Minas Gerais no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.

Animal	EM	AEGP	<i>A. phagocitophilum</i>	<i>A. platys</i>	<i>Mycoplasma</i> spp	Piroplasmas
BHC02	-	+	-	-	-	+
BHC04	-	-	-	-	-	+
BHC06	+	-	-	-	-	+
BHC08	-	+	+	-	-	+
BHC09	-	+	-	-	-	+
BHC11	-	+	-	+	-	+
BHC12	-	+	-	+	-	+
BHC13	-	+	-	-	-	+
BHC14	-	+	-	-	-	+
BHC15	-	+	-	-	-	+
BHC16	+	+	-	+	+	-
BHC21	-	+	-	-	-	+
BHC22	-	+	-	-	-	+
BHC23	-	+	-	-	+	-
BHC26	-	-	-	-	-	+
BHC27	-	+	-	+	-	+
BHC29	-	-	-	-	-	+
BHC32	-	-	-	-	-	+
BHC33	-	+	-	-	-	+
BHC37	-	+	-	-	-	+

(+): positivo (-): negativo EM: *Ehrlichia* monocítica AEGP: *Anaplasma/Ehrlichia* granulócitos/plaquetas

Quadro 6- Resultados das combinações de infecção e/ou soropositividade detectadas em gatos domésticos provenientes de Belo Horizonte Minas Gerais no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.

Animal	<i>Ehrlichia</i> Monocítica	<i>Bartonella</i> spp.	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M.haemofelis</i>	'<i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma</i> <i>haemominutum</i>'	<i>T. gondii</i>
BHG07	+	-	-	-	-	+
BHG10	+	-	-	-	-	+
BHG11	+	-	-	-	-	+
BHG16	+	-	+	+	+	-
BHG19	+	-	+	+	+	-
BGH21	-	+	+	-	-	-
BGH35	-	+	+	+	+	-

6.1.6. DISCUSSÃO

O presente estudo, parte do Projeto PetCovid, aborda a prevalência de SARS-CoV-2 e hemopatógenos em animais domésticos durante um período crítico da pandemia de COVID-19. Belo Horizonte, uma cidade fortemente afetada pela pandemia e com uma alta taxa de animais domésticos, foi escolhida como cenário de estudo devido ao seu ambiente propício para entender a relação entre o vírus e os patógenos que afetam cães e gatos (Honorato, 2020).

Embora a população de animais domésticos em Belo Horizonte seja grande, nosso estudo obteve amostras de apenas 86 animais, um número relativamente pequeno. Esse limite amostral pode ser atribuído a fatores associados à pandemia e às metodologias de recrutamento. O recrutamento foi realizado principalmente por meio de mídias sociais e contatos pessoais, visando tutores de animais que haviam testado positivo para SARS-CoV-2 até sete dias após a infecção (Calvet *et al.*, 2021; Braga, 2020). As restrições impostas pela pandemia, incluindo o isolamento social e as dificuldades de mobilização de pesquisadores, além da necessidade de medidas rígidas de biossegurança durante as visitas domiciliares, limitaram a eficiência e a rapidez das coletas (Patterson *et al.*, 2020; Meisner *et al.*, 2022). Apesar desses desafios, a amostra obtida fornece informações valiosas sobre a prevalência de SARS-CoV-2 e hemopatógenos em um cenário real durante a pandemia.

O N amostral apresentou uma distribuição equilibrada entre cães (55,8%) e gatos (44,2%), abrangendo uma ampla faixa etária, desde filhotes até animais com mais de 24 meses. Foram coletadas amostras de 22 cães machos e 26 fêmeas, e 19 gatos machos e 19 fêmeas, refletindo a diversidade da população animal em Belo Horizonte (Silva *et al.*, 2010; Honorato, 2020).

A detecção de SARS-CoV-2 em animais domésticos cujos tutores testaram positivo para o vírus já foi amplamente estudada no Brasil, com resultados variados. O estudo de Calvet *et al.* (2021) encontrou que 31% dos cães e 40% dos gatos de domicílios com pacientes com COVID-19 estavam positivos ou soropositivos para SARS-CoV-2. Anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2 foram detectados em 3,4% dos cães e 20% dos gatos, e seis desses animais apresentaram sinais leves e reversíveis da doença. Em contraste, Epifanio *et al.* (2021) encontrou uma baixa prevalência, com apenas 2 de 15 gatos positivos e nenhum cão positivo, em um estudo longitudinal prospectivo realizado na cidade de Recife. Agopian *et al.* (2022) identificou uma prevalência de 15,8% em gatos e 3,3% em cães, evidenciando uma maior suscetibilidade dos gatos e variações

nas cargas virais. A variação na prevalência da positividade entre os estudos pode ser atribuída a diferenças metodológicas na seleção dos animais e nos testes de detecção (Galhardo *et al.*, 2023).

No presente estudo, observou-se positividade em 9,3% (8/86) dos animais avaliados: 14,6% (7/48) dos cães e 2,6% (1/38) dos gatos. Esses resultados corroboram outros estudos sobre a detecção de SARS-CoV-2 em animais de estimação de famílias com COVID-19+, porém contrastam com a expectativa de maior positividade entre os gatos, conforme observado em estudos anteriores (Shi *et al.*, 2020). Estudos experimentais e de infecção natural indicam que os gatos são altamente suscetíveis à infecção, podendo eliminar o vírus em níveis comparáveis aos observados em humanos, o que sugere uma transmissão eficiente de gato para gato por contato direto (EFSA, Nielsen *et al.*, 2023). Acredita-se que a diferença na prevalência entre cães e gatos observada neste estudo pode ser atribuída a vários fatores, como diferenças na exposição ao vírus, comportamento social, práticas de manejo e proximidade física com os tutores (Shi *et al.*, 2020). Cães, devido ao seu comportamento social e à maior interação com humanos (hábitos de contato próximo, como beijar, abraçar e compartilhar a cama), podem ter um risco maior de infecção pelo vírus em comparação aos gatos (Sit *et al.*, 2020; Fritz *et al.*, 2021).

A análise dos swabes revelou que 8,14% (7/86) dos swabes orofaríngeos e 4,7% (4/86) dos swabes retais foram positivos para SARS-CoV-2, indicando que a infecção pode ser detectada em diferentes locais do corpo dos animais (Decaro *et al.*, 2021). A maior prevalência na detecção por meio de swabes orofaríngeos é consistente com outros estudos (Calvet *et al.*, 2021; Epifanio *et al.*, 2021; de Sousa Barbosa *et al.*, 2022), sugerindo que esse método pode ser o mais eficaz para a detecção de SARS-CoV-2 devido à maior quantidade de genoma viral detectada. Além disso, os resultados genômicos revelaram a presença de variantes semelhantes às predominantes em humanos na época, reforçando a evidência científica da transmissão zoonótica (Navarro-Lopez *et al.*, 2022; Botero *et al.*, 2022).

A detecção da variante Ômicron BA.1 em um cão doméstico neste estudo é consistente com os achados de Ramasamy *et al.* (2023), que encontraram anticorpos para variantes do SARS-CoV-2, incluindo pré-Omicron e Omicron, em 12,86% (35/272) dos gatos de Pittsburgh/EUA. Chaiyawong *et al.* (2024) identificaram a variante Ômicron BA.2 em um cão e seu dono na Tailândia, reforçando a evidência de transmissão intradomiciliar. Sánchez-Morales *et al.* (2022) detectaram a variante Ômicron BA.1 em animais domésticos na Espanha, com 10,13% dos cães e gatos positivos para RT-qPCR. Embora nosso estudo não tenha demonstrado a transmissão da

variante Ômicron BA.1 entre humanos e animais, os resultados destacam a importância do sequenciamento de amostras de humanos e animais de estimação para identificar linhagens circulantes de SARS-CoV-2 e minimizar a propagação do vírus em ambientes domésticos.

Cães e gatos são comumente infectados por patógenos transmitidos por vetores e têm um papel fundamental como reservatórios e hospedeiros em seus ciclos de vida. Neste trabalho, a pesquisa de hemopatógenos em cães e gatos domiciliados em Belo Horizonte revelou uma prevalência considerável de infecções em ambos os grupos. Para os cães, 45,8% (22/48) dos animais testados foram positivos para pelo menos um dos patógenos, e 33,4% (16/48) apresentaram coinfeção com mais de um patógeno. Nos gatos, 31,6% (12/38) dos animais testados foram positivos para pelo menos um patógeno, e 15,8% (7/38) testaram positivo para mais de um patógeno. No Brasil, resultados semelhantes foram obtidos em um estudo realizado na Clínica Veterinária-EMVZ/UFT em Araguaína entre maio de 2016 e maio de 2017, onde se analisou 379 laudos de hemoparasitoses. Dos 334 cães examinados, 50% (167) foram positivos para hemopatógenos, incluindo *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia* spp., e *Mycoplasma haemocanis*. Nos 45 gatos, a taxa de positividade foi de 40% (18), com *Anaplasma platys* sendo o hemopatógeno mais frequente (Rodrigues *et al.*, 2021). Outro estudo, abrangendo cães e gatos de três cidades do país, encontrou uma prevalência geral de hemopatógenos de 7,41% (45/607). Em cães, a taxa foi de 6,58% (32/488) e, em gatos, 10,74% (13/119) (Bezerra *et al.*, 2024). Embora essa taxa seja inferior à encontrada em Araguaína e no presente trabalho, os dados indicam que a infecção por hemopatógenos continua a ser uma preocupação significativa.

Para bactérias pertencentes à família Anaplasmataceae, nossos resultados mostraram uma prevalência notável em cães e gatos domiciliados em Belo Horizonte. Entre os cães, 4,2% (2/48) apresentaram resultado positivo para *Ehrlichia* monocítica. Este resultado é semelhante ao 1,7% (5/300) descrito por Dantas-Torres *et al.* (2018) para *Ehrlichia* spp. em cães no Nordeste do Brasil, e maior que o encontrado por Martin *et al.* (2019), que em um *screening* por PCR para *Ehrlichia* spp. em 20 cães clinicamente saudáveis, não encontrou nenhum caso positivo. Malheiros *et al.* (2016) também não encontraram nenhuma amostra positiva para os genes *dsb* e *16S rRNA* de *Ehrlichia* spp. em cães no sul do Brasil. A prevalência da infecção por *E. canis* em cães varia conforme vários fatores, mas está geralmente associada ao nível de exposição a carrapatos infectados, o que explicaria as diferenças observadas nos estudos (Dantas-Torres *et al.*, 2018).

Em contraste, nos gatos, 28,9% (11/38) apresentaram resultado positivo para *Ehrlichia* monocítica, resultado que está em concordância com a literatura existente, que também relata a presença de *Ehrlichia* spp. em gatos. Guimarães *et al.* (2019) encontraram 26,4% (57/216) dos gatos soropositivos para *Ehrlichia* spp. pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). No entanto, apenas 1,4% dos gatos testados foram positivos para o gene 16S rRNA de *Ehrlichia* spp. por nPCR, sugerindo uma baixa taxa de detecção molecular em comparação com os resultados sorológicos. Por outro lado, Braga *et al.* (2021) detectaram anticorpos específicos de *E. canis* em 32,9% (25/76) dos gatos analisados, utilizando ELISA com peptídeos específicos de *E. canis*, como TRP19 e TRP36. A reatividade a diferentes peptídeos sugere a presença de múltiplos genótipos de *E. canis*, incluindo a possibilidade de novos genótipos infectando felinos, como indicado pela reatividade a TRP19 sem correspondência com TRP36.

Além disso, 58,3% (28/48) dos cães testaram positivo para AEGP, com 12,5% (6/48) para *A. platys* e 2,1% (1/48) positivos para *A. phagocytophilum*. Esses resultados foram inferiores aos encontrados em estudos similares realizados em Rondônia, onde 28,2% (13/46) dos cães foram positivos para *A. platys* (Brum, Teixeira, 2022). No Sudeste do Brasil, Ramos *et al.* (2010) reportaram uma prevalência de 48,78% (28/199) para o mesmo hemopatógeno, indicando uma variação considerável na prevalência entre diferentes regiões do país.

A prevalência de *A. phagocytophilum* encontrada neste estudo em cães, embora considerada baixa, confirma a circulação do parasito em Belo Horizonte. No Brasil, a presença de *A. phagocytophilum* já foi documentada em carrapatos das espécies *Amblyomma cajennense* e *Rhipicephalus sanguineus*, coletados de cães domésticos (Santos *et al.*, 2013). Silveira *et al.* (2015) relataram um caso de coinfecção por *A. phagocytophilum* e *Ehrlichia canis* em um cão com histórico recente de parasitismo por *R. sanguineus* sensu lato em Belo Horizonte, uma região endêmica para essa espécie de carrapato. Estudos adicionais também identificaram a presença molecular de *A. phagocytophilum* em cães da mesma localidade (Silveira *et al.*, 2017). Nos gatos deste estudo, nenhum animal testou positivo para AEGP, o que difere dos resultados observados em estudos anteriores, onde foi encontrada a presença de *A. platys* (André *et al.*, 2022; Guimarães *et al.*, 2019; Ferraz *et al.*, 2023).

A baixa prevalência observada no estudo pode ser explicada por uma combinação de fatores, incluindo limitações nos métodos de detecção, métodos menos sensíveis podem resultar em subestimação da prevalência real da infecção (Silveira *et al.*, 2017). Estudos futuros com

técnicas de diagnóstico mais sensíveis são essenciais para esclarecer a real situação epidemiológica da Anaplasmoose Granulocítica Canina em Belo Horizonte.

Bartonella spp. está distribuída globalmente, sendo mais frequente em regiões com climas quentes e úmidos, que favorecem o desenvolvimento dos vetores (Sepúlveda-García *et al.*, 2022). Neste estudo, a taxa de prevalência de *Bartonella* spp. em gatos domésticos foi de 15,8% (6/38), semelhante ao relatado em outras regiões sul-americanas, como no Paraguai (20,8%), Chile (18%), Argentina (17,5%) e outras áreas do Brasil (17%) (Staggemeier *et al.*, 2010, Razgūnaitė, *et al.*, 2021, Sepúlveda-García *et al.*, 2023). Por outro lado, menor prevalência de *Bartonella* é relatada em gatos da China (3,94% a 8,5%), Grécia (8,5%) , Japão (4,6%) e Tailândia (2,53%), enquanto maior prevalência é relatada em gatos da Itália (83,5%) (Pennisi *et al.*, 2010). A discrepância na prevalência de *Bartonella* relatada em vários estudos pode ser explicada principalmente pela variação climática mencionada acima e pelas características da população de gatos estudada (gatos errantes, gatos com tutores, gatos de abrigos), com base em relatos de maior prevalência de *Bartonella* spp. em gatos errantes do que em gatos com tutores (Sepúlveda-García *et al.*, 2023).

Diversas espécies de *Mycoplasma* foram descritas como infectantes de animais domésticos e selvagens em todo o mundo. Três espécies são reconhecidas por afetar gatos: *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis*. Já para os cães, as espécies conhecidas são *Mycoplasma haemocanis* e *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* (Mesquita *et al.*, 2021). Neste estudo, hemoplasmas foram detectados em 14,6% dos cães (*Mycoplasma* spp.) e 21,1% dos gatos, sendo 13,2% positivos para 'C. M. haemominutum' e 7,9% para *M. haemofelis*. A prevalência observada é maior do que a relatada no Catar, onde os índices foram de 7,8% para *Mycoplasma* spp. em cães, além de 2,9% para *M. haemofelis*, 2,9% para 'C. M. haemominutum', e 5,9% para *Mycoplasma* spp. em gatos (Alho *et al.*, 2017). No entanto, os índices de prevalência de hemoplasmoose em Belo Horizonte são semelhantes aos registrados na Arábia Saudita, onde 15,7% dos cães foram positivos para *M. haemocanis* e 27,2% dos gatos foram positivos para *M. haemofelis* (13,6%) e 'C. M. haemominutum' (13,6%) (Alanazi *et al.*, 2020). No Brasil, vários estudos relatam a presença de micoplasmas hemotrópicos em cães e gatos, com uma variada prevalência. (Barbosa *et al.*, 2021; Santos *et al.* 2021; dos Santos Petry *et al.*, 2020; Bahiense *et al.*, 2020).

Três gatos (7,8%) apresentaram coinfeção entre CMhm e Mhf. De forma similar, Braga *et al.* (2012) encontraram 2,5% (5/200) dos gatos do município de São Luís, MA, coinfectados por essas espécies. A coinfeção entre mais de uma espécie de micoplasma pode ocorrer devido à falta de imunidade cruzada entre elas. Trabalhos de infecção experimental demonstraram que a infecção mista por CMhm e Mhf, leva gatos a desenvolverem uma doença clínica mais significativa do que a infecção por apenas uma das espécies. Além disso, já foi relatado que a coinfeção com os vírus da imunodeficiência felina (FIV) ou vírus da leucemia felina (FeLV) pode agravar os sinais clínicos (Westfall *et al.*, 2001; George *et al.*, 2002; Hicks *et al.*, 2015).

Considerado que *Mycoplasma* spp. hemotrópico, incluindo *M. haemofelis*, pode infectar humanos (dos Santos *et al.*, 2008), é essencial adotar medidas para controlar a população de artrópodes, que são considerados os principais vetores dos hemoplasmas. Assim, o controle rigoroso de pulgas e carrapatos em cães e gatos é altamente recomendado para reduzir o risco de transmissão dessas infecções tanto para os animais quanto para os seres humanos (Alanazi *et al.*, 2020).

Neste estudo, a detecção de piroplasmídeos em cães e gatos domiciliados em Belo Horizonte revelou uma prevalência significativa de infecção em cães, enquanto nenhuma infecção foi detectada em gatos. Utilizando um *primer* genérico para detectar espécies de *Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon*, 37,5% (18/48) dos cães testados apresentaram resultados positivos. Em contraste, todas as amostras de gatos testadas foram negativas para piroplasmídeos. Resultados similares foram encontrados por Alanazi *et al.* (2021), que relataram 30% dos cães positivos para *Babesia vogeli*, mas nenhum dos gatos testados no estudo foi positivo para piroplasmídeos.

Estudos realizados no Brasil também mostraram variação nas prevalências de piroplasmídeos. Em Brasília, de Oliveira *et al.* (2023) encontraram uma prevalência de piroplasmídeos de 11,2% em cães, com 9,7% das sequências identificadas como *B. vogeli* e 1,44% como *Piroplasma* sp. não identificado. Em relação aos gatos, a prevalência geral de piroplasmídeos foi de 21,7%, sendo 7,2% de *Cytauxzoon* spp. e 11,4% de *B. vogeli*. Nenhuma amostra positiva para *Theileria* spp. foi detectada, tanto em cães quanto em gatos, assim como para *Rangelia vitalii* (de Oliveira *et al.*, 2022). Malheiros *et al.* (2016) detectaram anticorpos contra *B. vogeli* em 91% dos cães testados na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Após sequenciamento, encontraram *R. vitalii* em 7,5% e *B. vogeli* em 4% dos cães. Em gatos, *B. vogeli* foi detectada em 7% (2/30) dos animais testados.

A presença de carrapatos vetores, principalmente *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, pode ter contribuído significativamente à alta prevalência de piroplasmídeos em cães domiciliados em Belo Horizonte. Esses carrapatos são conhecidos vetores de *Babesia* spp. em cães e são comuns em regiões urbanas (Bastos *et al.*, 2004; Krawczak *et al.*, 2015) e rurais (Costa-Júnior *et al.*, 2009) do Brasil, contribuindo para o cenário endêmico.

No que diz respeito aos gatos, a ausência de positividade para piroplasmídeos está alinhada com a literatura, que geralmente relata uma baixa incidência de infecções por *Babesia* e *Cytauxzoon* em felinos domésticos. Isso pode ser explicado pela menor exposição dos gatos aos vetores desses parasitos e pelos seus hábitos de limpeza. Um estudo realizado por Pedrassani *et al.* (2019) no estado de Santa Catarina detectou a infecção por *Cytauxzoon* spp. em apenas um gato. Palmer *et al.* (2022) detectaram piroplasmas em 2,7% (7/250) dos gatos estudados.

A ausência de resultados positivos para *Leishmania* spp. tanto em cães quanto em gatos domésticos pode ser atribuída à menor sensibilidade da PCR quando realizada a partir de DNA extraído de sangue total. Esse tipo de amostra é conhecido por apresentar uma carga parasitária relativamente baixa, o que pode reduzir a probabilidade de detecção do patógeno (Garay *et al.*, 2022). Estudos anteriores indicam que amostras de tecidos, como linfonodos, pele ou medula óssea, tendem a proporcionar uma maior sensibilidade para a detecção de *Leishmania* spp. por PCR (Silveira *et al.*, 2018). Portanto, a negatividade observada não exclui a possibilidade de infecção, mas ressalta a importância de considerar amostras alternativas para melhorar a precisão diagnóstica em estudos futuros.

Toxoplasma gondii é um parasito zoonótico altamente prevalente no Brasil, capaz de infectar mamíferos e aves. O aumento das populações urbanas de animais de estimação e o estreitamento da relação entre humanos e animais podem facilitar a transmissão de zoonoses de importância para a saúde pública, como a toxoplasmose (Arruda, *et al.*, 2021). A soroprevalência de *T. gondii* em gatos encontrada neste estudo foi de 15,8% (6/38), conforme detectado pelos testes sorológicos para anticorpos IgG anti-*T. gondii* utilizando ELISA. Em contraste, nenhuma amostra de soro dos cães testados foi considerada reagente para anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Este resultado difere do encontrado por Arruda *et al.* (2021), que examinaram amostras de soro de 400 cães e 272 gatos domiciliados em áreas urbanas do Brasil, utilizando o teste de imunofluorescência indireta para detectar anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Eles encontraram que 34% dos cães e 8,1% dos gatos tinham anticorpos anti-*T. gondii*. Marques *et al.* (2019) também observaram resultados diferentes

ao coletar e submeter 338 amostras de sangue (211 de cães e 127 de gatos) à técnica de hemaglutinação indireta para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii*. Os resultados mostraram que 71,89% (243/338) dos animais eram soropositivos, sendo 69,19% (146/211) dos cães e 76,38% (97/127) dos gatos. A diferença nos resultados pode ser atribuída às diferentes técnicas de detecção utilizadas nos estudos, às variações regionais e aos hábitos dos animais, além da baixa prevalência sorológica de *T. gondii*, que pode estar relacionada à queda de anticorpos e à limitada sensibilidade do teste.

Altas frequências de anticorpos anti-*T. gondii* foram observadas em cães e gatos domésticos em diversos países, como Cuba, México, Panamá, Irã, Argentina, Portugal, Austrália, Colômbia e Chile (Dubey *et al.*, 2006; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2014; Brennan *et al.*, 2020; Enriquez *et al.*, 2019, López *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2017; Neves *et al.*, 2020, Rengifo-Herrera *et al.*, 2017, Troncoso *et al.*, 2015, Zarra-Nezhad *et al.*, 2017). No Brasil, a prevalência de infecção por *T. gondii* em animais de estimação pode variar de 9 a 70% em cães e de 0 a 71% em gatos. A soropositividade para *T. gondii* em animais de estimação pode variar não apenas entre países, mas também entre regiões de um mesmo país e áreas de uma mesma cidade. Em geral, animais domiciliados ou sob cuidados de tutores apresentam uma menor frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em comparação com populações errantes ou de abrigos (Arruda *et al.*, 2021).

A presença de coinfeções em cães e gatos destaca a complexidade das infecções em animais de companhia e a necessidade de uma abordagem abrangente para o diagnóstico e tratamento. A coinfeção com SARS-CoV-2 e outros patógenos pode complicar o quadro clínico das doenças, potencialmente exacerbando os sinais clínicos e dificultando o tratamento (Nomah *et al.*, 2022, Fan *et al.*, 2023). Ainda são escassos os estudos que têm relacionado a coinfeção de SARS-CoV-2 com agentes parasitários. Villanueva-Saz *et al.* (2022) encontraram coinfeção de três gatos de rua ao SARS-CoV-2 na Espanha e a presença de infecções associadas a outros patógenos, como *T. gondii*, *L. infantum* e FIV. Resultados semelhantes foram encontrados por Castillo *et al.* (2024), os quais observaram coinfeção três gatos de rua ao SARS-CoV-2 no Brasil e a presença de infecções associadas a outros patógenos, como *Bartonella* spp. e FeLV.

Neste estudo, a coinfeção com SARS-CoV-2 e outros patógenos foi detectada em cinco cães (10,4%) e um gato (2,6%). Os patógenos associados incluíam *Ehrlichia* monocítica, AEGP, micoplasmas hemotrópicos e piroplasmas. A infecção por *Ehrlichia* pode causar febre, fraqueza e, em casos graves, disfunção de múltiplos órgãos (Silveira *et al.*, 2015). A piroplasmose, causada

por *Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon* (nos gatos), afeta os glóbulos vermelhos, levando a anemia e outras complicações (de Oliveira *et al.*, 2022). micoplasmas hemotrópicos, tanto em cães quanto em gatos, podem provocar anemia e distúrbios hematológicos (Santos *et al.*, 2021). A presença simultânea de SARS-CoV-2 e esses patógenos pode resultar em uma sobreposição de sintomas, dificultando o diagnóstico diferencial e agravando as condições, especialmente em animais imunocomprometidos ou com outras condições subjacentes (Villanueva-Saz *et al.*, 2022 *et al.*, 2022).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na infecção por SARS-CoV-2 em relação à coinfeção com outros patógenos detectados no estudo. É importante ressaltar que o número de animais positivos foi pequeno, o que limitou a capacidade de realizar análises estatísticas mais robustas. No entanto, Huang *et al.* (2022) identificaram, em furões, uma diferença estatisticamente significativa entre a infecção por SARS-CoV-2 e o vírus da influenza A. Os autores encontraram evidências de que a coinfeção por esses vírus pode ocorrer e que a presença de um vírus pode influenciar a patogênese do outro. Além disso, a coinfeção pode resultar em consequências clínicas mais graves. A diferença entre os resultados pode ser atribuída a vários fatores, incluindo diferenças nas espécies estudadas, condições experimentais e metodológicas.

Além das coinfeções com SARS-CoV-2, foram detectadas outras coinfeções ou exposições entre os patógenos nos cães e gatos analisados. Nos cães, as combinações mais comuns entre dois agentes foram AEGP junto com piroplasmas, presentes em 27,1% dos cães coinfectados. Em 2,1% dos cães, foi detectada uma combinação de três agentes: *E. monocítica*, *A. platys* e *Mycoplasma* spp. hemotrópico. Nos gatos, foram observadas coinfeções ou exposições, incluindo combinações como *E. monocítica* e *T. gondii* em 7,9% dos gatos coinfectados e AEGP junto com *Mycoplasma* spp. hemotrópicos no 5,3% dos gatos coinfectados.

Assim como relatado neste trabalho, outros estudos reportaram a existência de coinfeção entre diferentes agentes transmitidos por vetores em cães e gatos. Alanazi *et al.* (2021) na Arábia Saudita encontraram coinfeção com *A. platys* e *B. vogeli* em 17 cães (24,28%), enquanto coinfeções não foram detectadas em gatos. Alho *et al.* (2017) no Qatar relataram um cão coinfectado com *B. vogeli* e *E. canis*, mas nenhuma coinfeção foi detectada em gatos. Luong *et al.* (2023) na Tailândia encontraram um cão (1,1%) coinfectado com *Ehrlichia* e *Anaplasma*, sem gatos coinfectados. Gonçalves *et al.* (2014) relataram infecções múltiplas por *E. canis*, *H. canis* e *L. infantum* em cães no Rio Grande do Norte. Melo *et al.* (2023) detectaram um gato (0,84%;

1/119) coinfectado com *E. canis* e *B. henselae* em um estudo sobre patógenos transmitidos por vetores em gatos domiciliados testados para FIV e FeLV, além de observar coinfeções por patógenos transmitidos por vetores e vírus.

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser reconhecidas. A ausência de dados longitudinais sobre a saúde dos animais infectados com SARS-CoV-2 e hemopatógenos impede uma análise detalhada da progressão clínica e da gravidade das coinfeções. Futuras pesquisas devem se concentrar em amostras maiores e em estudos longitudinais para avaliar o impacto clínico das coinfeções. Estudos adicionais sobre a resposta imune em cães e gatos coinfectados podem fornecer *insights* valiosos sobre a patogênese dessas infecções múltiplas. Além disso, a investigação contínua sobre o papel dos animais domésticos na epidemiologia de SARS-CoV-2 é crucial para formular estratégias de mitigação efetivas.

7. RESULTADOS: CAPÍTULO 2

7.1. Resultados dos animais oriundos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti em Belo Horizonte

Este epígrafe está organizado em 1 produto da tese em forma de artigo intitulado “Evidências de infecção por SARS-CoV-2 e co-infecções em gatos de rua no Brasil” e buscou investigar possíveis infecções causadas por SARS-CoV-2, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma* spp., *Bartonella* spp., vírus da leucemia felina (FeLV) e vírus da imunodeficiência felina (FIV) em gatos de rua de um parque urbano no Brasil durante a pandemia de COVID-19.

Além disso, outros resultados e discussão que não constam no artigo publicado foram também apresentados

7.1.1. Artigo original publicado no periódico *Acta Tropica* sob DOI:
10.1016/j.actatropica.2023.107056.

Acta Tropica 249 (2024) 107056



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



Evidence of SARS-CoV-2 infection and co-infections in stray cats in Brazil

Anisleidy Pérez Castillo^{a,g}, Joao Victor Oliveira Miranda^b, Paula Luize Camargos Fonseca^b, Soraia de Oliveira Silva^a, Rosálda Estevam Nazar Lopes^a, Viviane Campos Spanhol^e, Rennan Garcias Moreira^d, Rafael Romero Nicolino^f, Daniel Costa Queiroz^b, Luiza Campos Guerra de Araújo e Santos^b, Anna Pio Soares dos Santos^a, Hugo Adriano Araújo Rivetti^c, Erica S. Martins-Duarte^a, Ricardo Wagner de Almeida Vitor^a, Jenner Karlisson Pimenta dos Reis^e, Renato Santana Aguiar^b, Júlia Angélica Gonçalves da Silveira^{g,*}

^a Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

^b Laboratório de Biologia Integrativa, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

^c Centro de Controle de Zoonoses, Prefeitura de Belo Horizonte, R. Édna Quintel, 173 - São Bernardo, Belo Horizonte, MG 31270-705, Brazil

^d Centro de Laboratórios Multiusuários, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

^e Laboratório de Retrovírus, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^f Departamento de Epidemiologia e Defesa Sanitária Animal, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

^g Laboratório de PROTOVET, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Coronavirus
Hemopathogens
Retroviruses
PCR
Sequencing
Molecular diagnostic

ABSTRACT

The zoonotic virus SARS-CoV-2, which causes severe acute respiratory syndrome in humans (COVID-19), has been identified in cats. Notably, most positive cases were in cats that had close contact with infected humans, suggesting a role for humans in animal transmission routes. Previous studies have suggested that animals with immune depletion are more susceptible to SARS-CoV-2 infection. To date, there is limited evidence of SARS-CoV-2 infections in stray and free-range cats affected by other pathogens. In this study, we investigated infections caused by SARS-CoV-2, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma* spp., *Bartonella* spp., *Feline leukemia virus* (FeLV), and *Feline immunodeficiency virus* (FIV) in stray cats from an urban park in Brazil during the COVID-19 pandemic. From February to September 2021, 78 mixed-breed cats were tested for SARS-CoV-2 and hemopathogens using molecular analysis at Américo Renné Giannetti Municipal Park, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect IgG in *T. gondii*. None of the animals in this study showed any clinical signs of infections. The SARS-CoV-2 virus RNA was detected in 7.7 % of cats, and a whole virus genome sequence analysis revealed the SARS-CoV-2 Delta lineage (B.1.617.2). Phylogenetic analysis showed that SARS-CoV-2 isolated from cats was grouped into the sublineage AY.99.2, which matches the epidemiological scenario of COVID-19 in the urban area of our study. *Leishmania infantum* was detected and sequenced in 9 % of cats. The seroprevalence of *T. gondii* was 23.1 %. Hemotropic *Mycoplasma* spp. was detected in 7.7 % of the cats, with *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* being the most common. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* were detected in 38.5 % of the cats, FeLV was detected in 17.9 %, and none of the cats studied tested positive for FIV. This study reports, for the first time, the SARS-CoV-2 infection with whole-genome sequencing in stray cats in southeastern Brazil and co-infection with other pathogens, including *Bartonella* spp. and *Feline leukemia virus*. Our study observed no correlation between SARS-CoV-2 and the other detected pathogens. Our results emphasize the importance of monitoring SARS-CoV-2 in stray cats

* Corresponding author.

E-mail address: jags@ufmg.br (J.A.G. da Silveira).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.107056>

Received 23 July 2023; Received in revised form 20 October 2023; Accepted 29 October 2023

Available online 30 October 2023

0011-706X/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

to characterize their epidemiological role in SARS-CoV-2 infection and reinforce the importance of zoonotic disease surveillance.

1. Introduction

Coronaviruses (CoVs) are a large family of viruses that cause diseases in various hosts, including humans and animals (Sharun et al., 2021). Coronaviruses that infect animals rarely reach humans. However, this is likely what happened with the severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2), first detected in humans in December 2019 in China (CSG, 2020; Zhu et al., 2020).

Globally, more than 767 million cases of COVID-19 have been reported in humans, resulting in more than 6.9 million deaths and widespread community transmission (WHO, 2023). COVID-19 was detected later in South America than in other regions and yet this region was one of the most affected, possibly because the conditions of urban spaces in South America are fragile owing to problems, such as deficits in public transport and health services. Particularly, Brazil has the highest number of infections by the new coronavirus in Latin America (Sott et al., 2022).

The emergence and spread of different genetic lineages of SARS-CoV-2 has been reported worldwide since the onset of the COVID-19 pandemic. The first major variant of SARS-CoV-2 detected outside China was designated alpha (B.1.1.7) and was responsible for an outbreak in the United Kingdom (Volz et al., 2021). This was followed by lineages Beta (B.1.351) in South Africa (Tegally et al., 2021b), Gamma in Brazil (Faria et al., 2021; Naveca et al., 2021a), Delta (B.1.617.2) in India (Cherian et al., 2021), and Omicron, which was also identified in South Africa (Viana et al., 2022) and other countries, including those with no travel history (Aleem et al., 2022). These lineages are considered variants of concern (VOCs) because they demonstrate characteristics that raise relevant concerns, such as greater transmissibility, disease severity, ability to escape from previously acquired immunity, and reduced effectiveness of control measures, such as vaccines and treatments (CDC, 2023).

During the pandemic, several cases of transmission of SARS-CoV-2 from humans to animals (inverse zoonosis) were reported, including to cats (Jairak et al., 2022; Rabalski et al., 2021; Sharun et al., 2021; Miró et al., 2021). Experimental infections have shown that SARS-CoV-2 persists in cats and is transmissible between these animals by air and direct cat-to-cat contact (Shi et al., 2020; Bosco-Lauth et al., 2020; Halfmann et al., 2020). The high susceptibility of cats to SARS-CoV-2 is likely due to their ACE2 receptor, which contains adequate amino acid residues to allow the efficient binding of SARS-CoV-2 (Kuhlmeier et al., 2022).

Natural infections in cats have been documented since the beginning of the pandemic, and different countries have reported the detection of specific RNA and/or antibodies against SARS-CoV-2 in cats (van Aart et al., 2022; Spada et al., 2021; Villanueva-Saz et al., 2022). Most studies have evaluated pets from COVID-19-positive households (Hamer et al., 2021). Nevertheless, the exposure of stray and free-range cats to the virus has not been extensively investigated.

In Brazil, there are few reports of SARS-CoV-2 infection in domestic and street animals. In Rio de Janeiro (southeast region), Brazil, two stray animals, a cat and a dog, tested positive for SARS-CoV-2 antibodies in a plaque reduction neutralization test, whereas oropharyngeal and rectal swabs of the 96 evaluated animals tested negative for RT-qPCR (Dias et al., 2021). In a study conducted in the northeast region of Brazil, 31 pets from owners positive for COVID-19 were analyzed, and two cats were positive for RT-qPCR (Epifanio et al., 2021). In the southeastern region, three domestic cats (15.8%) and one dog (3.3%) tested positive (Agopian et al., 2022). More recently, in the center-west region, thirty-three dogs (4.3%) and four cats (2.2%) were reported seropositive for SARS-CoV-2 by ELISA, and three dogs (0.4%) and three cats

(1.6%) were reported seropositive by the seroneutralization test (Jarrah et al., 2023). However, to date, few studies have been conducted on stray animals in Brazil, and no viral infection has been described in these animals.

The presence of different pathogens in hosts can lead to complex relationships that affect health, especially if there are pathogens capable of nullifying or regulating the immune response in their hosts, making them more likely to acquire and develop diseases (da Silva et al., 2022). Stray cats with immune depletion due to concurrent infections with hemopathogens are more prone to co-infection with SARS-CoV-2 (Villanueva-Saz et al., 2022). In this study, we investigated SARS-CoV-2 infection and possible co-infection with other pathogens, such as *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, haemotropic *Mycoplasma* spp., *Bartonella* spp., *Feline Leukemia Virus* (FeLV), and *Feline Immunodeficiency Virus* (FIV), in stray cats from an urban park in Brazil during the COVID-19 pandemic in an endemic area for Zoonotic Visceral Leishmaniasis (ZVL).

2. Materials and methods

2.1. Ethical statement

This study was approved by the Ethics Committee for the Use of Experimental Animals of the Federal University of Minas Gerais (protocol numbers 185/2016 and AAD865B). In accordance with the requirements of Law 11,794/2008, a partnership was signed between the Control and Management of Zoonoses of the Municipal Secretariat of Belo Horizonte and the Federal University of Minas Gerais.

2.2. Study area and sampling information

This study was conducted in the Américo Renné Giannetti (PqMARG) municipal park. It is the oldest environmental heritage site in Belo Horizonte, the sixth-most populous municipality in the country. Known as Municipal Park, it is located in the hypercenter, the densest region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (19°55'37" S 43°56'42" W), with an area of 182 thousand m², close to the hospital area, diagnostic laboratories, Medicine school, and State Health Center. The PqMARG currently serves as a refuge for several species of wild, domestic, and synanthropic fauna, making it a very representative ecosystem. This space is home to approximately 65 species of birds and other animals, including possums and tamarins (PBH, 2022). The PqMARG accommodates an estimated population of 390 stray domestic cats, the majority of which have been abandoned, while the others were born within the park. The cats are primarily distributed across eight colonies (Carandaí Gate, the Bandstand, the Administration area, the Orchid Garden, the Afonso Pena Avenue Gate, the Palace of Arts, the Academy, and the Theater) (Carvalho, 2018).

Animal samples were collected between February and September 2021. At PqMARG, seventy-eight stray cats (*Felis catus*) were trapped within a spay, neuter, and release program run locally to control stray feline colonies. The sampling method employed was convenience sampling, restricting our access to animals currently undergoing the neutering process. The animals were categorized into three age groups: kittens (< 6 months), young (> 6 months ≤ 12 months), and adults (≥ 12 months). The main characteristics observed for age estimation were the size and dentition of the animals (Carvalho, 2018) (Table 1). The cats were tested for SARS-CoV-2, *Leishmania* spp., *T. gondii*, hemotropic *Mycoplasma* spp., *Bartonella* spp., FIV, and FeLV. The animals were selected for convenience without a defined breed (SRD) or limitations of age, sex, or good clinical condition. Collections were carried out in a mobile unit inside the park, and each animal was evaluated

Table 1

Number of samples collected from cats according to their collection time, sex, and age range.

Collection time	Number of samples collected	Sex		Age		
		Male	Female	Adult	Young	Kitten
February 2021	8	4	4	7	1	0
March 2021	10	5	5	10	0	0
May 2021	31	14	17	26	1	4
June 2021	15	7	8	15	0	0
July 2021	9	5	4	9	0	0
August 2021	3	1	2	3	0	0
September 2021	2	0	2	2	0	0
Total samples	78	36	42	72	2	4

macroscopically for the presentation of clinical signs of any illness before blood collection. All cats were asymptomatic. Blood samples, oropharyngeal, and rectal swabs were collected from each animal. Whole blood was collected by puncturing the jugular vein and placing it in tubes with or without an anticoagulant (ethylenediaminetetraacetic acid - EDTA). The serum was separated from blood samples by centrifugation and then stored at -20°C . Ear tissue fragments were collected and stored in 70 % alcohol. For the investigation of the SARS-CoV-2 Virus, samples of oropharyngeal and rectal swabs were taken in tubes containing Shield™ DNA/RNA preservative liquid (Zymo Research, USA) and preserved at -80°C until processing.

2.3. Real-time RT-PCR for SARS-CoV-2 and sequencing

RNA was purified from samples collected through oropharyngeal and rectal swabs using a commercially available kit (PureLink™ RNA Mini Kit, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were then tested for SARS-CoV-2 according to the CDC 2019-Novel Coronavirus Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel (N1, N2) and constitutive β -actin gene primers (Table 2) by commercial a kit (iTaQ™ Universal Probes One-Step-BIO-

RAD) according to the manufacturer's instructions. Thermocycling was carried out in a CFX Opus 96 (BIO-RAD, USA) with a hold stage composed of a first step of 10 min at 50°C , followed by a second step of 3 min at 95°C . The PCR stage was composed of a first step of 15 s at 95°C followed by a second step of 30 s at 55°C and a third step of 30 s at 60°C , repeated 45 times. Targets with cycle thresholds (Ct) amplification ≤ 40 were considered detectable. Three controls were included in all runs: the 2019-nCoV_N_positive control (IDT#10006625, USA) as the positive control and two negative controls (nuclease-free water for extraction and PCR mix).

2.3.1. SARS-CoV-2 genome sequencing

Samples that tested positive for SARS-CoV-2 by RT-PCR were subjected to whole-genome sequencing, using a more sensitive procedure for complex samples with Ct values ≥ 30 . Samples that were detectable or suitable for library preparation based on Ct > 30 were prepared for sequencing. Amplified fragments spanning the whole genome of SARS-CoV-2 and DNA libraries were prepared using xGen™ SARS-CoV-2 Amplicon Panel and xGen SARS-CoV-2 S Gene Amplicon Panel (Integrated DNA Technologies, United States), respectively, following the manufacturer's instructions. Sequencing was performed using the MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, United States).

The generated raw data were filtered using Trimmomatic v0.39 (Bolger et al., 2014), which trimmed low-quality bases (Phred score < 30) and removed short reads (< 50 nucleotides), adapters, and primer sequences. Reads were mapped against the SARS-CoV-2 reference genome (accession number: NC_045512.2) using Bowtie2 (Langmead et al., 2019). The mapping files were manipulated using samtools (Li, 2011), whereas the consensus option bcftools (Li, 2011) was used to estimate the consensus genome sequences. The low-coverage sites were masked using bed tools (Quinlan and Hall, 2010). Bases with less than 10x sequencing depth were masked. Sequences with less than 70 % genome coverage breadth were removed from downstream analysis. Consensus sequences were then classified using the NextClade web application v2.8.1 (Aksamentov et al., 2021).

2.3.2. SARS-CoV-2 lineage classification and phylogenetic analysis

The genomes generated in the present study were submitted to the

Table 2

The primers used for detecting pathogens.

Primer	Target gene	Sequence (5'- 3')	Fragment (bp)	Reference
SARS-CoV-2	N1	5'GACCCCAAAATCAGCGAAAT3'	73	Lu et al. 2020
Sample quality control	N2	5'TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG3'	67	Kessler et al.,2099
	β -actin	5'FAMACCCCGCATTACGTTTGGTGGAC3'	127	
		5'TTACAAACATTGGCCGCAAA3'		
		5 GCGCGACATTCCGAAGAA3' 5'FAMACAATTGCCCCAGCGCTTCAG3'		
		5CAACCGTGAGAAGATGACTCAGA3'		
		5'CCCAGAGTCCATGACAATACCA3'		
		5'FAMTCTCTGTACGCTTCTGGCCGACCC3'		
HBTF	16S rRNA	5'ATACGGCCCATATTCCTACG3'	618	Criado-Fornelio et al., 2003
HBTR		5'TGCTCCACCACTGTTC3'		
OH-OK 00CB-r1	16S rRNA	5'CGTGGAACCTAGAGCTTCGCGAGC3'	274	Watanabe et al., 2008
		5'ATGGTATTGCTCCATCAGACTTTTCG3'		
CA-B2f 00CB-r1	16S rRNA	5'ATGCCCTCTGTGGGGATAGCCG3'	202	Watanabe et al.,2008
		5'ATGGTATTGCTCCATCAGACTTTTCG3'		
CMT-F	16S rRNA	5'AGAGGCGAAGGCGAAACT3' 5'CTACAACGCCGAACACAAA3'	138	Peters et al.,2008
CMT-R				
BartF	16S-23S rRNA região intergênica	5'CTCTTTCTTCAGATGATGATCC3'	145-232	Jensen et al. 2000
BartR		5'AACCAACTGAGCTACAAGCCCT3'		
LITSR	ITS1	5-CTGGATCATTTTCCGATG3'	300-350	El Tai et al., 2000
L5.8S		5'TGATACCACTTATCGCACTT3'		
FeLV F	gag	5'ACTAACCAATCCCAACGC3'	450	Victor, R. M. et al. 2020
FeLV R		5'ATGGCTGTCCCACTAGAG3'		
FIV EF	gag	5'AATATGACTGTATCTACTGC3'	329	Hohdatsu et al., 1998
FIV ER		5 TTTTCTTCTAGAGTACTTTCTGG 3'		
FIV IF		5'TATTCAAACAGTAAATGGAG3'		
FIV IR		5'CTGCTGTGTCTTCTGAGIT3'		

Pangolin program for lineage classification. To confirm the lineage classification, we created a reference dataset ($n = 251$) with public genomes available in the GISAID EpiCoV database. This dataset contains the human and cat genomes of the Zeta, Gamma, and Delta lineages. The dataset was aligned with Minimap v, and a maximum likelihood phylogeny was inferred using the program IQ-tree v2.0.3 under the GTR+ $F + I + G4$ model. All genomes were deposited in the GISAID EpiCoV database (Supplementary Material 1).

2.4. DNA extraction and PCR amplification for *Leishmania* spp

Genomic DNA was extracted using a Genomic Qiagen DNA extraction kit according to the manufacturer's recommendations. DNA samples were stored in an ultra-freezer until further use.

Ear skin DNA was used to amplify the intergenic region of DNA from *Leishmania* (Internal Transcribed Spacer 1–ITS1) (El Tai et al., 2000), with the primers LITSR and L5.8S (Table 1). The PCR reactions were performed in a final volume of 25 μ L using Illustra™ PureTaq™ Ready To go™ PCR kit (Amersham Biosciences). Each reaction was composed of 1 ng of the DNA template, 0.4 pmol/ μ L primers, freeze-dried PCR reagents mix beads (dNTPs 200 mM, Tris–HCl (pH 9.0) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, and enzyme TaqDNA polymerase 0.04 U/ μ L), and water. The reactions were run on a Bio-Rad T100 thermal cycler, as previously described by Schönián et al. (2003). DNA from World Health Organization (WHO) reference *Leishmania* strains were used as reaction controls: *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *Leishmania infantum* (MCAN/BR/2002/BH400), and *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), kept in the cryobank of the *Leishmania* Biology Laboratory (ICB/UFGM/Brazil). The products obtained from the PCR reactions were analyzed through electrophoresis on a 5 % polyacrylamide gel.

2.4.1. Restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) – PCR

To identify *Leishmania* spp., the ITS1 amplicon was digested using the restriction enzyme HaeIII (PCR-RFLP). Five microliters of each amplified product were digested with the HaeIII restriction enzyme (Biolabs, Inc., New England) according to the manufacturer's instructions. The digested products were subjected to 5 % polyacrylamide gel electrophoresis to verify the restriction patterns. The restriction patterns obtained were compared with those of WHO reference strains (Schönián et al., 2003).

2.5. Detection of *T. gondii* antibodies by ELISA

Blood samples from seventy-eight cats were collected from the external jugular vein into tubes without the use of anticoagulants. All samples were placed in an icebox. After coagulation, the blood samples were centrifuged at 2269 g for 15 min to obtain serum. Samples were aliquoted and frozen at -20°C until analysis.

Preparation of antigen and indirect ELISA for the detection of anti-*T. gondii* antibodies were performed according to the methods described by Vitor et al. (1999), with some modifications. Antigenic protein concentration was verified using the method described by Lowry et al. (1951). An antigen concentration of 1.0 μ g/100 μ L/well was used. All serum samples were tested in duplicates at a dilution of 1:100. Anti-cat IgG conjugated to peroxidase was used at a dilution of 1:15,000. The cut-off point for ELISA was calculated according to the methods of Andrade et al. (2013) as the mean absorbance of six serum samples from cats that previously tested negative by IFAT and ELISA for *T. gondii* (Sebastiani, 2021) plus three standard deviation values. The mean absorbance of each serum (tested in duplicate) was divided by the cut-off value to determine the reactivity index (RI). Sera with RI values ≥ 1 were considered positive.

2.6. DNA extraction and PCR amplification for hemotropic *Mycoplasma* spp. and *Bartonella* spp

Whole blood DNA was extracted using the “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega, Madison, WI USA) according to the manufacturer's recommendations. After the extraction, the quality and quantity of the samples were estimated using a NanoDrop (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek®). The extracted DNAs were stored at -20°C until detection using PCR amplification. A fragment of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used to verify the quality of the extracts (Birkenheuer et al., 2003).

For the detection of hemotropic *Mycoplasma* spp. (16S rRNA region) (Criado-Fornelio et al., 2003) and *Bartonella* spp. (16S-23S rRNA intergenic region) (Jensen et al., 2000), the primers HBTF, HBTR, BartF, and BartR were used, as described in Table 1. The amplification reactions were conducted under the following conditions: for *Mycoplasma* spp., an initial denaturation step at 94°C for 10 min, followed by 39 cycles (95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 30 s), and a final extension at 72°C for 10 min. For *Bartonella* spp., the conditions were as follows: an initial denaturation step at 95°C for 2 min, followed by 45 cycles (95°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 30 s), and a final extension at 72°C for 5 min. In all PCR assays, the reaction mix in the run contained 5 μ L of GoTaq®Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 0.4 μ L of a solution containing the mixed primers (10 mM), and 3.6 μ L of nuclease-free water. Total extracted DNA (1 μ L) was added to the reaction mixture to obtain a final volume of 10 μ L. DNA obtained from blood samples of naturally infected cats in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (Sebastiani, 2021) was used as a positive DNA control in PCR reactions for hemoplasmas. Ultrapure sterile water was used as a negative control.

PCR amplicons were separated by electrophoresis on 2 % and 3 % agarose gels (40 min, 100 V), stained with GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA), and visualized under ultraviolet light.

2.6.1. Detection of hemotropic *Mycoplasma* species

PCR assays were performed to detect *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*, (Watanabe et al., 2008), and *Candidatus* *Mycoplasma turicensis* (Peters et al., 2008) (16S rRNA region), using the primers OH-OK, 00CB-r1, CA-B2f, and 00CB-r1, CMT-F, and CMT-R, respectively (Table 1), under the following conditions: for *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus* *Mycoplasma haemominutum* an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles (94°C for 45 s, 58°C for 45 s, 72°C for 45 s), and final extension of 72°C for 5 min was used. For *Candidatus* *Mycoplasma turicensis*, the conditions were as follows: an initial denaturation step at 95°C for 2 min, 30 cycles (95°C for 10 min, 58°C for 30 s, 72°C for 30 s) followed by a final extension of 72°C for 5 min. The reaction mix was prepared as described in Section 2.6. The PCR products were separated by electrophoresis on 2 % agarose gel (40 min, 100 V), stained with GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA), and visualized under ultraviolet light.

2.7. Sequencing

Sequencing of *Leishmania* spp. and *Bartonella* spp. was performed by CT Vacinas/ Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) and ACT-Gen using an automatic sequencer (ABI 3730xl DNA Analyzer Applied Biosystems™), POP7 polymer, and BigDye v3.1, using the same oligonucleotide primers used in the assays. For *Bartonella* spp., a nucleotide sequencing attempt was made for only twelve positive samples, which were selected based on the intensity of the band and the unique size of the PCR product resulting from electrophoresis. For sequencing analysis, the raw data in the form of chromatograms generated by the automatic sequencer “Analyzer Applied Biosystems” were aligned, edited, and analyzed using the BioEdit program, v7.0.5.3 (Hall, 1999). The identity of each sequence was confirmed by comparison with sequences available in GenBank using BLAST software (Basic

Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul et al., 1990). After comparing the identities, the analyzed sequences were classified according to the degree of similarity with data already deposited in GenBank. Nucleotide sequences amplified from the parasites present in the DNA were deposited in GenBank.

2.8. Detection of Feline leukemia virus (FeLV) and Feline immunodeficiency virus (FIV)

The retroviral status of all cats was assessed by PCR. For FeLV proviral DNA detection, conventional PCR was performed in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC), according to Victor et al. (2020), to amplify a 450 bp fragment of the viral gag gene. Primers FeLV F and FeLV R were used with the following cycle conditions: 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 59 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, and a final extension of 72 °C for 5 min. The reagents were used at the following concentrations: 5 µL of 5xGreen GoTaq Flexi Buffer (Promega®), 1.0 µL of MgCl₂ (25 mM; Promega®), 1.0 µL of each primer (10 pmol/µL; Invitrogen®), 0.5 µL of dNTPs (10 mM; Promega®), 0.2 µL of GoTaq Polymerase (5 U/µL; Promega®), 14.3 µL of RNase/DNase-free ultrapure water, and 2 µL of DNA sample. DNA extracted from the PBMC of a naturally infected cat positive for FeLV was used as a positive control, and ultrapure water was used as a negative control. PCR products were visualized on a 1.5 % agarose gel stained with ethidium bromide.

For FIV proviral DNA detection in PBMC, a 450 bp fragment of the gag gene was amplified by nested PCR, as previously described by Hohdatsu et al. (1998), with modifications. FIV EF and FIV ER were used as external primers, while FIV IF and FIV IR were used as internal primers under the following amplification conditions: 95 °C for 3 min, 35 cycles of 95 °C for 30 s, 52 °C for 30 s, 72 °C for 40 s, and a final extension at 72 °C for 7 min. For the first reaction, 2 µL of DNA sample was added, whereas 2 µL of PCR product from the first reaction was added to the second reaction. The reaction was performed with the following reagents: 5 µL of 5xGreen GoTaq Flexi Buffer (Promega®), 1.5 µL of MgCl₂ (25 mM; Promega®), 1.3 µL of each primer (10 pmol/µL; Invitrogen®), 0.5 µL of dNTPs (10 mM; Promega®), 0.25 µL of GoTaq Polymerase (5 U/µL; Promega®), and 13.15 µL of RNase/DNase-free ultrapure water. DNA extracted from the PBMCs of a naturally infected cat positive for FIV was used as the positive control, and ultrapure water was used as the negative control. PCR products were visualized on a 1.5 % agarose gel stained with ethidium bromide.

For qualitative determination of FIV antibodies and FeLV antigens, the Combo Vet Fast FIV Ac/FeLV Ag rapid test from Bioclin® was performed according to the manufacturer's instructions.

2.9. Statistical analysis

The data obtained were compiled and analyzed using Excel 2016 software (Microsoft Corporation, WA, USA), and statistical analyses were performed using Stata software (version 16.0; StataCorp LLC, Texas, USA). Pearson's χ^2 test or the likelihood ratio test for data with less than 5 observations in the cells were used to determine possible associations between SARS-CoV-2 positivity and the following variables: gender, age, infection by *Leishmania* spp., hemotropic *Mycoplasma* spp., *Bartonella* spp., FIV, FeLV, and *T. gondii* seropositivity. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

The odds ratio (OR) was calculated using logistic regression models between the variables (SARS-CoV-2 and co-infections). Odds ratios are used to determine whether exposure was a risk factor for a particular outcome.

3. Results

3.1. Sample description

In the cat population studied, 92.3 % (72/78) were adults, 2.6 % (2/78) were young, 5.1 % (4/78) were kittens, 53.8 % (42/78) females and 46.2 % (36/78) males. In general, they were of the No Breed Defined (NBD) type and classified as apparently healthy; that is, no animal in the study showed even one clinical sign of any disease upon general physical examination. Age and sex were not associated with SARS-CoV-2 infection in the cats ($P > 0.05$; data not shown).

3.2. Detection of SARS-CoV-2 infection

Of the seventy-eight cats sampled, the presence of SARS-CoV-2 RNA was detected in six, with a positivity of 7.7 % (Table 3). Oropharyngeal swabs ($n = 78$) were subjected to real-time (RT-PCR), in which 5.1 % ($n = 4$) were positive, while only 3.8 % rectal swabs ($n = 3$) were positive. One animal tested positive for both swabs. At the time of sampling, none of the animals exhibited respiratory symptoms or signs of health problems. Animals that tested positive were sampled at different time points (Table 3).

All positive samples were submitted for sequencing, but only four of them were successfully sequenced (GP21, GP37, GP49, and GP54); with the sequence being detected only in the oropharyngeal swab of cat GP49. The Pangolin and NextClade tools classified the genomes generated in our study as VOC Delta (B.1.617.2.), sublineage AY.99.2, the same VOC circulating in humans at the time of this study. The phylogenetic analysis corroborated the lineage results found in Pangolin and Nextclade tools. Additionally, the genomes generated in the present study clustered with other SARS-CoV-2 genomes obtained from cats and humans (Fig. 1). It is also important to mention that most of the cat genomes investigated here are grouped in the same branch, showing sequence similarities, reinforcing the local transmission of viral strains between animals that cohabit the same park.

3.3. Detection of other infections

A total of 41 % (32/78) of the animals tested positive for at least one of the pathogens, and 29.5 % (23/78) animals had co-infections (Table 4). *Leishmania* spp. was detected in 15.4 % (12/78) of the cats studied, of which *Leishmania infantum* was detected in 91.7 % (11/12) by PCR-RFLP and by sequencing in 58.3 % (7/12), with an identity between 97 %–100 %. The seroprevalence of *T. gondii* was 23.1 % (18/78). Hemotropic *Mycoplasma* spp. was detected in 7.7 % (6/78); the species *Mycoplasma haemofelis* was found in 1.28 % (1/78) and *Candidatus*

Table 3

Summary of results for SARS-CoV-2 and the detected co-infections in cats from the Municipal Park Américo Renné Giannetti (PqMARG).

Animal	Sex/age	Sampling method	Ct values	Date	Co-infection
GP15	Female /Adult	oropharyngeal swab	N1: 34 N2: 36	March/2021	<i>Bartonella</i> spp
GP21	Female /Young	rectal swab	N1: 34 N2: 37	May/2021	-
GP36	Male /Adult	oropharyngeal swab	N1: 33 N2: 38	May/2021	<i>Bartonella</i> spp FeLV
GP37	Female /Adult	oropharyngeal swab	N1:36 N2:38	May/2021	-
GP49	Male /Adult	oropharyngeal swab rectal swab	N1: 36 N2: 38 N1: 35 N2: 37	May/2021	<i>Bartonella</i> spp
GP54	Male /Adult	rectal swab	N1:32 N2:35	June/2021	-

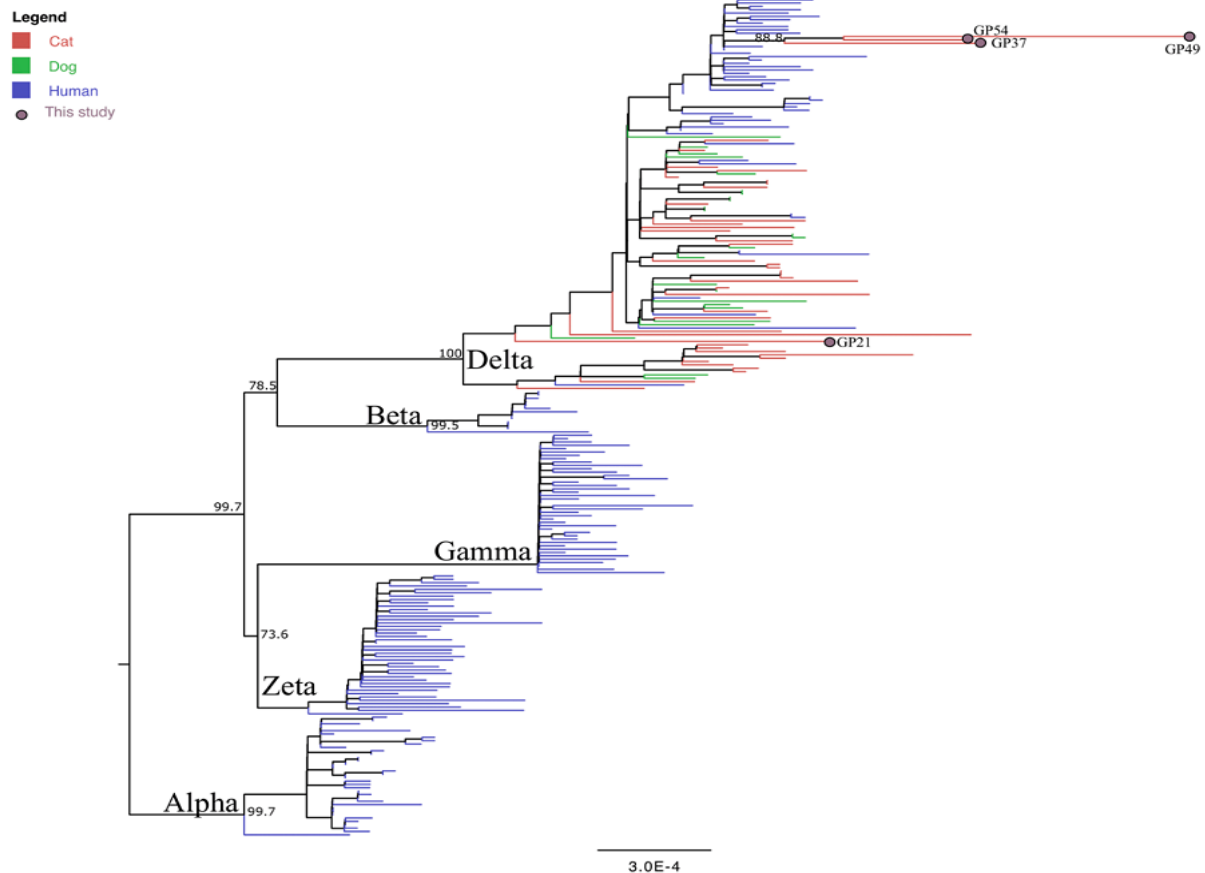


Fig. 1. Maximum likelihood phylogenetic tree. The tree generated presents four SARS-CoV-2 genomes generated in our study (pink circles) and public genomes available at the GISAID EpiCoV database ($n = 197$). Each branch is filled according to the host from which it was isolated. Cats are represented in red, dogs in green, and humans in blue. Black lines indicate host indetermination. Bootstrap values for the most important branches are presented with the VOC classification.

Mycoplasma haemominutum in 6.41 % (5/78). *Bartonella* spp. was detected in 38.5 % (30/78) of the cats. Among these positive cases, *B. henselae* was identified in 76.7 % (23/30) of the samples, whereas *B. clarridgeiae* was identified in 23.3 % (7/30) based on the unique size of the PCR product. The analysis of the sequenced fragment showed similarity with the species *B. henselae* in four samples and *B. clarridgeiae* in two samples; however, sequencing was unsuccessful in the remaining samples. The cat that tested positive for at least one assay (PCR or Rapid Test) was considered positive for FIV or FeLV. In general, FeLV was the most common retrovirus in this sampling, with 17.9 % (14/78) positive cats. From these FeLV positive cats, only 3.8 % (3/78) were positive in both assays. None of the cats were positive to FIV (0/78).

Leishmania infantum, *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* DNA sequences were deposited in GenBank under the following accession numbers: OR157988, OR157989, OR157990, OR157991, OR157992, OR157993, OR157994, OR157995, OR488003, OR488004, OR488005, OR488006, and OR488007.

3.4. Co-infections detected

In our study, we found three cats with a co-infection profile of SARS-

CoV-2 and other infections, one coinfecting with *Bartonella* spp. and FeLV, and two with *Bartonella* spp. (Table 4). No significant association was detected between the presence of SARS-CoV-2 RNA and positivity for *L. infantum*, *T. gondii*, hemotropic *Mycoplasma* spp., *Bartonella* spp., FeLV, or FIV (data not shown, $P > 0.05$). In addition, other co-infections among the pathogens were detected (Table 4).

4. Discussion

SARS-CoV-2 is responsible for millions of deaths worldwide (WHO Health Organization, 2023). This pathogen has also been detected in different animals (Tan et al., 2022). In our study, we investigated the occurrence by SARS-CoV-2 infection and other pathogens in 20 % (78/390) stray cats; as estimated by Carvalho in 2018; without knowledge of potential exposure to SARS-CoV-2 at Américo Renné Giannetti Municipal Park in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. The Municipal Park is an important recreational area within the city and was considered a critical area during the COVID-19 pandemic because of its proximity to the hospital. Samples were collected during a sterilization campaign in the park between February and September 2021. Six cats (7.7 %) tested positive for SARS-CoV-2 viral RNA by RT-qPCR.

Table 4
Co-infections in cats from the Municipal Park Américo Renné Giannetti (PqMARG).

SARS-CoV-2	L. infantum	T. gondii	Bartonella spp.	Mycoplasma spp.	FelV	FIV	Number of positive cats	Gender	Age
-	+	+	+	-	-	-	1	Female: 1	1A
-	+	-	+	-	-	-	4	Female: 3	3A
-	+	+	-	-	-	-	1	Male: 1	1A
-	+	-	-	-	+	-	1	Male: 1	1A
-	+	-	-	+	-	-	1	Female: 1	1A
-	+	-	-	-	-	-	4	Female: 2	2A
-	-	+	-	+	-	-	2	Male: 2	2A
-	-	+	+	-	-	-	3	Female: 2	2A
-	-	+	-	-	+	-	4	Male: 1	1A
-	-	+	-	-	-	-	9	Female: 4	3A, 1K
-	-	-	+	+	-	-	1	Female: 6 Male: 3	2K 4A
-	-	-	+	+	+	-	1	Female: 1	1A
-	-	-	+	-	+	-	3	Female: 1	1A
-	-	-	+	-	-	-	16	Male: 2	2A
-	-	-	-	-	-	-	16	Female: 1	1K
-	-	-	-	+	-	-	1	Female 9 Male: 7	2K,7A
-	-	-	-	+	+	-	1	Male: 1	7A
-	-	-	-	+	-	-	1	Male: 1	1A
-	-	-	-	-	+	-	3	Female: 3	3A
-	-	-	-	-	-	-	16	Female: 10	1Y, 20A
Total samples								Male: 11	72

Legend: K: Kitten, Y: Young, A: Adult

Although most of the cats in our study were negative for the presence of SARS-CoV-2, and we only obtained six positive cats (7.7 %), the result is considered significant because it highlights the possibility of infection in cats. This result could have been influenced by the presence of animals with a very low viral load, which may not be detectable by RT-qPCR due to its sensitivity limitations for very low viral loads. Moreover, given the absence of assays to detect anti-SARS-CoV-2 antibodies in stray cats, the true positivity in cats may have been underestimated. The low RNA viral loads observed in the cats of this study can be attributed to various variables: the timing of sample collection (Klaus et al., 2021; Jairak et al., 2022), a potential mild infection, or the animal being in the process of recovering from the infection at the time of sample collection (Fernández-Bastit et al., 2021; Segalés et al., 2020).

SARS-CoV-2 infection in animals can occur via three main routes: contact with an infected animal, contact with infected humans and exposure to contaminated environments (Abrahão et al., 2021). Considering the park was close to visitors during the COVID-19 outbreak, and the animals primarily interacted with the treaters who supplied their food, the cats identified in our study likely contracted the virus through exposure to a contaminated environment, contact with other infected animals, or the treaters themselves (Bellinati et al., 2022). The park is located near the hospital, and at the time of collection, the area had a large flow of people infected with SARS-CoV-2. The cats in our study were not confined within the park, which allowed them wide mobility throughout the area in search of food and water. This could have caused contact with the virus deposited by infected people on surfaces near the hospital or with contaminated water. Abrahão et al. (2021) indicated that the surfaces of materials, including metal and concrete, and different places, mainly around hospital care units and public squares, were highly contaminated with SARS-CoV-2, suggesting the transmission from infected patients and the risk of infection for the population, and consequently, for animals that move around the area. Notably, wastewater tested positive for SARS-CoV-2 by RT-qPCR and could potentially carry the virus (Ahmed et al., 2020; Peccia et al., 2020). Moreover, experimental infections have shown that SARS-CoV-2 persists in cats and that the virus is transmissible between them (Shi et al., 2020).

The detection of four of the six cats within a limited timeframe (May

2021) raises the possibility of a common source of infection. However, in our study, we do not have detailed data on the specific collection area for each cat. The lack of precise information regarding the proximity of the positive cats is due to the nature of the study and limitations in data availability.

Based on the molecular diagnosis and genomic results, the data presented here indicate that stray cats are naturally infected with SARS-CoV-2. According to our phylogenetic analysis, the three genomes assembled from different cats were grouped in the same cluster, indicating that the viral genomes were similar, suggesting the circulation of the same virus and a common source of infection. In addition, these samples clustered with other viral genome isolates from human sources, suggesting that the primary infection may have occurred from humans to cats. This result corroborates the fact that domestic animals living with humans infected with the virus are exposed to the infection (Dias et al., 2021; Sharun et al., 2021). Otherwise, animals with little contact with humans in environmentally infected areas can also be infected (Zhang et al., 2020; Spada et al., 2021; Villanueva-Saz et al., 2022).

Genomic analyses of different studies revealed that viral sequences from animals and humans are closely related to VOCs that are present worldwide and prevalent in each of the countries detected (Aart et al., 2021; Klaus et al., 2021; Hamer et al., 2021; Bellinati et al., 2023). The delta variant included B.1.617.1, B.1.617.2, and B.1.617.3, with only minor differences and distinct geographical distributions. In Brazil, the first cases of COVID-19 caused by the delta were reported at the end of May 2021, with a rapid increase, positioning itself as the most contagious variant at the time of emergence (WHO, 2021; Michelon, 2021). In this sense, our study shows strength in the identification of the VOC Delta (B.1.617.2) sublineage AY.99.2 through whole genome analysis on the oropharyngeal swab samples from GP49 and rectal swabs from GP59. In particular, a natural infection caused by the VOC Delta (B.1.617.2) was first detected in dogs from Kansas, USA, and Barcelona, Spain, in mid-2021, both of which were infected by close contact with their owners (Doerksen et al., 2021; Fernández-Bastit et al., 2021). VOC Delta infection in cats was reported in Harbin, China, in September 2021 (Kang et al., 2022). Delta-variant infections in domestic cats and dogs were also reported in Thailand in May 2022 (Jairak et al., 2022).

Natural infections with the delta variant have been reported in wild

animals in Canada and captive animals in a zoo in India, where human-to-animal transmission is suspected (Mishra et al., 2021; Karikalan et al., 2022). Even though most of the reported cases are in animals with direct contact with humans positive for COVID-19, it can be observed that the detected variants are genetically related to the VOCs that circulate among humans and that they are prevalent in each country. In Brazil, the first case of COVID-19 caused by the delta variant in humans was confirmed in the second half of April 2021 (de Souza, 2022).

The first case was reported in the state of Maranhão, followed by cases reported in Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, and Goiás, totaling more than 100 cases by mid-July 2021 (Michelson, 2021). However, we suspect that this number was underestimated because at the time the Delta variant entered Brazil, the variant monitoring systems were inefficient, and it was impossible to know what was happening in the entire country because fewer samples were sequenced (Mali and Mões, 2021). Phylogenetic analysis showed that SARS-CoV-2 isolates from cats clustered in a variant of the delta (B.1.617.2) sublineage AY.99.2. Although our study did not aim to analyze samples from humans in close contact with cats or to sample the areas where cats live, the phylogeny revealed that cats were infected by the delta variant circulating in the third wave of outbreaks of COVID-19 in Brazil. Furthermore, they form a clade, which suggests either a common source of infection or transmission of the virus between cats, as reported in previous studies (Shi et al., 2020). Although we have not experimentally shown transmission events between cats, our phylogenetic data indicate that three cats (GP37, GP54 and GP49) show high similarity and statistical support (bootstrap above 85 %). This clustering in the phylogeny indicates that the virus in circulation is the same among cats and is undergoing some minor changes in animal hosts. Therefore, further studies are required to determine whether the infection spreads to other stray cats in the same location through human-to-cat contact or between cats.

It is worth noting that none of the animals presented with at least one clinical sign of any disease upon general physical examination. Trained veterinarians performed all collections, and the cats were anesthetized during the procedure. Physical examination was based on general appearance and body condition, and injured and/or apparently ill animals were excluded. All the cats were classified as healthy. This event has been reported in animals positive for SARS-CoV-2; according to Giraldo-Ramirez et al. (2021), 54 % of reported cases of cats infected with SARS-CoV-2 were asymptomatic.

No statistically significant association was found between SARS-CoV-2 infection and the variables examined in this study (sex, age, and co-infections). Therefore, other factors may be involved in SARS-CoV-2 infection in cats that were not evaluated in this study. However, we considered the size of the positive samples to be too small; a small sample size can result in a lack of power to detect a significant association between variables, even if one exists (Lenth, 2001).

Stray cats are frequently exposed to a variety of arthropods that potentially carry viruses, bacteria, and parasites that cause vector-borne (VBP) infections; therefore, they are highly likely to infect and maintain infections within their colonies (Kuhlmeier et al., 2022; Melo et al., 2023). In a study in Spain, co-infection with SARS-CoV-2 and other pathogens was detected in three cats: a male coinfecting with *T. gondii* and FIV, a male coinfecting only with FIV and *L. infantum* and a female coinfecting only with *T. gondii*, suggesting that immunocompromised animals could be particularly susceptible to SARS-CoV-2 infection (Villanueva-Saz et al., 2022).

In our study, we investigated possible co-infection in cats infected with SARS-CoV-2 and other pathogens that cause immunosuppression, which may impair the normal response to infection and expose cats to other pathogens (Sobrinho et al., 2012; Villanueva-Saz et al., 2022). We found three cats infected with SARS-CoV-2 that were also positive for *Bartonella* spp., a gram-negative bacterium associated with cat scratch disease in humans. The most common species found in cats are *Bartonella henselae*, *B. clarridgeiae*, and *B. koehlerae* (Torrejón et al., 2022).

Although the disease in cats is usually asymptomatic, it can become clinically visible in the presence of concomitant infections, stressful situations, or immunosuppressive illnesses, causing clinical signs, such as endocarditis, stomatitis, pyogranulomatous myocarditis, diaphragmatic myositis, fever, and diseases of the central nervous system (Raimundo et al., 2019). The diagnosis of *Bartonella* spp. can be based on culture, serology, histopathology, and PCR assays; the latter, together with sequencing, is one of the most widely used alternatives (Raimundo, 2018). In our study, the prevalence rate for *Bartonella* spp. was 38.5 %, similar to that found by Raimundo et al. (2019) (39.9 %) in shelter cats in Rio de Janeiro and slightly lower than previously reported studies in Brazil, where the prevalence was 45.6 % (André et al., 2016) and 47.8 % (Raimundo et al., 2022).

Conventional PCR-mediated amplification targeting the intergenic region of 16S-23S rRNA results in a product of a unique size for each *Bartonella* species, allowing the differentiation of medically relevant *Bartonella* species without the need for RFLP analysis or sequencing of the amplified product. Using a single-step PCR-based assay capable of detecting and differentiating *Bartonella* species in clinical samples derived from naturally infected animals (Jessen et al., 2000), we sequenced 12 samples with different patterns according to the unique band obtained during electrophoresis. However, it is noteworthy that the small size of the sequenced fragment is a limiting factor for confirming the found species. Results based on sequencing and BLAST analysis revealed that *B. henselae* and *B. clarridgeiae* were the species detected in six cats of this study. These bacteria have been previously linked to human infections (Vieira-Damiani et al., 2015). To our knowledge, this is the first report of *Bartonella* spp. in PqMARG cats; however, the presence of *Ctenocephalides felis* fleas has already been reported in PqMARG cats (Sebastiani, 2021). The sequencing of the remaining samples was unsuccessful. There are several reasons why the sequencing of some samples may not succeed, including poor sample quality and human error. Poor-quality samples can result in failed sequencing. Samples may be degraded, contaminated, or contain insufficient quantity or quality of DNA or RNA. Mistakes during sample handling, preparation, and sequencing can result in failed sequencing. It is important to follow proper protocols and quality control measures to minimize the risk of human error. (Crossley et al., 2020)

Among the diseases that most affect cats are the retroviruses Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV). Both retroviruses can affect the cat's immune system and predispose the animal to other infections. It has been argued that co-infections with FIV and FeLV could increase the risk of developing serious illnesses (Jorge et al., 2011). In this study, we identified a cat that tested positive for SARS-CoV-2 and FeLV. This finding was also reported by Carneiro et al. (2022) in another Brazilian state, Bahia, who described the event as a fatal case of SARS-CoV-2 and FeLV co-infection in an eight-year-old male cat. The prevalence for FeLV in our study was 17.9 %, which is similar to 20.3 % found by Teixeira et al. (2007) and different from 47.5 % found by Coelho et al. (2011) studies carried out in domestic cats in Belo Horizonte. Furthermore, despite the cat population studied being free roaming, none of the cats tested positive for FIV in PCR or Rapid Test. Not finding FIV-positive animals may indicate a low prevalence in the cat population of the park in question. The low prevalence can be attributed to the less efficient transmission of this pathogen compared to FeLV. This is because FIV is primarily transmitted through bites, which must inoculate the virus parenterally to be effective. However, for FeLV transmission, only contact with oro-nasal mucosa and contaminated secretions is necessary (Biezu et al., 2019).

Information about the geographic distribution and epidemiological characteristics of infection by *L. infantum* in cats, as well as the role of cats in the epidemiological cycle of leishmaniasis, remains unclear, especially in urban stray cats that live in regions where canine leishmaniasis is endemic. Infections in cats can occur in situations that compromise the functionality of the immune system (Pennisi, 2015). The prevalence of this parasite in our study was 15.4 %. Studies carried

out on stray and sheltered cats in Belo Horizonte, Minas Gerais, reported that 29.8 % and 54 % of the cats examined were seropositive for *Leishmania* antibodies by ELISA and immunofluorescence antibody tests, respectively, and 12.5 % tested positive by the PCR technique (Coura et al., 2018; Costa-Val et al., 2020). Molecular identification and sequencing of the pathogen in cats in PqMARG reinforces the idea that cats highly exposed to the parasite in an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL) can become infected (Pennisi et al., 2015). Hence, clarifications are needed on the importance of felines carrying *L. infantum* in the ZVL cycle. This is the first study to report *Leishmania infantum* infection in cats at the PqMARG.

In the urban context, domestic cats play a decisive role in the epidemiology of *T. gondii* infection since they are responsible for the contamination of the environment shared with humans (Cong et al., 2016). The detection of *T. gondii* in cats in urban areas is important because cats are definitive hosts of the parasite and can spread it to the environment through their feces. This is especially concerning in urban areas where there is a large population of stray cats that can contaminate soil, water, and vegetation with oocysts of *T. gondii* (Arruda et al., 2021). In the PqMARG, there is a favorable environment for the development of the biological cycle of the parasite, as they can interact in the same space and share a definitive host, with intermediate hosts such as birds, rodents that live in the park and domestic dogs and humans that visit it. In this sense, environmental contamination may pose a risk to public health and the health of the animals, especially young and immunocompromised cats. The seroprevalence of this parasite in our study was 23.1 %, similar to that found by Sebastiani (2021) in a cross-sectional observational study carried out through the analysis of a bank of biological samples belonging to cats of the PqMARG collected between 2015 and 2018. In Brazil, epidemiological studies of *T. gondii* show different percentages of seroprevalence: 28 % (da Silva et al., 2022), 50.5 % (Braga et al., 2012), and 65.63 % (Gomes et al., 2019). Seropositivity to *T. gondii* has been associated with infections of FIV, FeLV, *Leishmania* spp., and *Mycoplasma* spp. (Rivetti Júnior, 2006; Sobrinho et al., 2012; Feitosa et al., 2021; da Silva et al., 2022).

In cats, the presence of four species of hemotropic mycoplasmas have been described: *M. haemofelis*, *Candidatus M. haemominutum*, *Candidatus M. turicensis*, and *Candidatus M. haematoparvum*. These species differ in pathogenicity, with *M. haemofelis* being the most pathogenic (Silaghi et al., 2014). Additionally, infection by these organisms is considered opportunistic; thus, immunosuppressive sub-conditions can induce intense hemolytic anemia and death (Makino et al., 2018). These organisms are believed to have a worldwide distribution, as *Mycoplasma* species have been described on almost all continents except Antarctica (Maceira, 2008). The presence of hemotropic mycoplasma in PqMARG cats has already been described, with a prevalence of 48.8 % (102/209). Of these, 39 (18.7 %) were positive for *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, nine (4.3 %) for the species *M. haemofelis*, and two (0.9 %) for *Candidatus Mycoplasma turicensis* (Sebastiani, 2021). In our study, the prevalence was very low, 7.7 % (6/78), with five (6.41 %) being positive for *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, one (1.28 %) for the species *M. haemofelis*, and none for *Candidatus Mycoplasma turicensis*. The large number of animals sampled in our study may have contributed to this result.

The combined results of the molecular and serological analyses revealed the presence of co-infections in 29.5 % (23/78) cats. Several studies have investigated the prevalence of co-infections of hemoparasites in stray cats. For example, a study conducted in Spain found that *Leishmania infantum* was co-infected with FELV, FCoV, *Cytauxzoon felis*, *B. henselae*, and *T. gondii* in stray cats (Spada et al., 2016). Another study conducted in Brazil found that 25.8 % of stray cats were infected with both hemoplasmas (Makino et al., 2018). Co-infections with hemoparasites in stray cats are an important issue, as they can lead to more severe disease and poorer health outcomes. Hemoparasites can cause a range of clinical signs, including anemia, fever, and organ damage. Stray cats are particularly vulnerable to these infections due to their

exposure to other cats, fleas, ticks, and other vectors that can transmit these pathogens. Some of the co-infections detected in our study have already been reported in Brazil (Sobrinho et al., 2012; Santos et al., 2018; Marcondes et al., 2018; da Silva et al., 2022; Pesqueira et al., 2023). These studies highlight the importance of screening stray cats for hemoparasites and the occurrence of co-infections. Treatment and management strategies for these infections should consider the possibility of co-infections and the potential for more severe disease outcomes.

Although stray cats generally do not maintain close contact with humans, they can be found in areas close to humans, as observed in the PqMARG. In this context, we can find docile cats that accept the presence and affection of humans, thus establishing direct contact between them. Unlike feral cats, which live alone, docile stray cats from the PqMARG create colonies around places where they receive food and are in close contact with other cats. However, stray cats have a high probability of infecting and maintaining infections within their colonies with pathogens, such as *Feline Leukemia Virus* (FeLV) and *Feline Immunodeficiency Virus* (FIV), mainly due to a lack of preventative care. Therefore, stray cat populations are a potential source of infection, representing an important concern for public health and animal welfare (Kuhlmeier et al., 2022).

5. Conclusions

The findings of our study indicate that stray cats living at the PqMARG in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, were infected with SARS-CoV-2 during the COVID-19 pandemic and demonstrate the prevalence of infections and co-infections with other important pathogens, such as *L. infantum*, *T. gondii*, hemotropic *Mycoplasma* spp., *Bartonella* spp., and retroviruses. Our results reinforce the need to study the role played by stray animals in the epidemiology of viruses and support the idea of circulating agents transmitted by vectors, signaling the importance of adopting preventive measures against ectoparasites in zoonotic control strategies. Moreover, it is important to monitor animal populations to evaluate the presence of pathogens and determine whether these animals can be a source of human infections. This reinforces the importance of surveillance of zoonotic diseases, which can be transmitted from animals to humans, and the need for more studies to determine whether immunosuppressed animals are susceptible to SARS-CoV-2 infections.

CrediT authorship contribution statement

Anisleydy Pérez Castillo: Conceptualization, investigation, methodology, analysis, formal analysis, data curation, writing—original draft, writing, reviewing, and editing. **João Victor Oliveira Miranda:** Methodology, analysis, writing – review, and editing. **Paula Luíze Camargos Fonseca:** Methodology, formal analysis, data curation, visualization, writing – original draft, writing, review, and editing. **Soraia de Oliveira Silva:** Resources, methodology, writing the original draft, writing the review, and editing. **Rosálida Estevam Nazar Lopes:** Resources, methodology. **Viviane Campos Spanhol:** Methodology, writing—original draft, review, and editing—original draft. **Rennan Garcias Moreira:** Methodology, formal analysis, and data curation. **Rafael Romero Nicolino:** Methodology, data curation, formal analysis, review, and editing of the original draft. **Daniel Costa Queiroz:** Methodology. **Luiza Campos Guerra de Araújo e Santos:** Methodology. **Anna Pío Soares dos Santos:** Methodology. **Hugo Adriano Araújo Rivetti:** Methodology. **Erica S. Martins-Duarte:** Resources, review, and editing. **Ricardo Wagner de Almeida Vitor:** Investigation, review, and editing. **Jenner Karlsson Pimenta dos Reis:** Investigation, resources, review, and editing. **Renato Santana Aguiar:** Conceptualization, resources, review, editing, investigation, supervision, and funding acquisition. **Júlia Angélica Gonçalves da Silveira:** Conceptualization, resources, investigation, supervision, funding acquisition, review, and editing. All the

authors have read and approved the final version of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

The work was supported by a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and institutional support from the Prefecture of Belo Horizonte (PBH), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). RWAV (305574/2021-3) and JAGS (315466/2021-9) thank CNPq for the PQ fellowship. We would like to thank our colleagues Maria Norma Melo, Marina Mourão Sena Claudinho, Claudia Fideles Resende, and Nicolás Colacio, employees of the Zoonosis Control Center, and the veterinarians for their collaboration.

Funding

This research was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq and Universidade Federal de Minas Gerais. This research was also funded by the Rede Corona-ômica BR MCTI/FINEP, affiliated with 116 Rede Vírus/MCTIs (FINEP 01.20.0029.000462/20, CNPq 404096/2020-4), MEC/CAPES 118 (14/2020 - 23072.211119/2020-10), FINEP (0494/20 01.20.0026.00), and FINEP n° 1139/20 (RSA). Additionally, this project was partially funded by the Instituto Todos Pela Saúde-ITPs (Chamada 01/2021-C1294).

References

- Abrahão, J.S., Sacchetto, L., Rezende, I.M., Rodrigues, R.A.L., Crispim, A.P.C., Moura, C., Mendonça, D.C., Reis, E., Souza, F., Oliveira, G.F.G., Domingos, I., de Miranda Boratto, P.V., Silva, P.H.B., Queiroz, V.F., Machado, T.B., Andrade, L.A.F., Lourenço, K.L., Silva, T., Oliveira, G.P., de Souza Alves, V., Drumond, B.P., 2021. Detection of SARS-CoV-2 RNA on public surfaces in a densely populated urban area of Brazil: a potential tool for monitoring the circulation of infected patients. *Sci. Total Environ.* 766, 142645 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142645>.
- Agopian, R.G., da Luz, S.C.G., Zebral, A.G.B., de Sousa, G.F., de Oliveira, I.A.V., Lima, L. S., Sechi, M.A., de Oliveira, M.C., Rudinski, V.F., Brandespin, D.F., de Carvalho, O. V., Pettan-Brewer, C., Dos Santos, A.P., Kmetiuk, L.B., Biondo, A.W., 2022. First reported cases of SARS-CoV-2 infection in pets in São Paulo, Brazil. *Vet. World* 15 (11), 2593–2596. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2593-2596>.
- Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., Bibby, K., Bivins, A., O'Brien, J.W., Choi, P.M., Kitajima, M., Simpson, S.L., Li, J., Tschärke, B., Verhagen, R., Smith, W.J.M., Zaugg, J., Dierens, L., Hugenoltz, P., Thomas, K.V., Mueller, J.F., 2020. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: a proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci. Total Environ.* 728, 138764 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>.
- Aksamentov, I., Roemer, C., Hodcroft, E.B., Neher, R.A., 2021. Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *J. Open Source Softw.* 6 (67), 3773. <https://doi.org/10.21105/joss.03773>.
- Aleem, A., Akbar Samad, A.B., Slenker, A.K., 2022. Emerging variants of SARS-CoV-2 and novel therapeutics against coronavirus (COVID-19). *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34033342/>.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Andrade, M.M., Carneiro, M., Medeiros, A.D., Andrade Neto, V., Vitor, R.W., 2013. Seroprevalence and risk factors associated with ovine toxoplasmosis in Northeast Brazil. *Parasite* 20, 20. <https://doi.org/10.1051/parasite/2013019>.
- André, M.R., Dumler, J.S., Herrera, H.M., Gonçalves, L.R., de Sousa, K.C., Scorpio, D.G., de Santis, A.C., Domingos, I.H., de Macedo, G.C., Machado, R.Z., 2016. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time polymerase chain reaction using the nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase gamma subunit (nuoG) for Bartonella species in domiciled and stray cats in Brazil. *J. Feline Med. Surg.* 18 (10), 783–790. <https://doi.org/10.1177/1098612X15593787>.
- Arruda, I.F., Millar, P.R., Barbosa, A.D.S., Abboud, L.C.S., Dos Reis, I.C., Moreira, A.S.D. C., Guimarães, M.P.P., Amendoeira, M.R.R., 2021. Toxoplasma gondii in domiciled dogs and cats in urban areas of Brazil: risk factors and spatial distribution. *Toxoplasma gondii* chez les chiens et les chats domiciliés dans des zones urbaines du Brésil: facteurs de risque et répartition spatiale. *Parasite* 28, 56. <https://doi.org/10.1051/parasite/2021049>.
- Bellinati, L., Campalto, M., Mazzotta, E., Ceglie, L., Cavicchio, L., Mion, M., Lucchese, L., Salomoni, A., Bortolami, A., Quaranta, E., Magarotto, J., Favarato, M., Squarzon, L., Natale, A., 2022. One-Year Surveillance of SARS-CoV-2 Exposure in Stray Cats and Kennel Dogs from Northeastern Italy. *Microorganisms* 11 (1), 110. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010110>.
- Biezus, G., Machado, G., Ferian, P.E., da Costa, U.M., Pereira, L.H.H.D.S., Withoef, J.A., Nunes, I.A.C., Muller, T.R., de Cristo, T.G., Casagrande, R.A., 2019. Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 63, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.12.004>.
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2003. Development and evaluation of a semineutralized PCR for detection and differentiation of Babesia gibsoni (Asian genotype) and B. canis DNA in canine blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 41 (9), 4172–4177. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics* 30 (15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Bosco-Lauth, A.M., Hartwig, A.E., Porter, S.M., Gordy, P.W., Nehring, M., Byas, A.D., VandeWoude, S., Ragan, I.K., Maison, R.M., Bowen, R.A., 2020. Experimental infection of domestic dogs and cats with SARS-CoV-2: pathogenesis, transmission, and response to reexposure in cats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117 (42), 26382–26388. <https://doi.org/10.1073/pnas.2013102117>.
- Braga, M.S.C.O., André, M.R., Jusi, M.M.G., 2012. Occurrence of anti-Toxoplasma gondii and anti-Neospora caninum antibodies in cats with outdoor access in São Luís, Maranhão, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 107–111. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000200007>.
- Carneiro, R.L., Farias, J.P., Pinheiro, J.R., Farias, J., Viello, A.C., Birbrair, A., Belmok, A., Melo, F.L., Ribeiro, B.M., Chaves, G., Vidal, P.O., Luiz, W.B., Amorim, J. H., 2022. First description of a multisystemic and lethal SARS-CoV-2 variant of concern P.1 (Gamma) infection in a FeLV-positive cat. *Vet. J.* 19 (1), 93. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01816-z>.
- Carvalho, P.C.F.B., 2018. Caracterização Populacional e Descrição Do Manejo De Gatos Errantes No Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SMOC-B55GZX>.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2023). SARS-CoV-2 variant classifications and definitions [accessed 2023 Jun 02]. Retrieved from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>.
- Cherian, S., Potdar, V., Jadhav, S., Yadav, P., Gupta, N., Das, M., et al., 2021. SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, T478K, E484Q and P681R, in the second wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms* 9, 1542. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071542>.
- Coelho, F.M., Maia, M.Q., Luppi, M.M., Costa, E.A., Luiz, A.P.M.F., Ribeiro, N.A., Bomfim, M.R.Q., Fonseca, F.G., Resende, M., 2011. Ocorrência do vírus da leucemia felina em Felis catus em belo horizonte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 63 (3), 778–783. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000300037>.
- Cong, W., Qin, S.Y., Meng, Q.F., Zou, F.C., Qian, A.D., Zhu, X.Q., 2016. Molecular detection and genetic characterization of Toxoplasma gondii infection in sila deer (Cervus nippon) in China. *Inf. Genet. Evol.: J. Mol. Epidemiol. Evolut. Genet. Inf. Dis.* 39, 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.005>.
- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses (CSG), 2020. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 5, 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- Costa-Val, A.P.D., Coura, F.M., Barbieri, J.M., Diniz, L., Sampaio, A., Reis, J.K.P.D., Bueno, B.L., Gontijo, C.M.F., 2020. Serological study of feline leishmaniasis and molecular detection of Leishmania infantum and Leishmania braziliensis in cats (Felis catus). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 29 (2), e003520 <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012020023>.
- Coura, F.M., Passos, S.K.P., Pelegrino, M.O.F., Leme, F.O.P., Paz, G.F., Gontijo, C.M.F., Costa-Val, A.P.D., 2018. Serological, molecular, and microscopic detection of Leishmania in cats (Felis catus) in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 27 (4), 570–574. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180052>.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C., 2003. Presence of Mycoplasma haemofelis, Mycoplasma haemominutum and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Vet. Microbiol.* 93 (4), 307–317. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00044-0).
- Crossley, B.M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M.L., Clement, T., Toohey-Kurth, K., 2020. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J. Vet. Diagn. Invest.* 32 (6), 767–775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>.
- da Silva, A.R.D., Andrade, G.B., Carvalho, J.K.M.R., Barreto, W.T.G., Santos, F.M., Sousa, K.C.M., André, M.R., Ferreira, L.C., Menezes, R.C., Herrera, H.M., 2022. The outcomes of polyparasitism in stray cats from Brazilian Midwest assessed by epidemiological, hematological and pathological data. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 31 (2), e004222 <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022033>.

- de Souza, U.J.B., Dos Santos, R.N., de Melo, F.L., Belmok, A., Galvão, J.D., de Rezende, T. C.V., Cardoso, F.P., Carvalho, R.F., da Silva Oliveira, M., Ribeiro Junior, J.C., Gabev, E.E., Sabino, E.C., Arns, C.W., Ribeiro, B.M., Spilki, F.R., Campos, F.S., 2022. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 in tocanantins state and the diffusion of P.1.7 and AY.99.2 lineages in Brazil. *Viruses* 14 (4), 659. <https://doi.org/10.3390/v14040659>.
- Dias, H.G., Resck, M.E.B., Caldas, G.C., Resck, A.F., da Silva, N.V., Dos Santos, A.M.V., Sousa, T.D.C., Ogrzewalska, M.H., Siqueira, M.M., Pauvolid-Corrêa, A., Dos Santos, F.B., 2021. Neutralizing antibodies for SARS-CoV-2 in stray animals from Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One* 16 (3), e0248578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248578>.
- Doerkens, T., Lu, A., Noll, L., Almes, K., Bai, J., Upchurch, D., Palinski, R., 2021. Near-complete genome of SARS-CoV-2 Delta (AY.3) variant identified in a dog in Kansas, USA. *Viruses* 13 (10), 2104. <https://doi.org/10.3390/v13102104>.
- el Tai, N.O., Osman, O.F., el Fari, M., Presber, W., Schönián, G., 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94 (5), 575–579. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(00\)90093-2](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90093-2).
- Epifanio, I.D.S., Rodrigues, D.D.S., de Lima, L.B., Nogueira, M.A.A., Felix, L.R.D.M.P., de Almeida, B.F., Farias, C.K.D.S., de Carvalho, O.V., Maia, R.C.C., Ristow, L.E., Barbosa, D.S., Galhardo, J.A., Pettan-Brewer, C., Kmetiuk, L.B., Agopian, R.G., Dutra, V., de Moraes, H.A., Dos Santos, A.P., Biondo, A.W., Brandespin, D.F., 2021. First report of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection in two asymptomatic cats in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. *Vet. World* 14 (10), 2839–2842. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2839-2842>.
- Faria, N.R., Mellan, T.A., Whittaker, C., Claro, I.M., Candido, D., da, S., Mishra, S., et al., 2021. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* 372, 815–821. <https://doi.org/10.1126/science.abb2644>.
- Feitosa, T.F., Costa, F.T.R., Ferreira, L.C., Silva, S.S., Santos, A., Silva, W.I., Brasil, A.W. L., Vilela, V.L.R., 2021. High rate of feline immunodeficiency virus infection in cats in the Brazilian semi-arid region: occurrence, associated factors and coinfection with *Toxoplasma gondii* and feline leukemia virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 79, 101718. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101718>.
- Fernández-Bastit, L., Rodon, J., Pradenas, E., Marfil, S., Trinité, B., Parera, M., Roca, N., Pou, A., Cantero, G., Lorca-Oró, C., Carrillo, J., Izquierdo-Useros, N., Clotet, B., Noguera-Julian, M., Blanco, J., Vergara-Alert, J., Segalés, J., 2021. First detection of SARS-CoV-2 Delta (B.1.617.2) variant of concern in a dog with clinical signs in Spain. *Viruses* 13 (12), 2526. <https://doi.org/10.3390/v13122526>.
- Giraldo-Ramirez, S., Rendón-Marín, S., Jaimes, J.A., Martínez-Gutiérrez, M., Ruiz-Saenz, J., 2021. SARS-CoV-2 clinical outcome in domestic and wild cats: a systematic review. *Animals* 11 (7), 2056. <https://doi.org/10.3390/ani11072056>.
- Gomes, M.A.R.B., Spiller, P.R., Paiva, F.W.F.de, Ribeiro, T.M.P., 2019. Hemoparasitas e detecção de anticorpos contra toxoplasma gondii e neospora caninum em cães e gatos no estado de roraima. *Rev. Bras. Hig. Sanidade Animal* 13 (4), 461–469. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/55155>.
- Halfmann, P.J., Hatta, M., Chiba, S., Maemura, T., Fan, S., Takeda, M., Kinoshita, N., Hattori, S.I., Sakai-Tagawa, Y., Iwatsuki-Horimoto, K., Imai, M., Kawakawa, Y., 2020. Transmission of SARS-CoV-2 in domestic cats. *N. Engl. J. Med.* 383 (6), 592–594. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2013400>.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95 98 NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98. <https://www.academia.edu/download/29520866/1999hall1.pdf>.
- Hamer, S.A., Pauvolid-Corrêa, A., Zecca, I.B., Davila, E., Auckland, L.D., Roundy, C.M., Tang, W., Torchetti, M.K., Killian, M.L., Jenkins-Moore, M., Mozingo, K., Akpalu, Y., Ghai, R.R., Spengler, J.R., Barton Behravesh, C., Fischer, R.S.B., Hamer, G.L., 2021. SARS-CoV-2 infections and viral isolations among serially tested cats and dogs in households with infected owners in Texas, USA. *Viruses* 13 (5), 938. <https://doi.org/10.3390/v13050938>.
- Hohdatsu, T., Motokawa, K., Usami, M., Amioka, M., Okada, S., Koyama, H., 1998. 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* 70 (1), 107–111. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(97\)00167-5](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(97)00167-5).
- Jairak, W., Chamsai, E., Udom, K., Charoenkul, K., Chaiaiwong, S., Techakriengkrai, N., Tangwangvivat, R., Suwannakarn, K., Amonsin, A., 2022. SARS-CoV-2 delta variant infection in domestic dogs and cats, Thailand. *Sci. Rep.* 12 (1), 8403. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12468-y>.
- Jarrah, S.A., Kmetiuk, L.B., Valleriani, F., Bonfini, B., Lorusso, A., Vasinioti, V., Decaro, N., Dos Santos, M.T., Spohr, K.A.H., Pratelli, A., Serroni, A., Capista, S., Sousa, V.R.F., Biondo, A.W., Nakazato, L., Dutra, V., 2023. SARS-CoV-2 antibodies in dogs and cats in a highly infected area of Brazil during the pandemic. *Front. Vet. Sci.* 10, 1111728. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1111728>.
- Jensen, W.A., Fall, M.Z., Rooney, J., Kordick, D.L., Breitschwerdt, E.B., 2000. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 38 (5), 1717–1722. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.5.1717-1722.2000>.
- Jorge, J.J., Ferreira, F., Hagiwara, M.K., 2011. Risk factors for feline leukemia virus (FeLV) infection in cats in São Paulo, Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Animal Sci.* 48 (5), 392–398. <https://doi.org/10.11606/S1413-95962011000500006>.
- Kang, K., Chen, Q., Gao, Y., Yu, K.J., 2022. Detection of SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) variant in three cats owned by a confirmed COVID-19 patient in Harbin, China. *Vet. Med. Sci.* 8 (3), 945–946. <https://doi.org/10.1002/vms3.715>.
- Karikalan, M., Chander, V., Mahajan, S., Deol, P., Agrawal, R.K., Nandi, S., Rai, S.K., Mathur, A., Pawde, A., Singh, K.P., Sharma, G.K., 2022. Natural infection of Delta mutant of SARS-CoV-2 in Asiatic lions of India. *Transbound Emerg. Dis.* 69 (5), 3047–3055. <https://doi.org/10.1111/tbed.14290>.
- Klaus, J., Zini, E., Hartmann, K., Egberink, H., Kipar, A., Bergmann, M., Palizzotto, C., Zhao, S., Rossi, F., Franco, V., Porporato, F., Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., 2021. SARS-CoV-2 infection in dogs and cats from southern germany and Northern Italy during the first wave of the COVID-19 pandemic. *Viruses* 13 (8), 1453. <https://doi.org/10.3390/v13081453>.
- Kuhlmeier, E., Chan, T., Klaus, J., Pineroli, B., Geisser, E., Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., 2022. A Pre- and within-pandemic survey of SARS-CoV-2 RNA in saliva swabs from stray cats in Switzerland. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v14040681>.
- Langmead, B., Wilks, C., Antonescu, V., Charles, R., 2019. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. *Bioinformatics* 35 (3), 421–432. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty648>.
- Lenth, R.V., 2001. Some practical guidelines for effective sample size determination. *Am. Stat.* 55 (3), 187–193. <https://doi.org/10.1198/00031300137098149>.
- Li, H., 2011. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 27 (21), 2987–2993. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr509>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1), 265–275. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/>.
- Lu, X., Wang, L., Sakthivel, S.K., Whittaker, B., Murray, J., Kamili, S., Lynch, B., Malapat, L., Burke, S.A., Harcourt, J., Tamin, A., Thornburg, N.J., Villanueva, J.M., Lindstrom, S., 2020. US CDC real-time reverse transcription PCR panel for detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Emerg. Infect. Dis.* 26 (8), 1654–1665. <https://doi.org/10.3201/eid2608.201246>.
- Macieira, D.B., 2008. Hemoplasmas Em Gatos domésticos: Prevalência e Sua Associação à Infecção Natural Pelos Vírus Das Imunodeficiência E/Ou Leucemia felinas. (Tese De Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. <https://tede.ufrj.br/jspui/bitstream/tede/824/1/2008%20-%20Daniel%20de%20Barros%20Macieira.pdf>.
- Makino, H., Paula, D.A.J.de, Sousa, V.R.F., Mendonça, A.J., Dutra, V., Nakazato, L., do Bom Parto Ferreira de Almeida, A., 2018. Hemoplasmas em felinos domésticos naturalmente infectados em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *SEMINA: Ciências Agrárias* 39 (2), 875–880. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n2p875>.
- Mali, T., & Mões, M. (2021, 15 de outubro). Com 5 meses de Delta, Brasil tem queda de mortes e vira exceção no mundo. *Poder360*. Recuperado em 25 de fevereiro de 2023, de <https://www.poder360.com.br/brasil/com-5-meses-de-delta-brasil-tem-queda-d-e-mortes-e-vira-excecao-no-mundo/>.
- Marcondes, M., Hirata, K.Y., Vides, J.P., Sobrinho, L.S.V., Azevedo, J.S., Vieira, T.S.W.J., Vieira, R.F.C., 2018. Infection by *Mycoplasma* spp., feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in cats from an area endemic for visceral leishmaniasis. *Paras. Vectors* 11 (1), 131. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2716-9>.
- Melo, T.B., Silva, T.R.M., Almeida, T.L.A.C., Tutija, J.F., Silva, A.O.D., Lira, M.D.S., Amorim, D., Giannelli, A., Ramos, C.A.D.N., Alves, L.C., Carvalho, G.A., Ramos, R.A. N., 2023. Molecular detection of vector-borne pathogens in cats tested for FIV and FeLV. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 40, 100857. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2023.100857>.
- Michelon, C.M., 2021. Principais variantes do SARS-CoV-2 notificadas no Brasil / Main SARS-CoV-2 variants notified in Brazil. *Rev. Bras. Anal. Clin.* 53 (2), 109–116. <https://doi.org/10.21877/2448-3877.202100961>, 20210630. <http://www.rba-c.org.br/artigos/principais-variantes-do-sars-cov-2-notificadas-no-brasil/>.
- Miró, G., Regidor-Cerrillo, J., Checa, R., Diezma-Díaz, C., Montoya, A., García-Cantalejo, J., Botías, P., Arroyo, J., Ortega-Mora, L.M., 2021. SARS-CoV-2 infection in one cat and three dogs living in COVID-19-positive households in Madrid, Spain. *Front. Vet. Sci.* 8, 779341. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.779341>.
- Mishra, A., Kumar, N., Bhatia, S., Aasdev, A., Kannappan, S., Sekhar, A.T., Gopinadhan, A., Silambarasan, R., Sreekumar, C., Dubey, C.K., Tripathi, M., Raut, A. A., Singh, V.P., 2021. SARS-CoV-2 delta variant among asiatic lions, India. *Emerg. Inf. Dis.* 27 (10), 2723–2725. <https://doi.org/10.3201/eid2710.211500>.
- Naveca, F.G., Nascimento, V., de Souza, V.C., Corado, A.de L., Nascimento, F., Silva, G., et al., 2021. COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. *Nat. Med.* 27, 1230–1238. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01378-7>.
- Peccia, J., Zulli, A., Brackney, D.E., Grubaugh, N.D., Kaplan, E.H., Casanovas-Massana, A., Ko, A.L., Malik, A.A., Wang, D., Wang, M., Wang, M., 2020. Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. *Nat. Biotechnol.* 38, 1164–1167. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0684-z>.
- Pennisi, M.G., 2015. Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update. *Vet. Parasitol.* 208 (1–2), 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.023>.
- Pennisi, M.G., Cardoso, L., Baneth, G., Bourdeau, P., Koutinas, A., Miró, G., Oliva, G., Solano-Gallego, L., 2015. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasit. Vectors* 8, 302. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0909-z>.
- Pesqueira, T., Martins, G., Farias, L., Evaristo, A., Sé, F., Oliveira, F., Vieira, T., Collere, F., Vieira, R., Brandão, P., Horta, M., 2023. Molecular diagnosis of parasitic agents and coronavirus in cats in Northeast Brazil. *Braz. J. Glob. Health* 3 (10), 1–7. <https://per.iodicos.unisa.br/index.php/saudeglobal/article/view/406/479>.
- Peters, I.R., Helps, C.R., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Tasker, S., 2008. The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real-time duplex PCR assays. *Vet. Microbiol.* 126 (1–3), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.017>.
- Prefeitura de Belo Horizonte (PBH), (2022). Parque Municipal Américo Renné Giannetti. Available at: <https://prefeitura.pbh.gov.br/fundacao-de-parques-e-zoobotanica>

- /informacoes/parques/parque-municipal-americano-renne-giannetti Accessed on 8 Nov 2022.
- Quinlan, A.R., Hall, I.M., 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26 (6), 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>.
- Rabalski, L., Kosinski, M., Smura, T., Aaltonen, K., Kant, R., Sironen, T., Szewczyk, B., Grzybek, M., 2021. Severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 in farmed mink (Neovison vison), Poland. *Emerg. Infect. Dis.* 27 (9), 2333–2339. <https://doi.org/10.3201/eid2709.210286>.
- Raimundo, J.M. (2018). Infecção por Bartonella spp. em gatos de abrigo da Região Metropolitana do Rio de Janeiro: implicações clínicas, hematológicas e fatores associados [Tese de doutorado, Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro]. <https://tede.ufrj.br/jspui/bitstream/jspui/4833/2/2018%20-%20Juliana%20Macedo%20Raimundo.pdf>.
- Raimundo, J.M., Guimarães, A., Amaro, G.M., da Silva, A.T., Botelho, C.F.M., Massard, C. L., Baldani, C.D., 2019. Molecular survey of bartonella species in shelter cats in Rio De Janeiro: clinical, hematological, and risk factors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 100 (6), 1321–1327. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0585>.
- Raimundo, J.M., Guimarães, A., Amaro, G.M., Silva, A.T.D., Rodrigues, C.J.B.C., Santos, H.A., Baldani, C.D., 2022. Prevalence of Bartonella species in shelter cats and their ectoparasites in southeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 31 (1), e014221 <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022006>.
- Rivetti Júnior, Anselmo Vasconcelos, 2006. Retrovírus, Toxoplasma gondii e Mycoplasma haemofelis em gatos errantes e felinos selvagens do Zoológico de Belo Horizonte-MG. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária. Belo Horizonte-MG. https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/SSLA-71XNDW/1/disserta_o_anselmo_rivetti.pdf.
- Santos, C.M., Toniai, A., Duarte, V., Favacho, A., Ferreira, E., Aquino, D., 2018. Exposure of felines to infectious agents of zoonotic interest. Molecular analysis in cats from Campo Grande, MS, Brazil. *Braz. J. Anim. Environ. Res.* 1 (1), 115–124. ISSN 2595-573X. https://www.researchgate.net/publication/329758164_Exposure_of_felines_to_infectious_agents_of_zoonotic_interest_Molecular_analysis_in_cats_from_Campo_Grande_MS_Brazil#fullTextFileContent.
- Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H.D., Presber, W., Jaffe, C.L., 2003. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47 (1), 349–358. [https://doi.org/10.1016/s0732-8893\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/s0732-8893(03)00093-2).
- Sebastiani, M.C. (2021). Levantamento de hematógenos, ectoparasitos e soroprevalência de Toxoplasma gondii em gatos comunitários do Parque Municipal Américo Renné Giannetti de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil [Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais]. <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/52920>.
- Segalés, J., Puig, M., Rodon, J., Avila-Nieto, C., Carrillo, J., Cantero, G., Terrón, M.T., Cruz, S., Parera, M., Noguera-Julán, M., Izquierdo-Useros, N., Guallar, V., Vidal, E., Valencia, A., Blanco, I., Blanco, J., Clotet, B., Vergara-Alert, J., 2020. Detection of SARS-CoV-2 in a cat owned by a COVID-19-affected patient in Spain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117 (40), 24790–24793. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010817117>.
- Sharun, K., Dhama, K., Pawde, A.M., Gortázar, C., Tiwari, R., Bonilla-Aldana, D.K., Rodriguez-Morales, A.J., de la Fuente, J., Michalak, I., Attia, Y.A., 2021. SARS-CoV-2 in animals: potential for unknown reservoir hosts and public health implications. *Vet. Q.* 41 (1), 181–201. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1921311>.
- Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., Chen, H., Bu, Z., 2020. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science* 368 (6494), 1016–1020. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>.
- Silaghi, C., Knaus, M., Rapti, D., Kusi, I., Shukullari, E., Hamel, D., Pfister, K., Rehbein, S., 2014. Survey of Toxoplasma gondii and Neospora caninum, haemotropic mycoplasmas and other arthropod-borne pathogens in cats from Albania. *Parasit Vectors* 7, 62. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-62>.
- Sobrinho, L.S., Rossi, C.N., Vides, J.P., Braga, E.T., Gomes, A.A., de Lima, V.M., Perri, S. H., Generoso, D., Langoni, H., Leutenegger, C., Biondo, A.W., Laurenti, M.D., Marcondes, M., 2012. Coinfection of Leishmania chagasi with Toxoplasma gondii, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 187 (1–2), 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.010>.
- Sott, M.K., Bender, M.S., da Silva Baum, K., 2022. Covid-19 outbreak in Brazil: health, social, political, and economic implications. *Int. J. Health Serv.* 52 (4), 442–454. <https://doi.org/10.1177/00207314221122658>.
- Spada, E., Canzi, I., Baggiani, L., Perego, R., Vitale, F., Migliazzo, A., Proverbio, D., 2016. Prevalence of Leishmania infantum and co-infections in stray cats in northern Italy. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 45, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.03.001>.
- Spada, E., Vitale, F., Bruno, F., Castellì, G., Reale, S., Perego, R., Baggiani, L., Proverbio, D., 2021. A pre- and during pandemic survey of SARS-CoV-2 infection in stray colony and shelter cats from a high endemic area of Northern Italy. *Viruses* 13 (4), 618. <https://doi.org/10.3390/v13040618>.
- Tan, C.C.S., Lam, S.D., Richard, D., et al., 2022. Transmission of SARS-CoV-2 from humans to animals and potential host adaptation. *Nat. Commun.* 13, 2988. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30698-6>.
- Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., Giandhari, J., et al., 2021. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* 592, 438–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9>.
- Teixeira, B.M., Rajão, D.S., Haddad, J.P.A., Leite, R.C., Reis, J.K.P., 2007. Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 59 (4), 939–942. <https://doi.org/10.1590/S1510-09352007000400019>.
- Torrejón, E., Sanches, G.S., Moerbeck, L., Santos, L., André, M.R., Domingos, A., Antunes, S., 2022. Molecular survey of bartonella species in stray cats and dogs, humans, and questing ticks from Portugal. *Pathogens* 11 (7), 749. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070749>.
- van Aart, A.E., Velkers, F.C., Fischer, E.A.J., Broens, E.M., Egberink, H., Zhao, S., Engelsma, M., Hakze-van der Honing, R.W., Harders, F., de Rooij, M.M.T., Radstake, C., Meijer, P.A., Oude Munnink, B.B., de Rond, J., Sikkema, R.S., van der Spek, A.N., Spierenburg, M., Wolters, W.J., Molenaar, R.J., Koopmans, M.P.G., Smit, L.A.M., 2022. SARS-CoV-2 infection in cats and dogs in infected mink farms. *Transbound. Emerg. Dis.* 69 (5), 3001–3007. <https://doi.org/10.1111/tbed.14173>.
- Viana, R., Moyo, S., Amoako, D.G., Tegally, H., Scheepers, C., Althaus, C.L., et al., 2022. Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. *Nature* 603, 679–686. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04411-y>.
- 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. *J. Clin. Microbiol.* 58 (2) <https://doi.org/10.1128/JCM.01233-19> e01233-19.
- Vieira-Damiani, G., Diniz, P.P., Pitassi, L.H., Sow, S., Scorpio, D.G., Lania, B.G., Drummond, M.R., Soares, T.C., Barjas-Castro, M.de, Breitschwerdt, E.B., Nicholson, W.L., Velho, P.E., 2015. Bartonella clarridgeiae bacteremia detected in an asymptomatic blood donor. *J. Clin. Microbiol.* 53 (1), 352–356. <https://doi.org/10.1128/JCM.00934-14>.
- 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., Ruiz, H., Lacasta, D.M., Sánchez, L., Marteles, D., Gracia, A.P., Fernández, A., 2022. Serological evidence of SARS-CoV-2 and co-infections in stray cats in Spain. *Transbound Emerg. Dis.* 69 (3), 1056–1064. <https://doi.org/10.1111/tbed.14062>.
- Vitor, R.W., Ferreira, A.M., Fux, B., 1999. Antibody response in goats experimentally infected with Toxoplasma gondii. *Veter. Parasitol.* 81 (3), 259–263. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(98\)00251-9](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00251-9).
- Volz, E., Mishra, S., Chand, M., Barrett, J.C., Johnson, R., Geidelberg, L., et al., 2021. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature* 593, 266–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03470-x>.
- Watanabe, M., Hisasue, M., Souma, T., OHSHIRO, S., YAMADA, T., TSUCHIYA, R., 2008. Molecular detection of Mycoplasma haemofelis and "Candidatus Mycoplasma haemominutum" infection in cats by direct PCR using whole blood without DNA extraction. *J. Vet. Med. Sci.* 70 (10), 1095–1099. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.1095>.
- World Health Organisation. (2023, April 13). Coronavirus disease (COVID-19) weekly epidemiological update on COVID-19 - 13 April 2023, Edition 138 | emergency situational updates. Accessed 14 July 2023. <https://covid19.who.int/>.
- World Health Organization (WHO). (2023). Weekly epidemiological update on COVID-19 - 6 July 2023. Retrieved from <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19-6-july-2023>.
- World Health Organization. (2021). COVID-19 weekly epidemiological update 48. (p. 1–16). Retrieved from Weekly Epidemiological Update 48 <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19-1-3-july-2021> Consultado: 14.11.2022.
- 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., 2020. A serological survey of SARS-CoV-2 in cat in Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.* 9 (1), 2013–2019. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1817796>.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G.F., Tan, W., China Novel Coronavirus Investigating and Research Team, 2020. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382 (8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.

Tabela Suplementar 1: Métricas do sequenciamento genômico das amostras positivas para SARS-CoV-2 nos gatos do PqMARG.

Amostra	Número de leituras brutas	Número de leituras filtradas	Número de leituras não pareadas	Número de leituras mapeadas	Eficiência	Profundidade média	Cobertura 10x	Cobertura 100x	Cobertura 1000x	Cobertura genômica	Pango classificação	Next clade	Clado	GISAIID número de acesso	Data de coleta
14a-GP21	295904	218034	19965	2313	781.672	112.997	231.616	194.295	0	616.293	NA	AY.9.9.2	21J	EPI_ISL_17700575	12/05/2021
16a-GP37	626292	364520	26918	4910	783.979	238.275	303.481	589.239	0	626.526	NA	AY.9.9.2	21J	EPI_ISL_17700574	14/05/2021
17a-GP49	599144	459586	29972	170196	284.065	827.735	822.058	557.235	175.869	945.156	AY.99.2	AY.9.9.2	21J	EPI_ISL_17700573	17/05/2021
18a-GP54	574552	470584	32660	114670	199.582	557.518	770.826	524.161	132.161	89.292	AY.99.2	AY.9.9.2	21J	EPI_ISL_17734311	01/06/2021

7.1.2. Resultados e discussão que não constam no artigo publicado

7.1.2.1. Diagnóstico molecular de hemopatógenos

As 78 amostras foram submetidas à PCR para diversos hemopatógenos. O Gráfico 3 apresenta o número de animais que testaram positivo para cada patógeno específico. O Anexo 8 identifica os gatos provenientes do Parque Municipal Américo Rene Giannetti, Belo Horizonte, Minas Gerais, detalhando o número de identificação, data de coleta, sexo, idade e positividade molecular para patógenos transmitidos por vetores. Dos animais testados, 51,3% (40/78) foram positivos para pelo menos um dos patógenos, 34,6% (27/78) testaram positivo para mais de um patógeno, e 14,1% (11/78) não apresentaram positividade para nenhum dos hemopatógenos estudados neste trabalho. (Gráfico 4).

Gráfico 3– Frequências de amostras positivas para hemopatógenos detectadas por método molecular em gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, entre fevereiro e setembro de 2021.

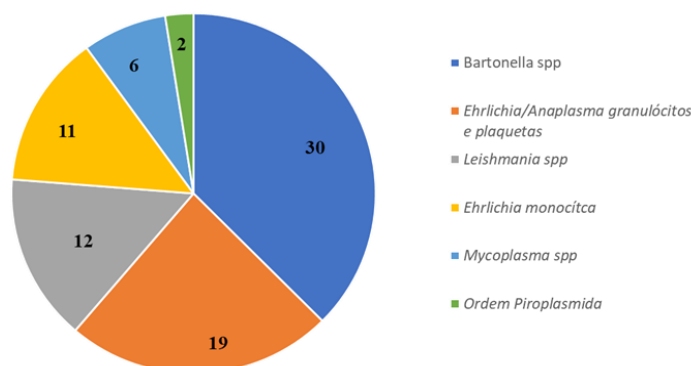
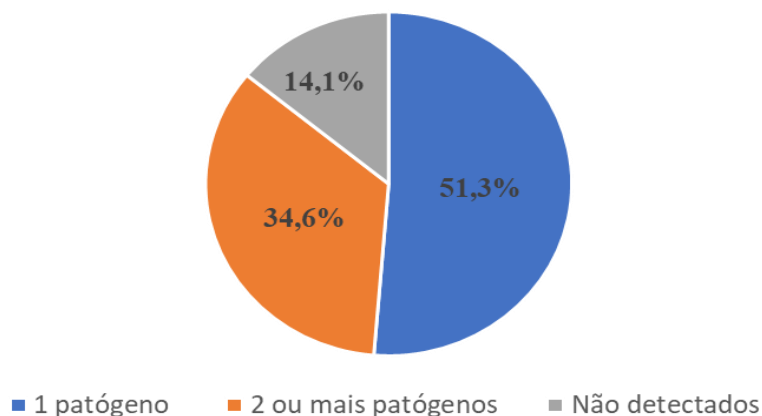


Gráfico 4– Percentual de detecção de um patógeno, dois ou mais patógenos e não detectados em gatos provenientes do Parque Municipal Américo Rene Giannetti, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, Fev-Set/2021.



A análise das 78 amostras de sangue de gatos domésticos do PqMARG revelou a presença de bactérias pertencentes à família Anaplasmataceae. Observou-se que 14,1% (11/78) das amostras foram positivas para *Ehrlichia monocítica*, das quais 2,7% (2/78) amostras também apresentaram positividade para *Ehrlichia canis* (Tabela 8). Além disso, 24,4% (19/78) das amostras mostraram resultados positivos para *Ehrlichia/Anaplasma* em granulócitos e plaquetas, com 3,8% (3/78) animais positivos para *A. platys* e nenhuma positividade para *A. phagocytophylum* (Tabela 8). As Figuras 16 e 17 ilustram alguns dos resultados obtidos na PCR.

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por nested PCR para *Ehrlichia monocítica*. Linha 1: Padrão de tamanho molecular de 1kb (Kasvi); Coluna 2: controle positivo *Ehrlichia canis*; Colunas 2 a 13: amostras de gatos do PqMARG; Colunas 7 e 12: amostra com formação de banda na altura do fragmento esperado (443 pb); Coluna 14: controle negativo da reação, água livre de nucleasse.

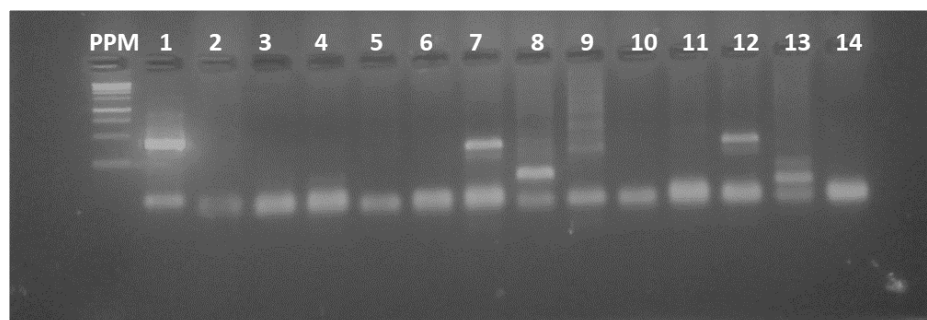
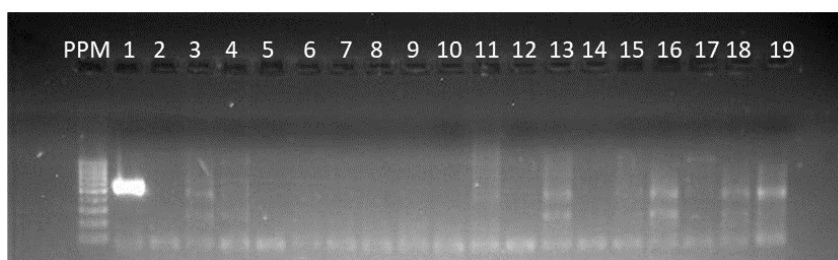


Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por nested PCR para *Ehrlichia granulocítica* e plaquetas. Linea 1: Padrão de tamanho molecular de 100pb (Cellco); Coluna 2: controle positivo *Anaplasma phagophytophyllum*; Coluna 2: controle negativo da reação, água livre de nucleasse; Colunas 3 a 19: amostras de gatos do PqMARG; Coluna 3, 11, 13,16,18 e 19: amostra com formação de banda na altura do fragmento esperado (~546 pb).



Para detectar piroplasmídeos, utilizamos um *primer* genérico que pode identificar infecções por espécies de *Babesia*, *Cytauxzoon* e *Theileria*. De um total de 78 animais testados, dois foram positivos, o que corresponde a 2,6% do total. No entanto, apesar dos esforços para sequenciar essas amostras positivas, não obtivemos sucesso na obtenção de sequências utilizáveis (Tabela 8). A Figura 18 apresenta alguns dos resultados obtidos.

Figura 18- Eletroforeses em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por nested PCR para ordem Piroplasmida. Linea 1: Padrão de tamanho molecular de 100 bp (Cellco); Coluna 2: controle positivo; Colunas 2 a 19: amostras de gatos do PqMARG; Coluna 16: amostra com formação de banda na altura do fragmento esperado (430pb); Colunas: 20: controle negativo da reação, água livre de nucleasse.

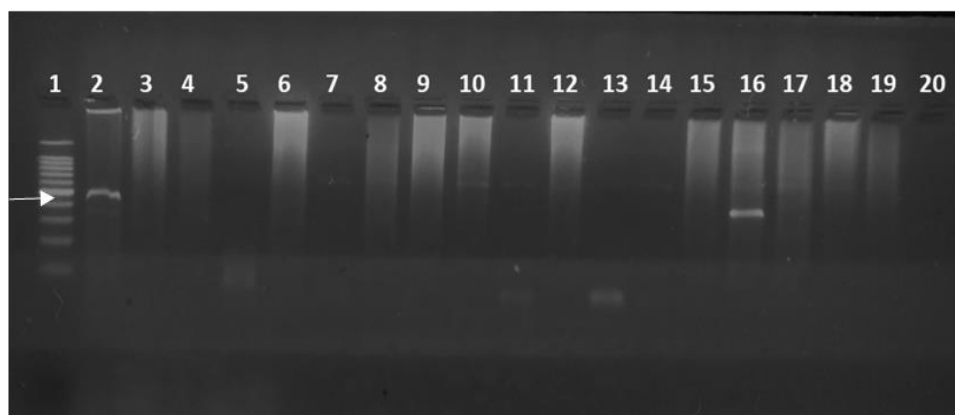


Tabela 8- Frequência de patógenos detectados em gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti, Belo Horizonte, MG, tendo em conta uma amostra total de 78 gatos, recolhida no período compreendido entre fevereiro e setembro 2021

Patógeno	Número de animais positivos	%
<i>Ehrlichia monocítica</i>	11	14,1
<i>Anaplasma/Ehrlichia granulócitos e plaquetas</i>	19	24,4
<i>Anaplasma platys</i>	3	3,8
Micoplasmas hemotrópicos	6	7,7
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	1	1,28
‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’	5	6,41
<i>Bartonella</i> spp	30	38,5
<i>Bartonella henselae</i>	23	29,5
<i>Bartonella clarridgeiae</i>	7	9
Piroplasma	2	2,6
<i>Toxoplasma gondii</i>	18	23,1
<i>Leishmania</i> spp.	12	15,4
<i>L. infantum</i>	11	14,1

Os gatos apresentaram evidências de infecção por dois dos patógenos pesquisados. As combinações encontradas foram: GP63, com *Anaplasma/Ehrlichia* em granulócitos e plaquetas + *Piroplasma*, e GP77, com *Anaplasma/Ehrlichia* em granulócitos e plaquetas + *Ehrlichia* monocítica (Anexo 8).

Quanto às coinfeções detectadas nos gatos do Parque Municipal, foi identificada uma associação significativa entre a infecção por SARS-CoV-2 e a presença de pelo menos um hemopatógeno ($p = 0,032$) (Tabela 9). No entanto, as análises estatísticas não mostraram associações significativas entre as demais variáveis listadas na tabela.

Tabela 9- Associações estatísticas entre a infecção por SARS-CoV-2 e outros patógenos em gatos do Parque Municipal Américo Renné Giannetti (PqMARG).

Gatos PqMARG		
Fator	Valor P	Valor P
	SARS-CoV-2 positividade	Hemopatógenos positividade
<i>E. monocítica</i> positivo	0.586	-
AEGP positivo	0.327	-
Piroplasmas positivo	0.149	-
Hemopatógenos	0.032	-

Associações com valor de $P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.
AEGP: *Anaplasma/Ehrlichia* sp. granulócitos/plaquetas

7.1.3. DISCUSSÃO

Dada a localização do PqMARG na região central de Belo Horizonte e sua proximidade com centros de saúde e áreas comerciais, que atraem um grande número de pessoas, além de ser uma área recreativa significativa para os moradores locais e turistas de diversas regiões do Brasil e do exterior, é essencial realizar estudos de monitoramento de patógenos, incluindo vírus, bactérias, fungos e parasitos, nos animais que habitam o local. Tais estudos são cruciais para

fornecer informações relevantes sobre o risco de infecções potenciais para a população humana (Carvalho, 2018; Sebastiani, 2021).

Nos 56 gatos em que o VG foi determinado, 30,4% (17/56) apresentaram valores abaixo dos parâmetros de referência. Embora a maioria dos gatos 69,6% (39/56) tenha mostrado VG dentro do intervalo normal (24-45%), a presença de VG baixo é relevante, pois pode estar associada a diversas condições, como anemia, perda excessiva de sangue, doença renal, deficiência de ferro e de proteínas ou sepse (Lee *et al.*, 2023). Observou-se que 25% (14/56) dos gatos com níveis baixos de VG estavam infectados por hemopatógenos, Resultado semelhante ao encontrado no presente estudo foi relatado em gatos atendidos em um hospital veterinário em Brasília, 10,33% da população analisada apresentou anemia, com a maioria dos casos (32%) atribuídos a doenças infecciosas (Araújo, 2017). Embora 25% dos gatos com níveis baixos de VG estivessem infectados por hemopatógenos, não foi observada uma associação estatisticamente significativa entre a presença desses agentes infecciosos e os valores de VG obtidos.

Além dos micoplasmas hemotrópicos, há uma escassez de estudos sobre a presença de patógenos transmitidos por vetores em felinos no Brasil. Trabalhos anteriores, assim como este, destacam a circulação desses agentes em felinos e a maior vulnerabilidade de gatos errantes e semi-domiciliados à exposição a ectoparasitos e aos patógenos que eles transmitem (LOBETTI & LAPPIN, 2012; SILAGHI *et al.*, 2014; ANDRÉ *et al.*, 2017; PERSICHETTI *et al.*, 2018). O avanço das técnicas de biologia molecular tem sido fundamental para identificar novas espécies ou cepas de patógenos, ampliando assim as perspectivas para a pesquisa de infecções menos estudadas na medicina felina (ALLISON & LITTLE, 2013).

Os diagnósticos eventuais de patógenos transmitidos por carrapatos em felinos podem ser atribuídos a vários fatores: a menor divulgação desses agentes para felinos em comparação aos cães, levando a diagnósticos subnotificados; a menor patogenicidade desses agentes em felinos; a remoção rápida dos carrapatos devido ao comportamento de limpeza dos gatos, o que reduz a chance de transmissão; e a falta de diagnósticos confiáveis que confirmem os casos (Breitschwerdt *et al.*, 2002).

A presença de *Ehrlichia* monocítica foi confirmada em 14,1% das amostras, sendo que a infecção por *E. canis* foi confirmada em 2,7% dos gatos através de testes moleculares específicos. Esses resultados são consistentes com estudos anteriores que documentaram a prevalência dessas

bactérias em felinos domésticos, indicando que essas infecções são comuns em gatos, apesar de a maioria das pesquisas ter se concentrado em cães (Ayllón *et al.*, 2012; Braga *et al.*, 2014). Por exemplo, um estudo no Brasil encontrou DNA de *E. canis* em amostras de gatos, com 9,4% dos gatos testados sendo positivos por PCR (Braga *et al.*, 2014). Mazzotti *et al.* (2018) detectaram DNA de *E. canis* em 5,8% (2/34) das amostras de felídeos selvagens cativos no Distrito Federal e Goiás. Mais recentemente, Braga *et al.* (2021) observaram gatos naturalmente expostos à *E. canis*, sugerindo a possível existência de um novo genótipo de *E. canis* infectando felinos, o que reforça a importância dessas infecções nas populações felinas. É importante ressaltar que a menor taxa de detecção de *E. canis* pode estar relacionada à menor sensibilidade do teste específico em comparação ao teste para *Ehrlichia monocítica*.

A detecção de 14,1% das amostras positivas para *Ehrlichia monocítica*, em contraste com apenas 2,6% positivas para *E. canis*, pode ser explicada pela presença de outras espécies de *Ehrlichia*, como *E. chaffeensis*, que também pode infectar gatos e já foi relatada no Brasil (Braga *et al.*, 2012; Hegarty *et al.*, 2015). Resultados semelhantes foram encontrados em gatos no Maranhão, onde apenas 1% (2/200) apresentaram positividade para *E. canis* (Braga *et al.*, 2012), e em gatos domiciliados e atendidos em clínicas particulares no estado do Rio de Janeiro, com uma taxa de 1,4% (Guimarães *et al.*, 2019).

Na PCR genérica para AEGP, foi observada uma alta positividade, com 24,4% (19/78) dos animais testados apresentando resultados positivos. Essa prevalência é significativa e condiz com os altos índices encontrados em outros estudos, como o de Spada *et al.* (2014), que relatou no norte da Itália, uma frequência de 17,7% de infecção por *A. phagocytophilum* em gatos. No Brasil, Pinto *et al.* (2018) observaram uma frequência de 33,33% de agentes Anaplamastaceae em gatos no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

Em contraste, a detecção de *A. platys* foi observada em apenas 2,6% (2/78) dos animais. Embora essa taxa seja relativamente baixa, ainda é relevante, uma vez que *A. platys* é conhecido por causar trombocitopenia cíclica em cães, o que sugere um possível risco similar para a saúde felina (Lima, 2022). Por outro lado, a ausência de *A. phagocytophilum* não é surpreendente no Brasil, especialmente quando comparada a estudos em outras regiões do mundo onde este patógeno é mais prevalente (Schäfer *et al.*, 2021). Resultados semelhantes foram encontrados por Guimarães *et al.* (2019) em gatos domésticos no estado do Rio de Janeiro, onde a frequência de *A. platys* foi

de 3,7% (8/216) por *gltA*-qPCR e 0,9% (2/216) por 16S-rDNA nested-PCR, com ausência de *A. phagocytophilum* na *msh2*-qPCR. Adicionalmente, um estudo realizado por Sebastiani (2021) com amostras de sangue de gatos do mesmo local deste estudo encontrou resultados semelhantes, com *A. platys* apresentando a maior frequência (37,3%) entre os agentes da família Anaplasmataceae de granulócitos e plaquetas, mas nenhuma amostra foi positiva para *A. phagocytophilum* na PCR específica. A autora, porém, enfatiza a importância de continuar com os trabalhos de monitoramento e investigação dos prováveis vetores reservatórios, considerando que *A. phagocytophilum* já foi detectado em carrapatos e cães residentes na cidade de Belo Horizonte, MG (Santos *et al.*, 2013; Silveira *et al.*, 2015; Silveira *et al.*, 2017).

Na PCR genérica para organismos da ordem Piroplasmida, foram detectados 2,6% (2/78) animais positivos, porém, em nenhuma obteve-se sucesso no sequenciamento nucleotídico. É relevante destacar que os iniciadores utilizados nesta reação são direcionados a uma sequência parcial do gene 18S rRNA, uma região conhecida por sua estabilidade entre piroplasmídeos próximos filogeneticamente, como *Cytauxzoon* spp., *Babesia* spp. e *Theileria* spp., além de detectar outros membros do filo Apicomplexa, como *Sarcocystis* e *Hepatozoon* (ZÄHLER *et al.*, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2011). Futuramente, serão realizadas novas tentativas de sequenciamento nucleotídico, e a utilização de iniciadores específicos para diferentes alvos moleculares.

A baixa prevalência de piroplasmídeos relatada neste estudo está alinhada com outros estudos. Palmer *et al.* (2022) encontraram uma prevalência de 2,7% (7/250) em gatos tratados em uma clínica particular no Rio de Janeiro, com *B. vogeli* identificado em seis gatos e *Cytauxzoon* sp. em um gato. Este resultado é semelhante ao observado neste estudo. Wu *et al.* (2023) relataram uma prevalência de 4,27% em gatos de estimação examinados em um hospital em Guiyang, China. No entanto, ao comparar com o estudo de Oliveira *et al.* (2022), que observou uma prevalência significativamente maior de piroplasmídeos (21,7%), a discrepância pode ser atribuída à metodologia utilizada. Oliveira *et al.* se basearam na qPCR para o gene mitocondrial LSU4, uma técnica altamente sensível e específica, que pode ter contribuído para uma maior taxa de detecção. Além disso, Sebastiani (2021) encontrou uma taxa de prevalência bem maior (27,9%) em gatos do mesmo local do nosso estudo, utilizando amostras coletadas entre 2015 e 2018. Desses, 2,4% foram positivos para *C. felis*. Essa diferença pode ser atribuída ao maior número de amostras analisadas

por Sebastiani, o que pode aumentar a probabilidade de detectar uma maior prevalência de piroplasmídeos (Faber, Fonseca, 2014).

As análises estatísticas realizadas no estudo, revelaram uma associação significativa entre a infecção por SARS-CoV-2 e a presença de pelo menos um hemopatógeno ($p = 0,032$) em gatos de rua no parque municipal de Belo Horizonte, alinhando-se com os achados de Villanueva-Saz *et al.* (2022, 2023). Villanueva-Saz *et al.* (2022) observaram que gatos soropositivos para SARS-CoV-2 também eram soropositivos para outros patógenos, como *T. gondii*, FIV e *L. infantum*, sugerindo uma possível relação entre imunossupressão e susceptibilidade ao SARS-CoV-2. Em 2023, o mesmo grupo encontrou uma soropositividade de 1,57% para SARS-CoV-2 em gatos de rua em Zaragoza, Espanha, com coinfeções por patógenos como *L. infantum* e *Dirofilaria immitis*, estabelecendo uma associação significativa com *L. infantum* ($p = 0,018$).

A associação observada neste estudo entre SARS-CoV-2 e hemopatógenos pode indicar que a imunossupressão causada por hemopatógenos aumenta a vulnerabilidade dos gatos ao SARS-CoV-2 (Corey *et al.*, 2021; Höft *et al.*, 2024). Além disso, a alta densidade populacional e as condições de vida em áreas urbanas podem facilitar a disseminação de múltiplos patógenos (Esposito *et al.*, 2023).

Este estudo contribuiu significativamente para o entendimento da prevalência de diversos hemopatógenos em gatos na região estudada. Além dos piroplasmídeos, detectamos a presença de *E. canis*, e *A. platys*, enquanto *A. phagocytophilum* não foi detectado. Enfrentamos dificuldades no sequenciamento de algumas amostras, resultando em PCRs genéricas positivas, mas sem definição específica. Recomenda-se que futuros estudos ampliem o número de amostras e considerem fatores temporais e geográficos para uma análise mais abrangente. Além disso, a implementação de técnicas avançadas de diagnóstico pode melhorar a detecção de infecções por hemopatógenos, contribuindo para a saúde e bem-estar dos animais de estimação. A utilização de metodologias sensíveis e específicas, como a qPCR, é essencial para a detecção precisa desses parasitos.

8. RESULTADOS: CAPÍTULO 3

8.1. Resultados dos mamíferos cativos pertencentes ao Jardim Zoológico da FPMZB-BH

No presente capítulo, apresentamos uma investigação detalhada sobre a presença de SARS-CoV-2 e coinfeções parasitárias em mamíferos do Jardim Zoológico da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZB-BH). Este epígrafe está dividido em dois artigos científicos, cada um abordando aspectos específicos dos resultados encontrados. Além disso, foram apresentados resultados e discussões adicionais que não foram incluídos nos artigos mencionados, proporcionando uma visão mais abrangente e detalhada do estudo realizado.

Artigos Científicos

Artigo 1: SARS-CoV-2 surveillance in captive animals at the Belo Horizonte Zoo, Minas Gerais, Brazil. Revista *Virology Journal*

Artigo 2: Parasitic Protozoa and Other Vector-Borne Pathogens in Captive Mammals from Brazil. Revista *Journal of Zoological and Botanical Gardens*

Além de outros resultados que não constam nos artigos foram também apresentados, além de um tópico de considerações gerais.

8.1.1. Características da população estudada

No âmbito deste trabalho, foram testadas amostras de 52 indivíduos da Classe Mammalia pertencentes ao plantel da FPMZB, de acordo com a necessidade de manejo dos mesmos, durante o período compreendido de novembro 2021 a março 2023. Deles, 31 machos e 21 fêmeas, 40 animais amostrados com sangue total, 47 animais com swabe oral e retal e 34 animais com swabe nasal, sendo que em na maioria dos animais obtivemos mais de uma amostra biológica diferente. Os animais em estudo formaram um grupo bastante heterogêneo devido à diversidade de espécies encontradas no zoológico que pertenciam a diferentes ordens e famílias, sendo que os mais representativos foram: 50% (26/52) da Ordem Primata, 30,8% (16/52) da Ordem Carnívora, 13,5% (7/52) da Ordem Artiodactyla, 15,4% (8/52) da Família Felidae, 13,4% (7/52) da Família Canidae e 9,6% (5/52) da Família Cervidae (Anexo 9).

- 8.1.2. Artigo 1 aceito para publicação na revista *Virology Journal* (in press). Vigilância do SARS-CoV-2 em animais cativos no Zoológico de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Castillo et al. *Virology Journal* (2024) 21:297
<https://doi.org/10.1186/s12985-024-02505-9>

Virology Journal

RESEARCH

Open Access



SARS-CoV-2 surveillance in captive animals at the belo horizonte zoo, Minas Gerais, Brazil

Anisleidy Pérez Castillo^{1,4}, João Victor Oliveira Miranda³, Paula Luíze Camargos Fonseca³, Rennan Garcias Moreira⁵, Luíza Campos Guerra de Araújo e Santos³, Daniel Costa Queiroz³, Diego Menezes Bonfim³, Carlyle Mendes Coelho², Paula Cristina Senra Lima², Rafael Otávio Cançado Motta², Herlandes Penha Tinoco², Júlia Angélica Gonçalves da Silveira^{4*} and Renato Santana Aguiar^{3*}

Abstract

Background The pandemic caused by SARS-CoV-2 has not only affected humans but also raised concerns about its transmission to wild animals, potentially creating natural reservoirs. Understanding these dynamics is critical for preventing future pandemics and developing control strategies. This study aims to investigate the presence of SARS-CoV-2 in wild mammals at the Belo Horizonte Zoo in Brazil, analyzing the virus's evolution and zoonotic potential.

Methods The study was conducted at the Belo Horizonte Zoo, Minas Gerais, Brazil, covering a diverse population of mammals. Oropharyngeal, rectal, and nasal swabs were collected from 47 captive animals between November 2021 and March 2023. SARS-CoV-2 presence was determined using RT-PCR, and positive samples were sequenced for phylogenetic analysis. Consensus genomes were classified using Pangolin and NextClade tools, and a maximum likelihood phylogeny was inferred using IQ-Tree.

Results Of the 47 animals tested, nine (19.1%) were positive for SARS-CoV-2. Positive samples included rectal, oropharyngeal, and nasal swabs, with the highest positivity in rectal samples. Three genomes were successfully sequenced, revealing two variants: VOC Alpha in a maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and a fallow deer (*Dama dama*), and VOC Omicron in a western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). Phylogenetic analysis indicated potential human-to-animal transmission, with animal genomes clustering close to human samples from the same region.

Conclusions This study highlights the presence of SARS-CoV-2 in various wild mammal species at the Belo Horizonte Zoo, emphasizing the virus's zoonotic potential and the complexity of interspecies transmission. The detection of different variants suggests ongoing viral evolution and adaptation in new hosts. Continuous monitoring and genomic surveillance of SARS-CoV-2 in wildlife are essential for understanding its transmission dynamics and preventing future zoonotic outbreaks. These findings underscore the need for integrated public health strategies that include wildlife monitoring to mitigate the risks posed by emerging infectious diseases.

Keywords Zoos, SARS-CoV-2, Wildlife, Mammals, Genomic analysis, Zoonotic transmission, Animal surveillance, Viral adaptation, Epidemiology

*Correspondence:

Júlia Angélica Gonçalves da Silveira

jangelicags@gmail.com

Renato Santana Aguiar

santanarnt@gmail.com

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

Introduction

The pandemic caused by SARS-CoV-2 has been a major global challenge in terms of public health and economy. Since its discovery in December 2019, the virus has rapidly spread worldwide, infecting millions of people and causing thousands of deaths [1]. Human-to-human transmission of the virus is well known, but the possibility of transmission from humans to wild animals has raised concerns about the potential formation of natural reservoirs of the virus and its risks to public health [2].

Recent studies have shown that SARS-CoV-2 infection can occur in wild, domestic and zoo animals. In various regions of the world, wild animals such as tigers, lions, monkeys, and minks have been found to be infected with SARS-CoV-2 [3, 4]. This highlights the importance of understanding the spillover mechanism and the zoonotic potential of the disease. Furthermore, comparative analysis of virus sequencing and phylogenetic assembly in humans and wild animals can provide valuable insights into the virus's evolution and its transmission between different species [5, 6].

The Belo Horizonte Zoo, located in Minas Gerais (MG), Brazil, is a site of great interest for studying SARS-CoV-2 infection in wild animals, as it has had cases of infection in some of its species. Genomic studies conducted on samples from infected animals at the zoo and in other regions of the world have shown that wild animal virus sequences differ from human virus sequences, suggesting the existence of different viral lineages circulating in different species. Additionally, indicate adaptation of the virus to the host, highlighting the complexity of the virus-host interaction [7, 8].

Understanding the dynamics of SARS-CoV-2 transmission in different species is crucial for preventing future pandemics and developing effective disease control strategies [9]. Therefore, studying SARS-CoV-2 infection in wild animals at the Belo Horizonte Zoo is highly relevant to public health and biodiversity conservation, as well as contributing to the advancement of knowledge about the relationship between SARS-CoV-2 and wild animals, and the formulation of public policies and management strategies for pandemic prevention and control.

This study aims to review the current evidence of SARS-CoV-2 infection in wild mammals at the Belo Horizonte Zoo, highlighting the zoonotic potential of the disease and the risks of natural reservoir formation in forests and wilderness areas [10, 11]. Additionally, it seeks to analyze the virus's evolution through phylogenetic and comparative sequence analysis to understand better the spillover mechanism and implications for public health [12, 13].

Materials and methods

Ethical statement

The samples used in this study were collected as part of the service provided by the Federal University of Minas Gerais (UFMG) to the Municipal Park and Zoobotanical Foundation of Belo Horizonte (FPMZB), under extension code Siex-UFMG 302557. All procedures related to animal handling, including capture and restraint, were conducted by veterinarians from the FPMZB staff, ensuring adherence to the protocols established for extension activities by UFMG.

Study area and sampling information

The present study was conducted at the FPMZB, which covers a total area of 10.7 million square meters. This foundation hosts, within its Zoo, more than 3,500 individuals, representing over 235 species, with approximately 36 species of mammals totaling 117 individuals. Among these species, over 40 are at risk of extinction, spanning reptiles, birds, fish, amphibians, and mammals from all five continents. It's worth noting that the Zoo's infrastructure includes a veterinary hospital [14].

FPMZB has a well-established history of preserving biodiversity and managing environmental protection areas in Belo Horizonte (MG) (-19.857889841, -44.0075113912). Its foundation was established through Decree 16,684 on August 31, 2017, which merged the former Municipal Parks Foundations and the Zoo-Botanical Foundation. In the context of Belo Horizonte, FPMZB plays a significant role in the conservation of local ecosystems and the research of various mammal species present in its parks and botanical gardens. Remarkably, these spaces house a variety of over a thousand species, representing the Cerrado and Atlantic Forest, biomes found in different regions of Brazil [15].

The relevance of FPMZB as a research site lies in the diversity of mammal species found in its parks, including the marsh deer (*Blastocerus dichotomus*), the black tufted marmoset (*Callithrix penicillata*), and the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), which may serve as important potential reservoirs for zoonotic pathogens, such as SARS-CoV-2 [16]. Given the global concern about interspecies transmission of the virus between humans and animals, the study investigated the role of these species in the transmission chain and sought a better understanding of the pandemic's dynamics to develop effective prevention strategies. FPMZB is the second-largest public green area in Belo Horizonte and receives over one million visitors annually.

Sample collection

Oropharyngeal, rectal, and nasal swabs were collected from 47 captive animals of the class Mammalia between

November 2021 to March 2023, with the aim of investigating SARS-CoV-2 infection in captive animals with no prior knowledge of virus exposure.

Capture and containment of the animals were carried out by the veterinary team at the FPMZB Zoo, who possess the necessary experience and knowledge to ensure the well-being and safety of the animals during the collection process, which was done after the physical and/or chemical restraint of the animals. This was done in accordance with the zoo's management schedule, and whenever containment was necessary for obtaining biological samples.

Laboratories responsible for the analysis in this study provided 1.5 ml Eppendorf tubes containing DNA/RNA Shield™ (2X Concentrate) 125 ml (ZymoResearch) for the collection of animal samples. Each collected sample was properly identified with the animal's microchip number, ensuring data traceability. After collection, the samples were stored in transport containers and subsequently in -80 °C freezers at the Laboratory of Integrative Biology (ICB/UFMG) to maintain their integrity and viability.

Real-time PCR

Viral RNA was extracted from swab samples (rectal, oropharyngeal, and nasal) using the PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™, MA, USA), following the manufacturer's protocol.

RNA samples were tested for the presence of SARS-CoV-2 using the CDC 2019-Novel Coronavirus Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel (N1, N2) [17]. These tests were performed using the iTaq™ Universal Probes One-Step (Bio-RAD™, CA, USA), following the manufacturer's instructions. The diagnosis was carried out by RT-PCR following the CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel protocol.

Sequencing and assembly of SARS-CoV-2 genomes

The samples underwent a concentration and purification process using the RNA Clean & Concentrator™-5 kit (Zymo Research™, CA, USA) to concentrate the amount of viral RNA and eliminate potential contaminants. The cDNA was synthesized using the SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific™, MA, USA).

Sequencing libraries were prepared using the xGen™ SARSCoV-2 Amplicon Panel xGen SARS-CoV-2 S Gene Amplicon Panel (Integrated DNA Technologies™, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Multiplex PCR was used to enrich the target sequences, as the samples had a $Ct > 30$.

After library preparation, samples were quantified using the Invitrogen™ Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo

Fisher Scientific™, MA, USA), and 10 samples were selected to continue the sequencing process. The genomes were sequenced on the MiSeq platform (Illumina™, San Diego, CA, USA) with v3 cartridges (600 cycles) following the manufacturer's instructions. After sequencing, the raw data were used to a custom pipeline optimized for viral genome assembly, following the same protocol described in Moreira et al., 2021 [18].

Briefly, the reads were filtered by quality Phred > 30, the remaining reads were aligned to the reference genome of SARS-CoV-2 (GenBank accession number NC_045512.2) using Bowtie2 [19], and consensus sequences were generated using BEDtools [20] and BCFtools [21]. Sequences that had the expected sequencing quality parameters (coverage greater than or equal to 60% of the genome) were used in our study.

Lineage classification and phylogenetic analysis

The consensus genomes generated were classified using the Pangolin tools [22] and the NextClade web application v2.8.1 [23]. After classification, we constructed a dataset based on human sequences for each of the VOCs (Alpha—190, Beta—13, Zeta—150, Gamma—40, Delta—116, and Omicron—150) from Belo Horizonte (MG) and animal genomes ($n=220$; identified all around the world) publicly available in public databases, plus the genomes generated in the study ($n=03$). The dataset was aligned using the minimap2 program v2.2.24 [24] and then used to infer a maximum likelihood phylogeny using the program IQ-Tree v2.0.3 and the evolutionary model GTR+I+G4 [25]. Shimodaira-Hasegawa-like approximate likelihood ratio test (SH-aLRT) was used to calculate the branch uncertainty in the phylogeny.

Results

Characteristics of the study population

Total group studied exhibited heterogeneity, with representation from animals of different orders and families. The most common and representative categories were as follows: 48.9% (23/47) from the Primate order, 14.89% (7/47) from the Artiodactyla order, in which 71.43% (5/7) from the Cervidae family and 34% (16/47) from the Carnivora order, such as 43.75% (7/16) from the Canidae family and 50% (8/16) from the Felidae family. Most of the animals were adults—95.7% (45/47) and 4.3% (2/47) were cubs, with 18 females (38.2%) and 29 males (61.8%) (Fig. 1).

Detection of SARS-CoV-2 infection

Out of the 47 mammals examined, the presence of SARS-CoV-2 RNA was identified in nine of them, resulting in a positivity rate of 19.1%. Among the 147 collected swab samples, SARS-CoV-2 RNA was found

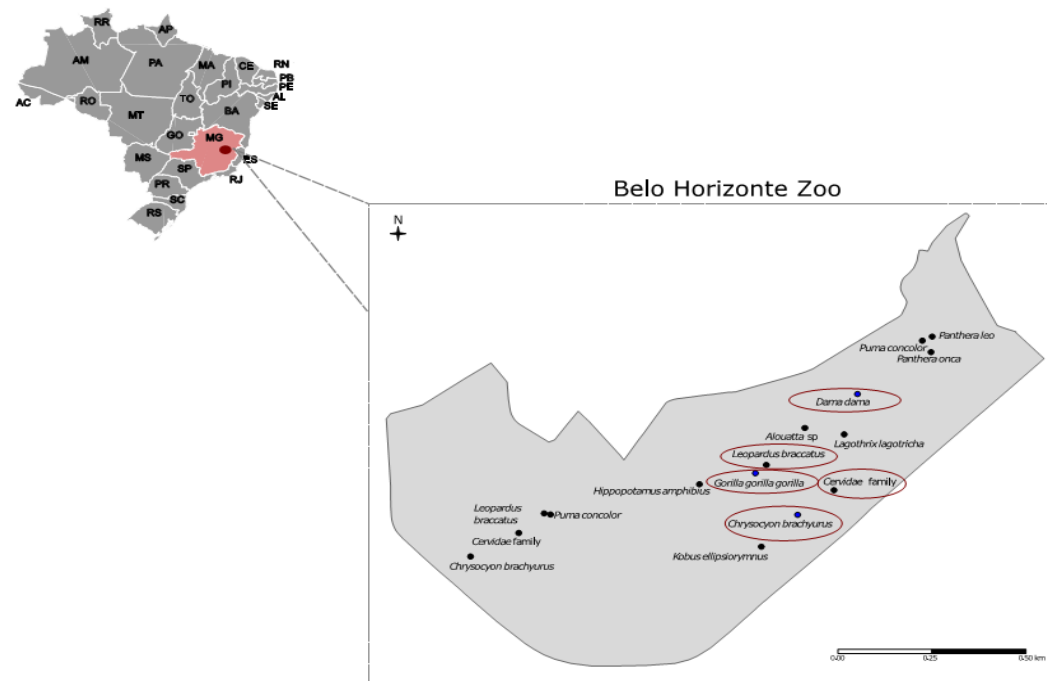


Fig. 1 Map of the Belo Horizonte Zoo. Black dots denote the locations of the cages, each identified with the lowest taxonomic classification among the individuals housed within. Red circles mark cages where animals tested positive for RT-PCR, while blue points indicate successfully sequenced animals

in five rectal samples (10.6%), three oropharyngeal samples (6.3%), and two nasal samples (5.8%). One animal (AZ16) tested positive for rectal and nasal swabs. However, during the period of March 2020 to January 2022, the zoo found itself with different levels of capacity restrictions due to security measures against the COVID-19 pandemic. During this period of time, seven animals were sampled and three animals were positive for SARS-CoV-2 (Fig. 2) (Appendix 1).

All positive samples were subjected to sequencing, but only three of them were successfully sequenced (AZ13, AZ16 nasal, and AZ17), with the sequence being detected only in the nasal swab of the fallow deer (*Dama dama*)—AZ16, the rectal swab of the maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*)—AZ13, and the oropharyngeal swab of the swab of the western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*)—AZ17 (Table 1).

Genomic characterization of positive SARS-CoV-2 samples

The three genomes sequenced in our study showed an average of 71% genome coverage. Two samples (AZ13—maned wolf and AZ16—fallow deer) were classified as VOC Alpha, while sample AZ17 (western lowland gorilla) was classified as VOC Omicron by strain classification softwares. All sequencing metrics, lineage classification, and all genomes deposited in the GISAID EpiCoV database are available in Appendix 2. To corroborate the classification, we performed a phylogenetic tree with the main variants described around the world. The result of the analysis corroborates the classification of the samples (Fig. 3). The AZ17 sample (western lowland gorilla), classified as VOC omicron, in the phylogeny is represented almost as an outgroup. This occurred since the genome coverage was less than 50%. Samples AZ13 (maned wolf) and AZ16 (fallow deer), classified as VOC Alpha, were

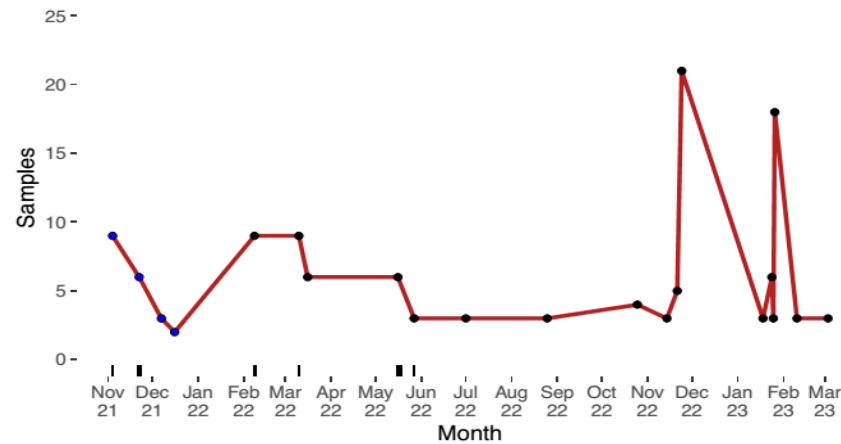


Fig. 2 Timeline of samples collected at the Belo Horizonte Zoo from November 2021 to March 2023. Blue dots represent the number and moment of sample collection from November 2021 to January 2022 when the zoo reduced visitor entry. Black dots represent the number and moment of sample collection from February 2022 to March 2023 when the zoo was open for visitors. Black bars represent the positive samples found in each collection, with one positive sample on 04/11/2021, two on 22/11/2021, two on 02/08/2022, one on 10/03/2022, three on 16/05/2022, and one on 27/05/2022

Table 1 Summary of results for SARS-CoV-2 in captive animals at the Belo Horizonte Zoo, Minas Gerais, Brazil

Animals	Species	Positive samples	Ct value	Date
AZ02	<i>Leopardus braccatus</i>	rectal swab	N1: 34 N2: 36	November/2021
AZ04	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	oropharyngeal swab	N1: 34 N2: 34	November/2021
AZ05	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	nasal swab	N1: 35 N2: 32	November/2021
AZ09	<i>Subulo gouazoubira</i>	rectal swab	N1:33 N2:37	February/2022
AZ10	<i>Cervus elaphus</i>	rectal swab	N1: 35 N2: 32	February/2022
AZ13	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	rectal swab	N1:27 N2:36	March/2022
AZ16	<i>Dama dama</i>	oropharyngeal swab nasal swab	N1:36 N2:36 N1: 29 N2: 35	May/2022
AZ17	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	oropharyngeal swab	N1:32 N2:33	May/2022
AZ18	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	rectal swab	N1: 34 N2: 36	May/2022

grouped together, indicating possible local transmission between animals. Moreover, in the phylogenetic analysis, deer sequences from other regions of the globe were included; however, the samples were grouped closer to

human samples collected in the same state, suggesting that there was possibly a transmission from humans to animals.

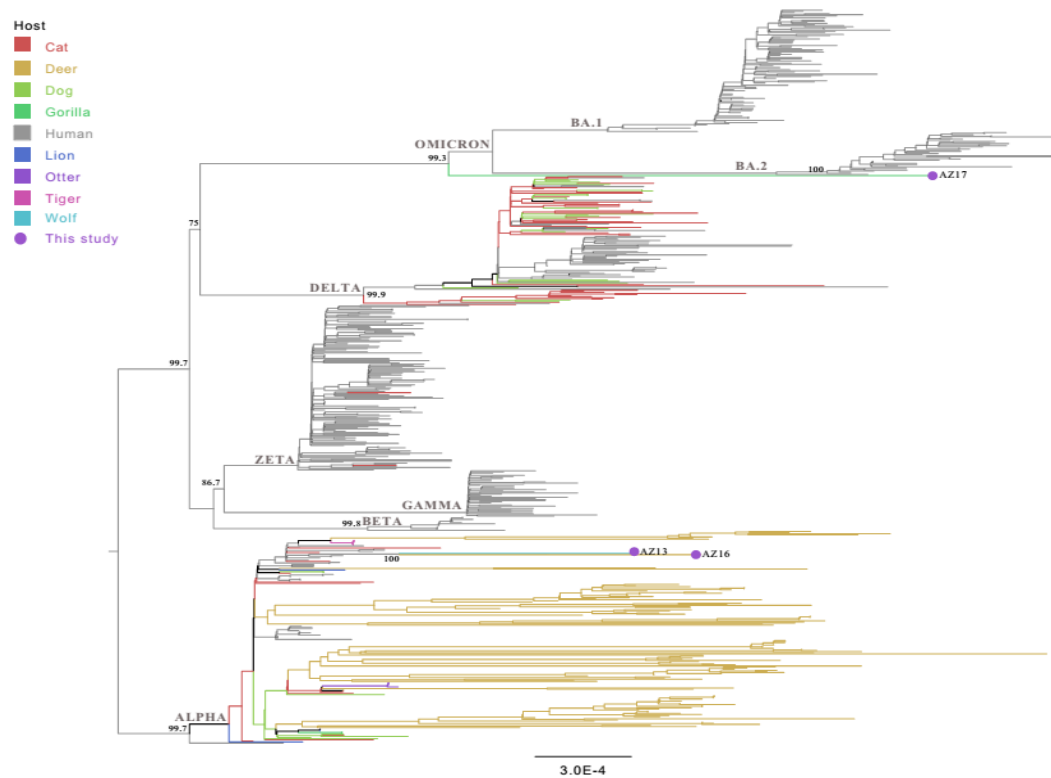


Fig. 3 Phylogenetic analysis inferred by maximum likelihood method. The tree presents three new SARS-CoV-2 animal genomes, generated in our study (AZ13, AZ16 and AZ17), 220 SARS-CoV-2 animal genomes and 530 SARS-CoV-2 human genomes public available on GISAID EpiCoV database. Each branch is filled according to the host from which it was isolated. Gray lines indicate human genomes. Purple circles represent the genomes generated in our study. Bootstrap values for the most important branches are exhibited with the lineage classification

Discussion

Zoos are unique in terms of the epidemiology of human-animal interactions. They shelter multiple species of wildlife from a wide range of taxonomic groups in relative proximity, and interactions between animals and humans are frequent, especially for animal caregivers. Therefore, the COVID-19 pandemic has triggered research for data collection and surveillance of suspected cases of SARS-CoV-2 infection in zoo animals [26]. During the initial months of this study (November 2021 to January 2022), the zoo operated with limited capacity and restricted visitor access as a pandemic control measure. Despite these precautions, three animals tested positive for the virus during this

period, suggesting that infection could have occurred through contact with zookeepers [3, 7]. However, starting in February 2022, when the zoo reopened to visitors, there was an observed increase in the detection of SARS-CoV-2-positive animals. This trend raises the possibility that increased human traffic may have heightened the risk of transmission to the keepers, who then potentially transmitted the virus to the animals via direct contact or aerosol exposure [5, 8]. Nevertheless, the limitations of our study prevent us from definitively identifying the route of infection, and further research is necessary to confirm these observations.

We detected SARS-CoV-2 RNA in nine (19.1%) of captive mammals at the zoo in Belo Horizonte, MG,

Brazil, who showed no clinical signs of infection. Our results are in contrast to the findings of a study conducted in zoos in Belgium, where no presence of SARS-CoV-2 was observed in fecal samples from a wide range of mammal species, despite systematic surveillance and specific monitoring following a known infection in hippos in December 2021 [27]. This difference in results can be attributed to various factors, including the virus's dynamics in the region, animal management practices, or differences in sample collection and detection methods [28]. Additionally, the specific dates and conditions of our study may have influenced the outcomes. This discrepancy underscores the need for more comprehensive and long-term studies to gain a better understanding of SARS-CoV-2 transmission between humans and animals, both in captivity and in the wild.

In the present study, we report natural SARS-CoV-2 infection in three western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*), two maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*), one pampas cat (*Leopardus braccatus*), one brown brocket deer (*Subulo gouazoubira*), one red deer (*Cervus elaphus*) and one fallow deer (*Dama dama*). The detected infection in these animals is consistent with previous reports of non-domestic species infected with SARS-CoV-2 in both wild, captive, and experimental settings: gorillas [29], wild canids [30], wild felids [8, 31–34] and white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) [35–37].

It is noteworthy that some of the species investigated in our study had previously been described as susceptible to SARS-CoV-2 infection, according to the World Organization for Animal Health (WOAH) [38]. For instance, gorillas (*Gorilla gorilla*) have demonstrated high susceptibility to natural infection. Furthermore, species like the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) exhibited high susceptibility in experimental infections [35]. In other studies, red foxes (*Vulpes vulpes*) were found to become infected and shed infectious virus after experimental inoculation [30].

In the context of infections in felids, although the majority of case reports of SARS-CoV-2 infection pertain to domestic cats [39], several cases in wild felids have been reported in different parts of the world. This includes members of the *Panthera* genus, such as tigers, lions, and snow leopards, as well as members of the *Puma* genus, like the puma (*Puma concolor*) [40].

Although nine animals tested positive for SARS-CoV-2, we were able to sequence samples from only three animals due to issues with the quantity and quality of the sample. Our results indicate the circulation of two variants in the studied zoo, VOCs Omicron and Alpha. The detection of positive samples classified as Alpha was described in recent studies on deer in Canada and the United States, in which they observed both

human-to-animal transmission [37, 41]. Furthermore, it was observed that despite being classified as Alpha, the genomes contain certain mutations that are specific to deer. This suggests the evolution of the virus to a different host: the deer [36–38]. The persistence of VOC Alpha in deer may be due to the long-term spread of the variant in the animal, which could lead to the emergence of new mutations [42].

In our phylogenetic analysis, it was possible to observe that two samples AZ13 (maned wolf) and AZ16 (fallow deer) were grouped together and close to samples from human hosts, suggesting that the infection was transferred from humans to animals, possibly to the caretakers of the zoo animals. Nevertheless, we did not examine SARS-CoV-2 infection in animal caretakers, which represents a limitation of the study, as it did not allow for the identification of the source of infection. Our main hypothesis suggests close-contact transmission between animals and their caretakers. Historically, all instances of natural infection in zoo animals have been linked to initial transmission from humans to the animals in their care [8, 31, 43, 44].

Zoonotic infections are common hazards for humans involved in animal welfare management, including veterinarians, zoo and reserve workers, breeders, and farmers [44]. Zoonoses represent a significant concern for public health. According to studies, approximately 60% of emerging pathogens that affect humans have their origins in animals. Furthermore, over 71% of these pathogens originate from wildlife. These pathogens have the capacity to adapt and switch hosts, acquiring new genetic combinations that can enhance their pathogenic potential. Changes in the behavior, socioeconomic, environmental, or ecological characteristics of hosts can also play a role in the transmission of these diseases [45]. Thus, the monitoring of SARS-CoV-2 infection in wild and domestic animals is important for tracking the appearance of new mutations, possible adaptation of the virus to new hosts and emergence of new lineages in circulation in that area.

Conclusions

The findings of this study underscore the significant risk posed by interspecies transmission of SARS-CoV-2, particularly in environments where humans and a diverse range of animal species are in close proximity, such as zoos. The detection of SARS-CoV-2 RNA in 19.1% of the tested mammals at the Belo Horizonte Zoo and the successful sequencing of three animal samples highlight the virus's ability to infect multiple species, potentially creating new reservoirs and facilitating viral evolution.

This research provides critical insights into the dynamics of SARS-CoV-2 transmission between humans and

animals, suggesting that close contact between zoo animals and their caretakers is a likely route of infection. The identification of different viral lineages, such as the Alpha and Omicron variants, in the zoo animals further emphasizes the importance of ongoing surveillance to understand the virus's adaptation and evolution in new hosts.

Given the zoonotic nature of many emerging infectious diseases, these findings are crucial for public health, biodiversity conservation, and the development of effective disease control strategies. Continuous monitoring and genomic analysis of SARS-CoV-2 in both wild and domestic animals are essential to track new mutations, understand the virus's host adaptation, and prevent the emergence of new variants that could pose additional risks to human health.

Overall, this study provides valuable data for the global understanding of SARS-CoV-2 and reinforces the need for comprehensive surveillance systems to mitigate the impact of future pandemics and safeguard both human and animal health.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12985-024-02505-9>.

Additional file 1
Additional file 2

Acknowledgements

Special thanks are extended to all employees of the laboratory PROTOVET, Residents in Public Health with emphasis on human and wildlife health interface, to the mammal management team at the Fundação de Parques Municipais e Zootécnica – FPMZB de Belo Horizonte.

Author contributions

Anisleydy Pérez Castillo: Conceptualization, investigation, methodology, analysis, formal analysis, data curation, writing—original draft, writing, reviewing, and editing. Joao Victor Oliveira Miranda: Methodology, formal analysis, data curation, writing – original draft, review and editing. Paula Luize Camargos Fonseca: Methodology, formal analysis, data curation, visualization, writing – original draft, writing, review, and editing. Rennan Garcias Moreira: Methodology, formal analysis, and data curation. Luiza Campos Guerra de Araújo e Santos: Methodology. Daniel Costa Queiroz: Methodology. Diego Menezes Bonfim: Methodology, original draft. Carlyle Mendes Coelho: Methodology, Investigation. Paula Cristina Senra Lima: Methodology, Investigation. Rafael Otávio Cançado Motta: Methodology, Investigation. Herlandes Penha Tinoco: Methodology, Investigation. Júlia Angélica Gonçalves da Silveira: Conceptualization, resources, investigation, supervision, funding acquisition, review, and editing. Renato Santana de Aguiar: Conceptualization, resources, review, editing, investigation, supervision, funding acquisition and editing. All the authors have read and approved the final version of the manuscript.

Funding

This work was supported by grants from UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais, CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, for the PQ fellowship. We acknowledge support from FAPEMIG (BPD-00820-22), Rede Corona-ômica BR MCTI/FINEP affiliated with RedeVirus/MCTI (1227/21); Instituto Todos pela Saúde—ITpS (Chamada 01/2021-C1.294); CNPq (315592/2021-4, INCT-One CNPq 405786/2022-0); FINEP (0494/20.1.20.0026.00); CAPES (Finance Code 001).

Availability of data and materials

Data and materials are available upon request to the corresponding author.

Declarations

Ethics approval and consent to participate:

The samples were collected as part of a UFMG service to the Belo Horizonte Zoo (FPMZB) under extension code Siex-UFMG 302557. No ethical approval was needed, and written consent was obtained from the zoo administration for the animals' participation.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ²Fundação de Parques Municipais e Zootécnica – FPMZB, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ³Laboratório de Biologia Integrativa, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ⁴Laboratório de PROTOVET, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ⁵Centro de Laboratórios Multusuários, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Received: 14 June 2024 Accepted: 16 September 2024

Published online: 19 November 2024

References

- COVID-19 weekly epidemiological update, World Health Organization. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---27-april-2022>
- Madhusoodanan J. Animal reservoirs—where the next SARS-CoV-2 variant could arise. *JAMA*. 2022;328(8):696–8. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.9789>.
- Tan CCS, Lam SD, Richard D, Owen CJ, Berchtold D, Orenge C, et al. Transmission of SARS-CoV-2 from humans to animals and potential host adaptation. *Nat Commun*. 2022;13(1):2988. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30698-6>.
- Sharun K, Dhama K, Pawde AM, Gortázar C, Tiwari R, Bonilla-Aldana DK, et al. SARS-CoV-2 in animals: potential for unknown reservoir hosts and public health implications. *Vet Q*. 2021;41(1):181–201. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1921311>.
- Shi J, Wen Z, Zhong G, Yang H, Wang C, Huang B, et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*. 2020;368(6494):1016–20. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>.
- Jorwal P, Bharadwaj S, Jorwal P. One health approach and COVID-19: a perspective. *J Family Med Prim Care*. 2020;9(12):5888–91. https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_1058_20.
- Wang L, Mitchell PK, Calle PP, Bartlett SL, McAloose D, Killian ML, et al. Complete genome sequence of SARS-CoV-2 in a Tiger from a U.S. zoological collection. *Microbiol Resour Anounc*. 2020;9(22):e00468–e520. <https://doi.org/10.1128/MRA.00468-20>.
- McAloose D, Laverack M, Wang L, Killian ML, Caserta LC, Yuan F, et al. From people to panthera: natural SARS-CoV-2 infection in tigers and lions at the Bronx Zoo. *MBio*. 2020;11(5):e02220–e2320. <https://doi.org/10.1128/mBio.02220-20>.
- Meurens F, Dunoyer C, Fourichon C, Gerds V, Haddad N, Kortekaas J, Lewandowska M, Monchatre-Leroy E, Summerfield A, Wichgers Schreur PJ, van der Poel WHM, Zhu J. Animal board invited review: risks of zoonotic disease emergence at the interface of wildlife and livestock

- systems. *Animal*. 2021;15(6): 100241. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100241>.
10. Cui S, Liu Y, Zhao J, Peng X, Lu G, Shi W, et al. An updated review on SARS-CoV-2 infection in animals. *Viruses*. 2022;14(7):1527. <https://doi.org/10.3390/v14071527>.
 11. 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*. 2021;371(6525):172–7. <https://doi.org/10.1126/science.abe5901>.
 12. Tang X, Wu C, Li X, Song Y, Yao X, Wu X, et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Natl Sci Rev*. 2020;7(6):1012–23. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>.
 13. Boni MF, Lemey P, Jiang X, Lam TT, Perry BW, Castoe TA, et al. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nat Microbiol*. 2020;5(11):1408–17. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0771-4>.
 14. FUNDAÇÃO DE PARQUES MUNICIPAIS E ZOOBOTÂNICA. Prefeitura de Belo Horizonte. Belo Horizonte. PBH. <https://prefeitura.pbh.gov.br/fundacao-de-parques-e-zoobotanica> (2017)
 15. Conheça a Fundação de Parques Municipais e Zootécnica. Prefeitura de Belo Horizonte. Belo Horizonte. PBH. <https://prefeitura.pbh.gov.br/noticias/conheca-fundacao-de-parques-municipais-e-zoobotanica> (2017)
 16. Diagnóstico de enfermidades de animais silvestres do Jardim Zoológico de Belo Horizonte – MG. ESCOLA DE VETERINÁRIA - UFMG. <https://vet.ufmg.br/projeto/diagnostico-de-enfermidades-de-animais-silvestres-do-jardim-zoologico-de-belo-horizonte-mg/>
 17. Lu X, Wang L, Sakthivel SK, Whitaker B, Murray J, Kamili S, et al. US CDC real-time reverse transcription PCR panel for detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(8):1654–65. <https://doi.org/10.3201/eid2608.201246>.
 18. Moreira FRR, D'Arc M, Mariani D, Herlinger AL, Schiffler FB, Rossi AD, et al. Epidemiological dynamics of SARS-CoV-2 VOC Gamma in Rio de Janeiro Brazil. *Virus Evol*. 2021;7(2):veab087. <https://doi.org/10.1093/ve/veab087>.
 19. Langmead B, Wilks C, Antonescu V, Charles R. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. *Bioinformatics*. 2019;35(3):421–32. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty648>.
 20. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*. 2010;26(6):841–2. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>.
 21. Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetic parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*. 2011;27(21):2987–93. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr509>.
 22. O'Toole A, Scher E, Underwood A, Jackson B, Hill V, McCrone JT, et al. Assignment of epidemiological lineages in an emerging pandemic using the pangolin tool. *Virus Evol*. 2021;7(2):veab064. <https://doi.org/10.1093/ve/veab064>.
 23. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 2018;34(18):3094–100. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191>.
 24. Aksamentov I, Roemer C, Hodcroft EB, Neher RA. Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *J Open Source Softw*. 2021;6(6):3773. <https://doi.org/10.21105/joss.03773>.
 25. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol Evol*. 2020;37(5):1530–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.
 26. Jemeršić L, Ljkić I, Krešić N, Keros T, Zelenika TA, Jurinović L, et al. Investigating the presence of SARS-CoV-2 in free-living and captive animals. *Pathogens*. 2021;10(6):635. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060635>.
 27. Joffrin L, Cooreman T, Verheyen E, Vercammen F, Mariën J, Leirs H, Gryseels S. SARS-CoV-2 Surveillance between 2020 and 2021 of all mammalian species in two Flemish zoos (Antwerp Zoo and Planckendael Zoo). *Vet Sci*. 2023;31(10):382. <https://doi.org/10.3390/vetsci10060382>.
 28. Filchakova O, Dossym D, Ilyas A, Kuanysheva T, Abdizhamil A, Bukasov R. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. *Talanta*. 2022;1(244): 123409. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123409>.
 29. Dusseldorp F, Bruins-van-Sonsbeek LGR, Buskermolen M, Niphuis H, Dirven M, Whelan J, Oude Munnink BB, Koopmans M, Fanoy EB, Sikkema RS, Tjon-A-Tsien A. SARS-CoV-2 in lions, gorillas and zookeepers in the Rotterdam Zoo, the Netherlands, a One Health investigation, November 2021. *Euro Surveill*. 2023;28(28):2200741. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.28.2200741>.
 30. Porter SM, Hartwig AE, Bielefeldt-Ohmann H, Bosco-Lauth AM, Root JJ. Susceptibility of Wild Canids to SARS-CoV-2. *Emerg Infect Dis*. 2022;28(9):1852–5. <https://doi.org/10.3201/eid2809.220223>.
 31. Bartlett SL, Diel DG, Wang L, Zec S, Laverack M, Martins M, et al. SARS-CoV-2 infection and longitudinal fecal screening in Malayan Tigers (Panthera tigris Jacksoni), Amur Tigers (Panthera tigris altaica), and African Lions (Panthera leo Krugeri) At The Bronx Zoo, New York, USA. *J Zoo Wildl Med*. 2021;51(4):733–44. <https://doi.org/10.1638/2020-0171>.
 32. Mishra A, Kumar N, Bhatia S, Aasdev A, Kannappan S, Sekhar AT, et al. SARS-CoV-2 delta variant among Asiatic lions. *India Emerg Infect Dis*. 2021;27(10):2723–5. <https://doi.org/10.3201/eid2710.211500>.
 33. Mitchell PK, Martins M, Reilly T, Caserta LC, Anderson RR, Cronk BD, et al. SARS-CoV-2 B.1.1.7 Variant Infection in Malayan Tigers, Virginia, USA. *Emerg Infect Dis*. 2021;27(12):3171–3. <https://doi.org/10.3201/eid2712.211234>.
 34. McBride DS, Garushyants SK, Franks J, Magee AF, Overend SH, Huey D, et al. Accelerated evolution of SARS-CoV-2 in free-ranging white-tailed deer. *Nat Commun*. 2023;14(1):5105. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40706-y>.
 35. Palmer MV, Martins M, Falkenberg S, Buckley A, Caserta LC, Mitchell PK, et al. Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to SARS-CoV-2. *J Virol*. 2021;95(11):e00083-e121. <https://doi.org/10.1128/JVI.00083-21>.
 36. Chandler JC, Bevins SN, Ellis JW, Linder TJ, Tell RM, Jenkins-Moore M, et al. SARS-CoV-2 exposure in wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(47): e2114828118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2114828118>.
 37. Feng A, Bevins S, Chandler J, DeLiberto TJ, Ghai R, Lantz K, et al. Transmission of SARS-CoV-2 in free-ranging white-tailed deer in the United States. *Nat Commun*. 2023;14(1):4078. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39782-x>.
 38. Cases of SARS-CoV-2 infection in animals reported to WOA since March 2020. WOA. <https://www.woah.org/en/diseases/sars-cov-2/#ui-id-2> (2023)
 39. Castillo AP, Miranda JVO, Fonseca PLC, Silva SO, Lopes REN, Spanhol VC, Moreira RG, Nicolino RR, Queiroz DC, de Araújo E, Santos LCG, Dos Santos APS, Rivetti HAA, Martins-Duarte ES, de Almeida Vitor RW, Dos Reis JKP, Aguiar RS, da Silveira JAG. Evidence of SARS-CoV-2 infection and co-infections in stray cats in Brazil. *Acta Trop*. 2024;249:107056. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.107056>.
 40. Fernández-Bellón H, Rodon J, Fernández-Bastit L, Almagro V, Padilla-Solé P, Lorca-Oró C, et al. Monitoring Natural SARS-CoV-2 Infection in Lions (Panthera leo) at the Barcelona Zoo: Viral Dynamics and Host Responses. *Viruses*. 2021;13(9):1683. <https://doi.org/10.3390/v13091683>.
 41. Pickering B, Lung O, Maguire F, Kruczkiewicz P, Kotwa JD, Buchanan T, et al. Divergent SARS-CoV-2 variant emerges in white-tailed deer with deer-to-human transmission. *Nat Microbiol*. 2022;7(12):2011–24. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01268-9>.
 42. Marques AD, Sherrill-Mix S, Everett JK, Adhikari H, Reddy S, Ellis JC, et al. Multiple introductions of SARS-CoV-2 alpha and delta variants into white-tailed deer in Pennsylvania. *MBio*. 2022;13(5):e0210122. <https://doi.org/10.1128/mbio.02101-22>.
 43. Delahay RJ, de la Fuente J, Smith GC, Sharon K, Snary EL, Flores Giron L, et al. Assessing the risks of SARS-CoV-2 in wildlife. *One Health Outlook*. 2021;7(3):7. <https://doi.org/10.1186/s42522-021-00039-6>.
 44. Goraichuk IV, Arefiev V, Stegnyy BT, Gerilyovych AP. Zoonotic and reverse zoonotic transmissibility of SARS-CoV-2. *Virus Res*. 2021;302: 198473. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198473>.
 45. Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel WH. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(1):1–7. <https://doi.org/10.3201/eid1601.081467>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

APPENDIX 1: Identificação de mamíferos cativos provenientes do Jardim Zoológico, Belo Horizonte, Minas Gerais, quanto ao número de identificação, dados de coleta, **espécies**, ordem, família, sexo, tipo de amostras coletadas.

ID	Collection date	Species	Order/Family	Sex	Oral swab	Rectal swab	Nasal swab
AZ01	2021-11-04	<i>Leopardus braccatus</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	Male	Yes	Yes	Yes
AZ02	2021-11-04	<i>Leopardus braccatus</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	Male	Yes	Yes	Yes
AZ03	2021-11-04	<i>Leopardus braccatus</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	Female	Yes	Yes	Yes
AZ04	2021-11-22	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Ordem Primates. Família Hominidae	Female	Yes	Yes	Yes
AZ05	2021-11-22	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Ordem Primates. Família Hominidae	Female	Yes	Yes	Yes
AZ06	2021-12-07	<i>Puma concolor</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	Female	Yes	Yes	Yes
AZ07	2021-12-16	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Ordem: Carnivora. Família Canidae	Female	Yes	Yes	No
AZ08	2022-02-08	<i>Galictis cuja</i>	Ordem: Carnivora. Família: Mustelidae.	Male	Yes	Yes	Yes
AZ09	2022-02-08	<i>Subulo gouazoubira</i>	Ordem: Artiodactyla.. Família: Cervidae	Male	Yes	Yes	Yes
AZ10	2022-02-08	<i>Cervus elaphus</i>	Ordem: Artiodactyla.. Família: Cervidae	Female	Yes	Yes	Yes
AZ11	2022-03-10	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Ordem: Carnivora. Família Canidae	Female	Yes	Yes	Yes
AZ12	2022-03-10	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Ordem: Carnivora. Família Canidae	Female	Yes	Yes	Yes
AZ13	2022-03-10	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Ordem: Carnivora. Família Canidae	Male	Yes	Yes	Yes
AZ14	2022-03-16	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Ordem: Carnivora. Família Canidae	Male	Yes	Yes	Yes
AZ15	2022-03-16	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Ordem: Carnivora. Família Canidae	Male	Yes	Yes	Yes
AZ16	2022-05-16	<i>Dama dama</i>	Ordem: Artiodactyla.. Família: Cervidae	Male	Yes	Yes	Yes
AZ17	2022-05-16	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Ordem Primates. Família Hominidae	Male	Yes	Yes	Yes
AZ18	2022-05-27	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Ordem: Carnivora. Família Canidae	Male	Yes	Yes	Yes
AZ25	2022-08-25	<i>Panthera leo</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	Female	Yes	Yes	Yes
AZ27	2022-07-01	<i>Ateles sp</i>	Ordem Primates. Família Atelidae	Female	Yes	Yes	Yes
AZ28	2022-10-25	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Ordem Primates. Família Atelidae	Female	Yes	Yes	No
AZ29	2022-10-25	<i>Sapajus apella</i>	Ordem Primates. Família Cebidae	Male	Yes	Yes	No
AZ30	2022-11-15	<i>Subulo gouazoubira</i>	Ordem: Artiodactyla.. Família: Cervidae	Mael	Yes	Yes	Yes

Appendix 1: (continuação)

ID	Collection date	Species	Order/Family	Sex	Oral swab	Rectal swab	Nasal swab
AZ31	2022-11-21	<i>Panthera onca</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	Female	Yes	Yes	Yes
AZ32	2022-11-24	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Ordem Primates. Família Atelidae	Male	Yes	Yes	No
AZ33	2022-11-24	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Ordem Primates. Família Atelidae	Female	Yes	Yes	No
AZ34	2022-11-24	<i>Sapajus apella</i>	Ordem Primates. Família Cebidae	Male	Yes	Yes	No
AZ35	2022-11-24	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Ordem Primates. Família Atelidae	Female	Yes	Yes	No
AZ36	2023-01-24	<i>Dama dama</i>	Ordem: Artiodactyla.. Família: Cervidae	Male	Yes	Yes	Yes
AZ37	2023-01-24	<i>Dasyprocta</i> sp	Ordem Rodentia. Família: Dasyproctidae	Male	Yes	Yes	Yes
AZ38	2023-01-26	<i>Alouatta</i> sp	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	Male	Yes	Yes	Yes
AZ39	2023-01-26	<i>Alouatta</i> sp	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	Female	Yes	Yes	Yes
AZ40	2023-01-26	<i>Alouatta</i> sp	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	Female	Yes	Yes	Yes
AZ41	2023-01-26	<i>Alouatta</i> sp	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	Female	Yes	Yes	Yes
AZ42	2023-01-26	<i>Alouatta</i> sp	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	Male	Yes	Yes	Yes
AZ43	2023-01-26	<i>Alouatta</i> sp	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	Male	Yes	Yes	Yes
AZ44	2023-01-25	<i>Puma concolor</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	Female	Yes	Yes	Yes
AZ45	2023-02-10	<i>Alouatta</i> sp	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	Male	Yes	Yes	Yes
AZ46	2022-11-15	<i>Hippopotamus amphibius</i>	Ordem: Artiodactyla. Família: Hippopotamidae	Female	Yes	Yes	Yes
AZ47	2022-11-21	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	Ordem Primates. Família Callithrichidae.	Male	Yes	Yes	No
AZ48	24-11.2022	<i>Sapajus apella</i>	Ordem Primates. Família Cebidae	Female	Yes	Yes	No
AZ49	2022-11-24	<i>Sapajus apella</i>	Ordem Primates. Família Cebidae	Male	Yes	Yes	No
AZ51	2022-11-24	<i>Saguinus imperator</i>	Ordem Primates. Família Callithrichidae	Male	Yes	Yes	No
AZ52	2022-11-24	<i>Saguinus imperator</i>	Ordem Primates. Família Callithrichidae	Male	Yes	Yes	No
AZ53	2022-11-24	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	Ordem: Artiodactyla. Família: Bovidae	Male	Yes	Yes	Yes
AZ56	2022-11-24	<i>Saguinus imperator</i>	Ordem Primates. Família Callithrichidae	Male	Yes	Yes	No
AZ57	2023-03-03	<i>Puma concolor</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	Male	Yes	Yes	Yes

APPENDIX 2: Métricas do sequenciamento genômico das amostras positivas para SARS-CoV-2 nos mamíferos cativos do Jardim Zoológico de Belo Horizonte.

Sample	Number_of_raw_reads	number_of_ paired_ filtered_ reads	number_of_ unpaired_ filtered_reads	number_ of_ mapped_ reads	efficiency	average_ depth	coverage_10x	coverage_100x	coverage_ 1000x	genome_ coverage	Pango_ classification	Nextclade	Clade	GISAIID_accession_number
AZ13	2227802	1373506	15156	144561	0.0648895	706.21	0.936227	0.684614	0.171087	0.887704	Alpha	Alpha	20I	EPI_ISL_18953979
AZ16	870248	605488	19811	28786	0.0330779	142.386	0.835067	0.328796	0.0255158	0.753938	Alpha	Alpha	20I	EPI_ISL_18953980
AZ17	1470574	1405064	11442	5688	0.0038678	281.264	0.455974	0.0757449	0	0.489762	Omicron	Omicron	21M	-

8.1.3. Artigo 2 – Artigo submetido para publicação na Revista *Journal of Zoological and Botanical Gardens*



Article

Parasitic Protozoa and Other Vector-Borne Pathogens in Captive Mammals from Brazil

Anisleidy Pérez Castillo ^{1,2} , Nicolas Colácio ² , Pedro Henrique Cotrin Rodrigues ² , João Victor Oliveira Miranda ³ , Paula Cristina Senra Lima ⁴, Rafael Otávio Cançado Motta ⁴, Herlandes Penha Tinoco ⁴, Carlyle Mendes Coelho ⁴ and Júlia Angélica Gonçalves da Silveira ^{2,*}

- ¹ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; apeca81@gmail.com
- ² Laboratório de PROTOVET, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; nicocolacio@gmail.com (N.C.); pedro.cotrin@gmail.com (P.H.C.R.)
- ³ Laboratório de Biologia Integrativa, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; jvmirandaoliveira76@gmail.com
- ⁴ Fundação de Parques Municipais e Zootécnica-FPMZB, Belo Horizonte 30210-090, MG, Brazil; paula.senra@gmail.com (P.C.S.L.); rafael.motta@pbh.gov.br (R.O.C.M.); herlandes@pbh.gov.br (H.P.T.); carlyle.m@pbh.gov.br (C.M.C.)
- * Correspondence: jangelicags@gmail.com



Citation: Castillo, A.P.; Colácio, N.; Rodrigues, P.H.C.; Miranda, J.V.O.; Lima, P.C.S.; Motta, R.O.C.; Tinoco, H.P.; Coelho, C.M.; da Silveira, J.A.G. Parasitic Protozoa and Other Vector-Borne Pathogens in Captive Mammals from Brazil. *J. Zool. Bot. Gard.* **2024**, *5*, 754–773. <https://doi.org/10.3390/jzbg5040050>

Academic Editor: Mariana Stancheva Panayotova-Pencheva

Received: 7 October 2024

Revised: 17 November 2024

Accepted: 18 November 2024

Published: 2 December 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In captive environments, mammals are frequently exposed to various parasitic protozoa and other vector-borne pathogens that can impact both animal health and public health. Monitoring these pathogens is essential for animal welfare and zoonotic disease control. This study aimed to investigate the prevalence of parasitic protozoa and other vector-borne pathogens in captive mammals through molecular detection methods at the Belo Horizonte Zoo, Brazil. Between November 2021 and March 2023, whole blood samples were collected from 40 mammals. Molecular analyses identified piroplasms, *Leishmania* spp., granulocytic/platelet *Anaplasma/Ehrlichia* spp., monocytic *Ehrlichia* spp., *Bartonella* spp. and hemotropic *Mycoplasma* spp. with a 72.5% positivity rate. Piroplasms were found in 22.5% (two Pantanal cats, two gorillas, one white rhinoceros, one spider monkey, one jaguar, one tufted capuchin and one hippo) and *Leishmania* spp. in 12.9% (four maned wolves). Granulocytic/platelet *Anaplasma/Ehrlichia* spp. were found in 12.5% of the samples (one gorilla and four maned wolves), *Ehrlichia canis* in 2.5% of the animals (one maned wolf), *Bartonella* spp. in 42.5% (six howler monkeys, two maned wolves, one gorilla, one white rhino, one southern tamandua, one common woolly monkey, one tufted capuchin, one brown brocket deer, one agouti, one cougar and one hippo), hemotropic *Mycoplasma* spp. in 17.5% (one gorilla, one maned wolf, one white rhino, one howler monkey, two common woolly monkeys and one European fallow deer). Five Artiodactyla members tested negative for *A. marginale*. Coinfections occurred in 34.5% of the positive samples. Sequencing revealed that *Theileria* spp. and *Cytauxzoon* spp. are closely related to *Theileria bicornis* and *Cytauxzoon felis*; *Ehrlichia canis* and *Bartonella* spp. are closely related to *B. clarridgeiae* and *B. henselae*; and hemotropic *Mycoplasma* spp. are closely related to *Candidatus Mycoplasma haemominutum*. Our results showed a high occurrence of vector-borne pathogens in captive animals, including zoonotic species, which may pose a risk to animal and human public health.

Keywords: diagnosis; hemopathogens; captive environments; wildlife conservation; animal health; one health

1. Introduction

Diseases caused by vector-borne pathogens represent a significant challenge to the health and well-being of animals in captivity [1], with direct implications for the management of collections in zoos and conservation centers. These diseases can also affect

the human population due to their zoonotic potential. The adverse effects of parasitic infections in zoo animals can vary [2], including the emergence of secondary deficiencies and other infections, reproductive impairment and the risk of mortality in cases of massive and dangerous parasitosis. Additionally, zoos are environments where wild animals have close contact with humans, considerably increasing the risk of transmission of parasitic zoonoses [3]. This poses a threat not only to the health of the animals themselves but also to the health of zoo staff and visitors.

The confined nature of these environments increases the susceptibility of animals to vector-borne infections due to population density, close interactions between species and environmental stress [4]. Additionally, the diversity of host species maintained in zoos provides a conducive environment for the transmission and maintenance of a wide range of vector-borne pathogens. The presence of these pathogens in zoo animals can result in a series of negative health impacts on the host, including anemia, weight loss, tissue damage, immunosuppression and, in severe cases, mortality [5].

Piroplasmids, such as *Babesia*, *Theileria* and *Cytauxzoon*, belong to the phylum Apicomplexa and are transmitted by parasitic ticks to mammals. These protozoa may be asymptomatic in wild animals but cause severe consequences and even death in domestic animals. These infections result in economic losses in livestock, trade restrictions in horses and negative health impacts on dogs and cats, as well as growing concern over cases of human babesiosis [6]. The genus *Leishmania*, member of the family Trypanosomatidae within the order Kinetoplastida, comprises protozoan pathogens transmitted by sandflies, such as *Lutzomyia* sp. The *Leishmania* protozoa infect both humans and a wide range of animals, contributing to the complexity and severity of zoonotic diseases and their impacts on public and veterinary health.

The Anaplasmataceae family, which includes the genera *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* and *Wolbachia*, infects a variety of mammalian cells and can be transmitted by a wide range of vectors, such as ticks and trematodes. In Brazil, several species from this family have been detected in a wide range of wild animals, such as deer, wild canids, wild felids, coatis, rodents, peccaries, collared peccaries and opossums [7,8]. *Bartonella* species, belonging to the family Bartonellaceae, are transmitted by ectoparasites, such as fleas, lice and ticks, and can infect a variety of captive animals, including marine mammals such as dolphins as well as terrestrial mammals and their arthropod ectoparasites. The greater occurrence in some captive cohorts compared to free-ranging animals suggests that captivity may be a risk factor for *Bartonella* infection [9]. Additionally, hemotropic *Mycoplasma* species, classified within the class Mollicutes, are known to cause anemia in various mammalian species, transmitted by blood-feeding arthropods [10].

Vector-borne pathogens, including protozoa and bacteria, have been increasingly reported in captive mammals worldwide, with significant implications for both conservation efforts and animal welfare. For example, Protozoan agents have been associated with mortality and the development of clinical signs in captive cervids and canids from Canada and Brazil [11,12]. Bacterial pathogens have already been detected in captive animals around the world, Hemoplasmas have been detected in various captive animals, indicating that these pathogens can infect a wide range of species in captivity, which could potentially lead to health issues if not monitored [9,13–16].

Thus, the present work aimed to investigate the occurrence of vector-borne pathogens in captive mammals from the Zoo of the Belo Horizonte Zoo-Botanical Foundation, Minas Gerais, Brazil.

In this study, we report the high prevalence of vector-borne pathogens in various mammalian species at the Belo Horizonte Zoo by employing molecular techniques to detect and identify these pathogens. Our findings underscore the complexity of disease management in captive environments and the importance of early detection and integrated control measures to protect both animal and human health.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Statement

All procedures were conducted in accordance with relevant guidelines and regulations. The samples were collected after the signing of a partnership agreement between the Federal University of Minas Gerais (UFMG) and the Municipal Parks and Zoo-botanical Foundation (FPMZB) in strict compliance with applicable ethical guidelines.

2.2. Study Area

This study was conducted at the Belo Horizonte Municipal Parks and Zoo-Botanical Foundation (FPMZB), a 10.7-million-square-meter complex that houses more than 3500 individuals across 235 species, including 36 mammal species with 117 individuals. Notably, more than 40 species spanning reptiles, birds, fish, amphibians and mammals from all continents are threatened with extinction. Located in Belo Horizonte, Minas Gerais (−19.857889841, −44.0075113912) (Figure 1), the Zoo features a veterinary hospital and a rich history of biodiversity preservation. Established through Decree 16,684 of 31 August 2017, the FPMZB merged the former Municipal Parks Foundations and the Zoo-Botanical Foundation, playing a vital role in conserving local ecosystems and researching mammal species. Its parks and botanical gardens harbor more than a thousand species, representing Brazil's Cerrado and Atlantic Forest biomes [17].

2.3. Samples

Between November 2021 and March 2023, whole blood samples were collected from 40 captive animals of the class Mammalia at the Zoo. These samples were sent for analysis to the Veterinary Protozoology Laboratory—ProtoVet, as part of the service provided to FPMZB under the code Siex-UFMG 302557—“Diagnosis and control of hemoparasites in domestic and wild animals”. The capture and containment of the animals were conducted by the Zoo's team of veterinarians following the management schedule of the mammal population. To ensure the representativeness of the sampling, at least one sample of each mammal species present in the zoo was collected.

2.4. DNA Extraction and PCR Amplification

DNA was extracted from 300 µL of whole blood using the “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's recommendations. After the extraction, the quality and quantity of the samples were estimated using a NanoDrop (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek®, Winooski, Vermont, USA). The extracted DNA was stored at −20 °C until detection via PCR amplification. A fragment of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used to verify the quality of the extracts [18].

Blood DNA samples from mammals that tested positive for the GAPDH gene were subjected to PCR assays for Piroplasmids, *Leishmania*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Bartonella* and hemotropic *Mycoplasma*. All agents, target genes, primer sequences, amplicon sizes (bp), thermal cycling conditions and references are shown in Table 1.

Table 1. Molecular assays used in the present study are categorized by the involved agent, type of PCR, target gene, primer sequences, amplicon size (bp), thermal cycling conditions and references.

Agents	Aim/Primer	Molecular Assay	Primers Sequences	Fragment Size (bp)	Thermal Cycling	Reference
<i>Anaplasma</i> sp. (<i>A. phagocytophilum</i> , <i>A. laticis</i> , <i>A. platys</i>) (16S rRNA gene)	Screening 1 st reaction gE3a gE10R 2 nd reaction gE2 gE9L	nPCR	5'-CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC-3' 5'-TTCCGTTAAGAAAGATCTAATCTCC-3'	932	94 °C for 5 min 40 cycles: 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, 72 °C for 5 min	[19]
			5'-GGCAGTATTAAGAGCAGCTCCAGG-3' 5'-AACGGATTATCTTTATAGCTTGCT-3'	546		
<i>Ehrlichia</i> sp. (<i>E. chaffeensis</i> , <i>E. canis</i>) (16S rRNA gene)	Screening 1 st reaction NS16SCH1F NS16SCH1R 2 nd reaction NS16SCH2F NS16SCH2R	nPCR	5'-ACGGACAATTGCTTATAGCCCTT 5'-ACAACCTTTATGGATTAGTAATAAT	1195	94 °C for 5 min 30 cycles: 92 °C for 1 min, 54 °C for 1 min and 72 °C for 2 min, 72 °C for 8 min	[20]
			5'-GGGCACGTAGGTGGACTAG-3' 5'-CTGTAGGAGGATACGAC-3'	443		
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (<i>mop4</i> gene)	Characterization 1 st reaction MSP4AP5 MSP4AP3 2 nd reaction mop4F mop4R	nPCR	5'-ATGAATTACAGAGAATTGCTTGAGG-3' 5'-TTAATTGAAAGCAAACTCTGCTCTATG-3'	849	94 °C for 5 min 30 cycles: 92 °C for 1 min, 54 °C for 1 min and 72 °C for 2 min, 72 °C for 8 min	[21]
			5'-CTATTGGYGGNGCYAGAGT-3' 5'-GTTCTGCAAAAATTCCTGTGTA-3'	381		
<i>Anaplasma marginale</i> / <i>A. ovis</i> (<i>mop4</i> gene)	Characterization 1 st reaction MSP45 MSP43 2 nd reaction AnapF AnapR	nPCR	5'-GGGAGCTCTATGAATTACAGAGAATTGTTAC-3' 5'-CCGATCTCTTAGCTGACAGGAATCTTGC-3'	872	94 °C for 5 min 30 cycles: 92 °C for 1 min, 54 °C for 1 min and 72 °C for 2 min, 72 °C for 8 min	[23]
			5'-CGCCAGCAAACTTTTCCAAA-3' 5'-ATATGGGACACAGGCAAAAT-3'	294		
<i>Anaplasma platys</i> (16S rRNA gene)	Characterization 1 st reaction s-F 148R-R 2 nd reaction PLATYS-F EHR16s-R	nPCR	5'-AGTTTGATCATGGCTCAG-3' 5'-CCATGGCGCTGACGGCAGTGT-3'	*	1 st reaction 94 °C for 2 min, 40 cycles: 94 °C for 1 min, 45 °C for 1 min, 72 °C for 40 s, 72 °C for 4 min. 2 nd reaction 94 °C for 1 min, 40 cycles: 94 °C for 1 min, 53 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, 72 °C for 4 min.	[24]
			5'-GATTTTGTCTGATGCTGCTATG-3' 5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'	678		
<i>Babesia/Theileria</i> / <i>Cytauxzoon</i> (18S rRNA gene)	Screening 1 st reaction RIB-19 RIB-20 2 nd reaction BabRumF BabRumR	nPCR	5'-CGGATCCAACTGGTTGATCCTGC-3' 5'-CCGAATTCCTGTGACGACTTCTC-3'	1700	94 °C for 5 min 30 cycles: 92 °C for 1 min, 54 °C for 1 min and 72 °C for 2 min, 72 °C for 8 min	[25]
			5'-ACCTCACCAGGTCCAGCAG-3' 5'-GTACAAGGGCAGGACGTA-3'	430		
<i>Cytauxzoon felis</i>	Characterization CytauxF CytauxR	cPCR	5'-CGAATCGCATTTGCTTATGCTCAA 5'-TTGATACTCCGGAAGAG	284	95 °C for 5 min, 40 cycles: 95 °C for 45 s, 59 °C for 45 s and 72 °C for 60 s, 72 °C for 5 min	[27]
<i>Leishmania</i> sp. (ITS1 gene)	Screening LITSR LS3S	cPCR	5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3' 5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'	300–350	95 °C for 2 min, 37 cycles: 94 °C for 30 s, 53 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, 72 °C for 6 min.	[28]
<i>Bartonella</i> spp. (16S-23S rRNA intergenic region)	Screening BartF BartR	cPCR	5'-CTCTTTCTTCAGATGATCC-3' 5'-AACCAACTGAGCTACAAGCCCT-3'	145–232	95 °C for 2 min, 45 cycles: 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, 72 °C for 30 s, 72 °C for 5 min	[29]
<i>Hemotropic Mycoplasma</i> sp. (16S rRNA)	Screening HBTF HBTR	cPCR	5'-ATACGGCCCATATCTCTACG-3' 5'-TGCTCCACCACCTGTTCA-3'	618	94 °C for 10 min, 40 cycles: 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, 72 °C for 10 min	[30]

* the fragment size is unknown or cannot be determined.

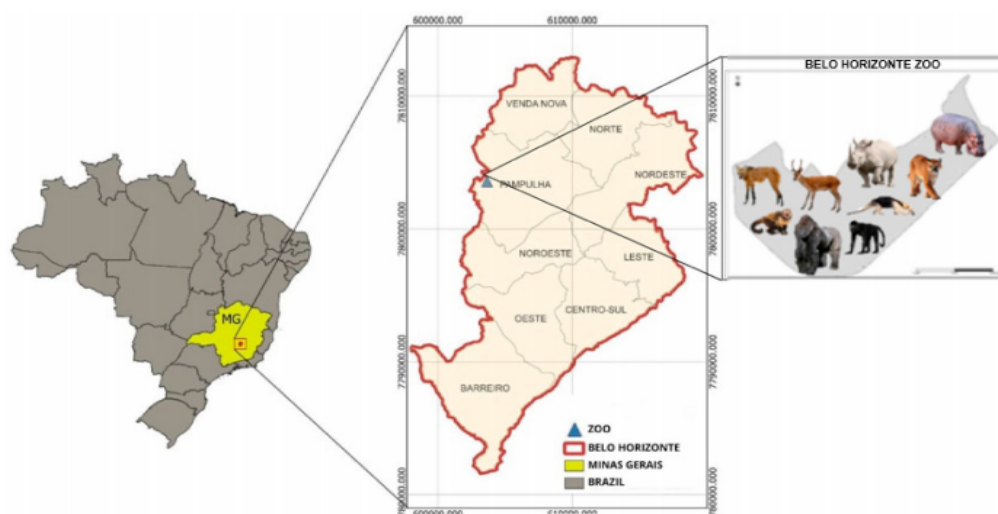


Figure 1. Capture site. Map of Minas Gerais state, southern Brazil, representing the Zoo region, where animals were sampled. Due to limitations in the software used to generate the figure, the numbers are not formatted with commas for thousands separation. Please disregard the format in the figure and refer to the correct formatting presented in the text (e.g., 7,780,000.000; 7,790,000.000; 7,800,000.000; 7,810,000.000; 600,000.000; 610,000.000).

For the PCRs, positive DNA controls were obtained from various sources. For tests of *Anaplasma phagocytophilum* and other granulocytic agents of the Anaplasmataceae family, DNA from IDE8 cell cultures infected with *A. phagocytophilum*, which was isolated from a German dog and kindly provided by Dr. Erich Zweygarth (Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, Ludwig Maximilians Universität München), was used. DNA from *Anaplasma marginale* was extracted from 300 µL of whole blood collected from a calf experimentally infected with *A. marginale* (strain UFMG1) [31]. For monocytic ehrlichiosis tests, DNA from a dog infected with *Ehrlichia canis* (Jaboticabal strain) [32] was used. For the nPCR of piroplasmids, positive controls were obtained from a calf experimentally infected with *Babesia bovis* (strain BbovMG) and *Babesia bigemina* (strain BbigMG) [33]. DNA from reference *Leishmania* strains provided by the World Health Organization (WHO), specifically *Leishmania infantum* (MCAN/BR/2002/BH400), which was maintained in the cryobank of the *Leishmania* Biology Laboratory and kindly provided by Prof. Maria Norma Melo (ICB/UFMG/Brazil), was used as a reaction control. Additionally, DNA for hemoplasmas and *Bartonella* spp. was obtained from the blood samples of naturally infected cats in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, confirmed by sequencing [34]. Ultrapure sterile water (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA) was used as a negative control in all PCR assays.

PCR amplicons were separated by electrophoresis on 1%, 2% and 3% agarose gels (40 min, 100 V), stained with GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA) and visualized under ultraviolet light.

2.5. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis—PCR for *Leishmania* spp.

To identify *Leishmania* spp., the *ITS1* amplicon was digested using the restriction enzyme *HaeIII* (PCR-RFLP). Five microliters of each amplified product were digested with the *HaeIII* restriction enzyme (Biolabs, Inc., UK) according to the manufacturer's instructions. The digested products were subjected to 5% polyacrylamide gel electrophoresis to verify

the restriction patterns. The restriction patterns obtained were compared with those of WHO reference strains [28].

2.6. Sequencing

Sequencing was performed by ACTGene using an automatic sequencer (ABI 3730xl DNA Analyzer Applied Biosystems™) with POP7 polymers and BigDye v3.1 using the same oligonucleotide primers used in the assays. For sequencing analysis, the raw data in the form of chromatograms generated by the automatic sequencer “Analyzer Applied Biosystems” were aligned, edited and analyzed using the BioEdit program, version 7.0.5.3 [35]. The identity of each sequence was confirmed by comparison with sequences available in GenBank using BLAST software (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed on 26 August 2024)) [36]. After comparing the identities, the analyzed sequences were classified according to the degree of similarity with data already deposited in GenBank. All nucleic acid sequences revealed in this study have been deposited in the GenBank database (PP844851, PP948683–PP948688, PP849127, PP849128, PP843077 and PP843078).

2.7. Phylogenetic Analysis

Multiple sequence alignments were carried out using the Multiple Alignment using Fast Fourier Transform (MAFFT) algorithm (MAFFT v7.310) [37], with previously published sequences in GenBank. Moreover, representative sample sequences were also downloaded for use as an outgroup in the phylogenetic analysis. Phylogenetic trees were constructed using the Maximum Likelihood (ML) method based on the results of alignment with MEGA11 [38–41] with suitable models selected with the smallest Bayesian information criterion (BIC) score. The reliability of the tree topology was tested using 1000 bootstrap replicates, as implemented in the program [42]. For piroplasmids, the Kimura 2-parameter method + G evolutionary model (K2 + G (5 categories, parameter = 0.1288)) (430 bp alignment) were used. For *Ehrlichia* spp., the Kimura 2-parameter model + gamma distribution (K2 + G (5 categories, parameter = 0.3607)) evolutionary model (630 bp) were used. For *Bartonella* spp., the Jukes–Cantor evolutionary model + gamma distribution + invariable sites (JC + G (5 categories, parameter = 1.0975)) + (I ([+I], 19.19% sites)) (165 bp alignment) were used, and for *Mycoplasma* spp., the general time reversible model with gamma distribution (GTR +G (5 categories, parameter = 0.3121)) (alignment of 600 bp).

2.8. Data Analysis

The data obtained were collected on an Excel spreadsheet, and descriptive frequency analysis was performed using Microsoft Excel Version 16.71 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

3. Results

In this study, samples were collected from 40 individuals of the class Mammalia. Of these, 57.5% (23/40) were males, and 42.5% (17/40) were females. The animals under study formed a highly heterogeneous group due to the diversity of species found in the zoo, belonging to different orders: 45% (18/40) from the order Primates, 35% (14/40) from the order Carnivora, 12.5% (5/40) from the order Artiodactyla, 2.5% (1/40) from the order Perissodactyla, 2.5% (1/40) from the order Pilosa and 2.5% (1/40) from the order Rodentia. Details regarding the collected animal species can be found in Table 2.

Among the 40 DNA blood samples collected from mammals, all tested positive by GAPDH gene-based cPCR and were included in subsequent analyses.

Overall, 72.5% (29/40) of the samples tested positive for at least one parasite. Nine animals (9/40–22.5%) tested positive by nPCR for piroplasmids (two Pantanal cats (*Leopardus braccatus*), two gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*), one white rhinoceros (*Ceratotherium simum*), one spider monkey (*Ateles* spp.), one jaguar (*Panthera onca*), one tufted capuchin (*Sapajus apella*) and one hippo (*Hippopotamus amphibius*). Sequencing was

performed on all positive samples, but only two were successful. *Theileria* sp. was detected in a 54-year-old female white rhinoceros, showing 99.55% identity with *Theileria bicornis* found in a captive white rhinoceros (MF536661) from Australia. Additionally, a female jaguar was found to have a piroplasm with 99.77% identity to *Cytauxzoon felis*, which was previously identified in an ocelot (*Leopardus pardalis*) (GU903911) from Brazil. cPCR for *Leishmania* spp. was performed on 31 animals from the orders Primates and Carnivora, resulting in 12.9% positivity (four maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*)), of which *Leishmania infantum* was detected in 50% (2/4) by PCR-RFLP.

Table 2. Identification of captive mammals sampled at Zoo of the Belo Horizonte Municipal Parks and Zoo-Botanical Foundation, Minas Gerais, between 2021 and 2023, regarding identification number, collection data, sex and molecular positivity for vector-borne pathogens. Results obtained in the PCR assays for *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys* and *Anaplasma marginale* are not shown since all animals tested negative.

ID	Collection Data	Sex	Species	Granulocytic/Platelet <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> sp.	Monocytic <i>Ehrlichia</i> sp.	<i>Bartonella</i> sp.	Hemotropic <i>Mycoplasma</i> sp.	Piroplasmids	<i>Leishmania</i> spp.
AZ01	2021-11-04	M *	<i>Leopardus braccatus</i>	—	—	—	—	Positive	—
AZ02	2021-11-04	M	<i>Leopardus braccatus</i>	—	—	—	—	Positive	—
AZ04	2021-11-22	F **	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	—	—	Positive	Positive	Positive	—
AZ05	2021-11-22	F	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Positive	—	—	—	Positive	—
AZ06	2021-12-07	F	<i>Puma concolor</i>	—	—	—	—	—	—
AZ07	2021-12-16	F	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	—	—	Positive	—	—	Positive
AZ08	2022-02-08	M	<i>Galictis cuja</i>	—	—	—	—	—	—
AZ09	2022-02-08	M	<i>Subulo genazoubira</i>	—	—	—	—	—	—
AZ11	2022-03-10	F	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Positive	—	—	Positive	—	Positive
AZ12	2022-03-10	F	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Positive	—	—	—	—	Positive
AZ13	2022-03-10	M	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Positive	—	—	—	—	Positive
AZ14	2022-03-16	M	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Positive	Positive	Positive	—	—	—
AZ15	2022-03-16	M	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	—	—	—	—	—	—
AZ16	2022-05-16	M	<i>Dama dama</i>	—	—	—	—	—	—
AZ17	2022-05-16	M	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	—	—	—	—	—	—
AZ18	2022-05-27	M	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	—	—	—	—	—	—
AZ19	2022-05-16	F	<i>Ceratotherium simum</i>	—	—	Positive	Positive	Positive	—
AZ20	2022-05-16	F	<i>Alouatta</i> sp.	—	—	—	Positive	—	—
AZ21	2022-05-27	F	<i>Alouatta</i> sp.	—	—	—	—	—	—
AZ22	2022-07-27	F	<i>Tamandua tetradactyla</i>	—	—	Positive	—	—	—
AZ25	2022-08-25	F	<i>Panthera leo</i>	—	—	—	—	—	—
AZ27	2022-07-01	F	<i>Atelis</i> sp.	—	—	—	—	Positive	—
AZ28	2022-10-25	F	<i>Leptotriton lagotricha</i>	—	—	Positive	Positive	—	—
AZ29	2022-10-25	M	<i>Sapajus apella</i>	—	—	Positive	—	—	—
AZ30	2022-11-15	M	<i>Subulo genazoubira</i>	—	—	Positive	—	—	—
AZ31	2022-11-21	F	<i>Panthera onca</i>	—	—	—	—	—	—
AZ32	2022-11-24	M	<i>Leptotriton lagotricha</i>	—	—	—	—	—	—
AZ33	2022-11-24	F	<i>Leptotriton lagotricha</i>	—	—	—	Positive	—	—
AZ34	2022-11-24	M	<i>Sapajus apella</i>	—	—	—	—	—	—
AZ35	2022-11-24	F	<i>Leptotriton lagotricha</i>	—	—	—	—	—	—
AZ36	2023-01-24	M	<i>Dama dama</i>	—	—	—	Positive	—	—
AZ37	2023-01-24	M	<i>Dasyatis</i> sp.	—	—	Positive	—	—	—
AZ38	2023-01-26	M	<i>Alouatta</i> sp.	—	—	Positive	—	—	—
AZ39	2023-01-26	F	<i>Alouatta</i> sp.	—	—	Positive	—	—	—
AZ41	2023-01-26	F	<i>Alouatta</i> sp.	—	—	Positive	—	—	—
AZ42	2023-01-26	M	<i>Alouatta</i> sp.	—	—	Positive	—	—	—
AZ43	2023-01-26	M	<i>Alouatta</i> sp.	—	—	Positive	—	—	—
AZ44	2023-01-25	F	<i>Puma concolor</i>	—	—	Positive	—	—	—
AZ45	2023-02-10	M	<i>Alouatta</i> sp.	—	—	Positive	—	—	—
AZ46	2022-11-15	F	<i>Hippopotamus amphibius</i>	—	—	Positive	—	Positive	—

* Male; ** Female; — Negative.

Phylogenetic analysis using the ML method based on the 18S rRNA gene of piroplasmids (Figure 2) positioned the *Theileria* spp. sequences detected in white rhinoceroses from

this study within the same clade as the *T. bicornis* sequences identified in white and black rhinoceroses from Australia and South Africa. Moreover, the *Cytauxzoon* spp. sequence detected in the jaguars in this study was closely related to *C. felis* sequences found in jaguars, ocelots and domestic cats from Brazil, South Africa and the United States.

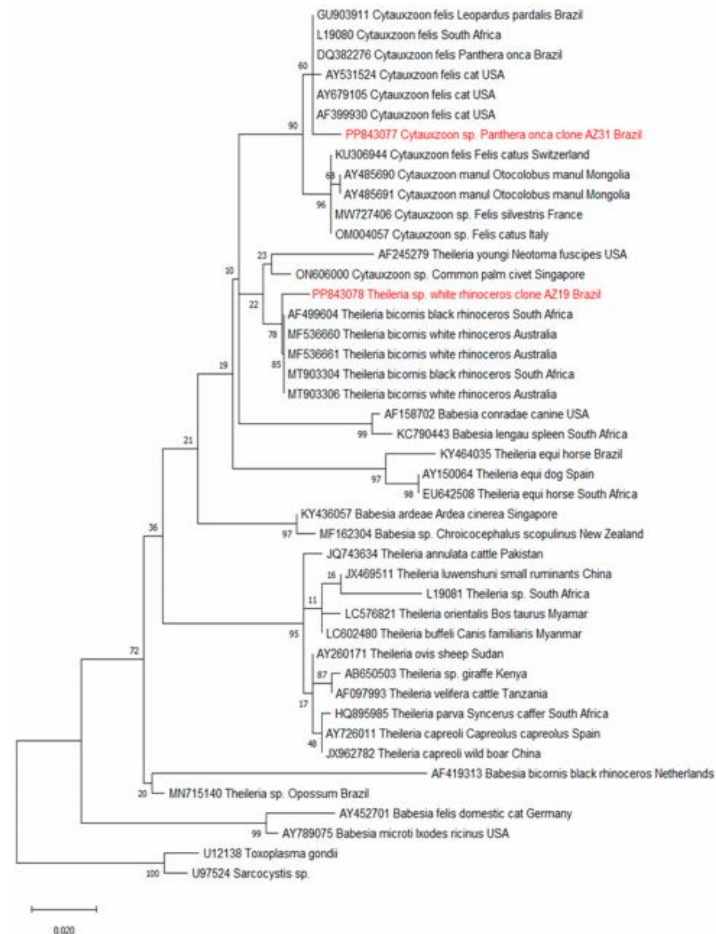


Figure 2. Phylogenetic tree based on an alignment of 430 bp of the piroplasmid 18S rRNA gene involving 44 nucleotide sequences, using the ML method and K2 + G as an evolutionary model. The numbers at the branch nodes of the tree indicate bootstrap values from 1000 replications. The scale bar represents the evolutionary distance. The sequences detected in the present study are highlighted in red, with accession numbers provided in parentheses. *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* spp. were used as outgroups.

In the nPCR analysis for the bacteria of the Anaplasmataceae family, granulocytic/platelet *Anaplasma/Ehrlichia* spp. were detected in 12.5% (5/40) of the animals, including one gorilla and four maned wolves. However, DNA amplification of *A. phagocytophilum* and *A. platys* was unsuccessful in these positive samples. Unfortunately, all samples positive for the 16S rRNA gene by PCR for the *Anaplasma/Ehrlichia* spp. granulocytes/platelets yielded bands

of weak intensity, which precluded sequencing efforts for these fragments. Additionally, 2.5% (1/40) of the animals tested positive for monocytic *Ehrlichia* spp. (one maned wolf), which was confirmed by sequencing similarity with *E. canis*. BLASTn analysis revealed 99.31% identity with the sequences of *E. canis* detected in *Canis lupus familiaris* (MK507008) sampled in Cuba.

ML analyses based on the 16S rRNA gene of *Ehrlichia* sp. in this study detected a sequence that can be put into the same clade as previously identified *E. canis* sequences from domestic dogs in Brazil, Cuba, India and Turkey (Figure 3).

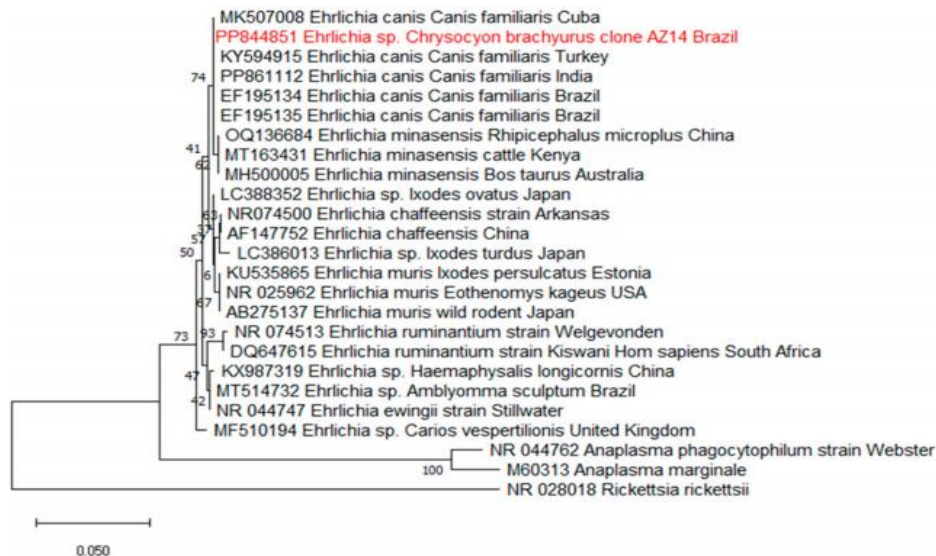


Figure 3. Phylogenetic tree based on an alignment of 630 bp of the *Ehrlichia* spp. 16S rRNA gene involving 25 nucleotide sequences, using the maximum likelihood method and K2 + G as an evolutionary model. The numbers at the branch nodes of the tree indicate bootstrap values from 1000 replications. The scale bar represents the evolutionary distance. The sequences detected in the present study are highlighted in red, with accession numbers provided in parentheses. *A. marginale*, *A. phagocytophilum* and *Rickettsia rickettsii* were used as outgroups.

Bartonella spp. were detected in 42.5% (17/40) of the animals (six howler monkeys (*Alouatta* spp.), two maned wolves, one gorilla, one white rhino, one southern tamandua (*Tamandua tetradactyla*), one common woolly monkey (*Lagothrix lagotricha*), one tufted capuchin, one brown brocket deer (*Subulo gouazoubira*), one agouti (*Dasyprocta* spp.), one cougar (*Puma concolor*) and one hippo. Six samples were selected for sequencing due to the good intensity of the bands observed in the electrophoresis gel and the different sizes of the bands according to the primers used. The sequences obtained ranged from 152 bp to 345 bp, with four sequences showing 94.59% to 100% similarity to *Bartonella clarridgeiae* (the gorilla, tufted capuchin, brown brocket deer and southern tamandua) and two sequences showing 99% similarity to *Bartonella henselae* (Two howler monkeys).

Phylogenetic analysis using maximum likelihood, based on the internal transcribed spacer 16–23S gene, grouped *Bartonella* spp. sequences detected in the gorilla, southern tamandua, capuchin monkey and brown brocket deer from this study into the same clade as *B. clarridgeiae* sequences from cats and fleas. However, *Bartonella* spp. sequences detected in two howler monkeys from this study clustered with *B. henselae* previously identified in cats, rodents, elephants, Fea's muntjacs and humans (Figure 4).

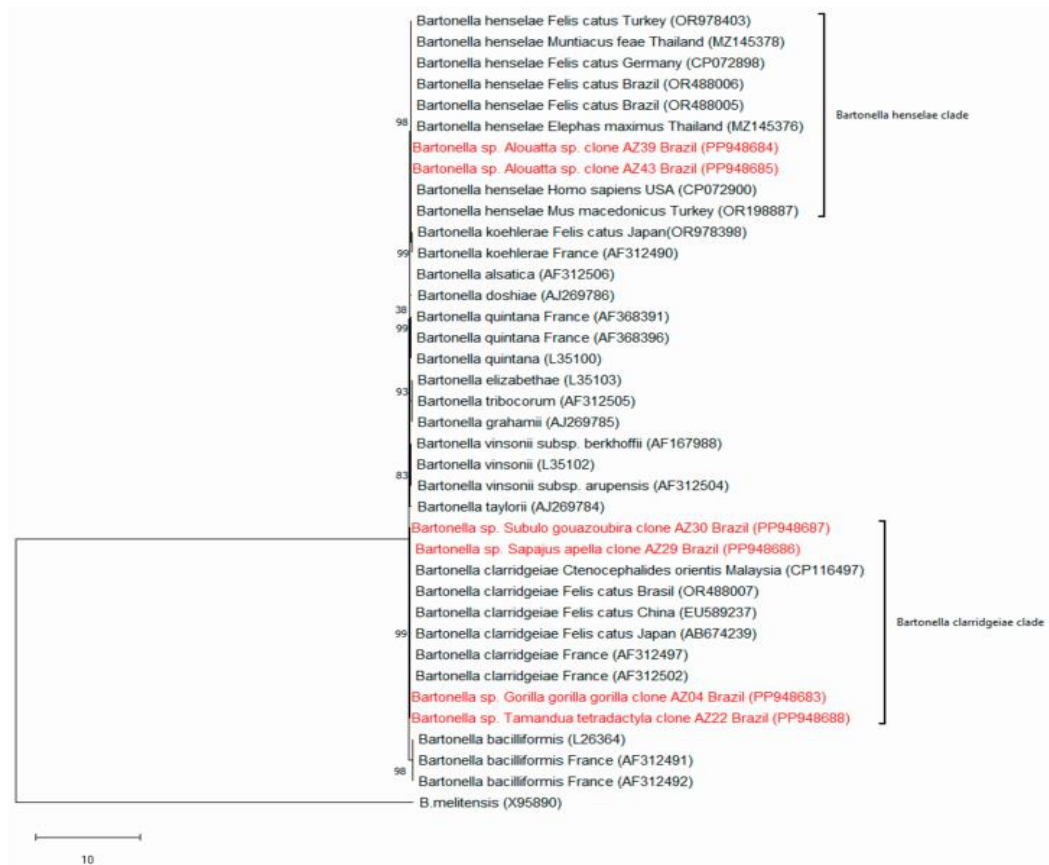


Figure 4. Phylogenetic tree based on an alignment of (~165 bp) bp of the *Bartonella* spp. 16S-23S rRNA intergenic region gene involving 38 nucleotide sequences, using the ML method and JC + G + I as an evolutionary model. The numbers at the branch nodes of the tree indicate bootstrap values from 1000 replications. The scale bar represents the evolutionary distance. The sequences detected in the present study are highlighted in red/underline, with accession numbers provided in parentheses. *Brucella melitensis* was used as an outgroup.

Hemotrophic *Mycoplasma* spp. were detected in 17.5% (7/40) of the animals, including one gorilla, one maned wolf, one white rhino, one howler monkey, two common woolly monkeys and one European fallow deer (*Dama dama*). Two cases were confirmed by sequencing as hemotropic *Mycoplasma* sp.: one in the howler monkeys, showing 99.84% identity with "*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*" detected in a cat (KR905451) sampled in Italy, and another in a woolly monkey, showing 99.11% identity with a *Mycoplasma* sp. detected in a howler monkey (MH734376) sampled in Brazil.

Finally, ML analyses of hemotropic *Mycoplasma* spp. grouped the sequences detected in this study into a large clade, the "*Mycoplasma suis* group," alongside sequences previously detected in various hosts from several countries, with 100% clade support (Figure 5). The sequence detected in the howler monkey was closely related to that of *Ca. Mycoplasma haemominutum*, which had been found in domestic cats from Brazil and Italy.

Meanwhile, the sequence detected in a woolly monkey was closely related to hemotropic *Mycoplasma* spp. found in howler monkeys from Brazil.

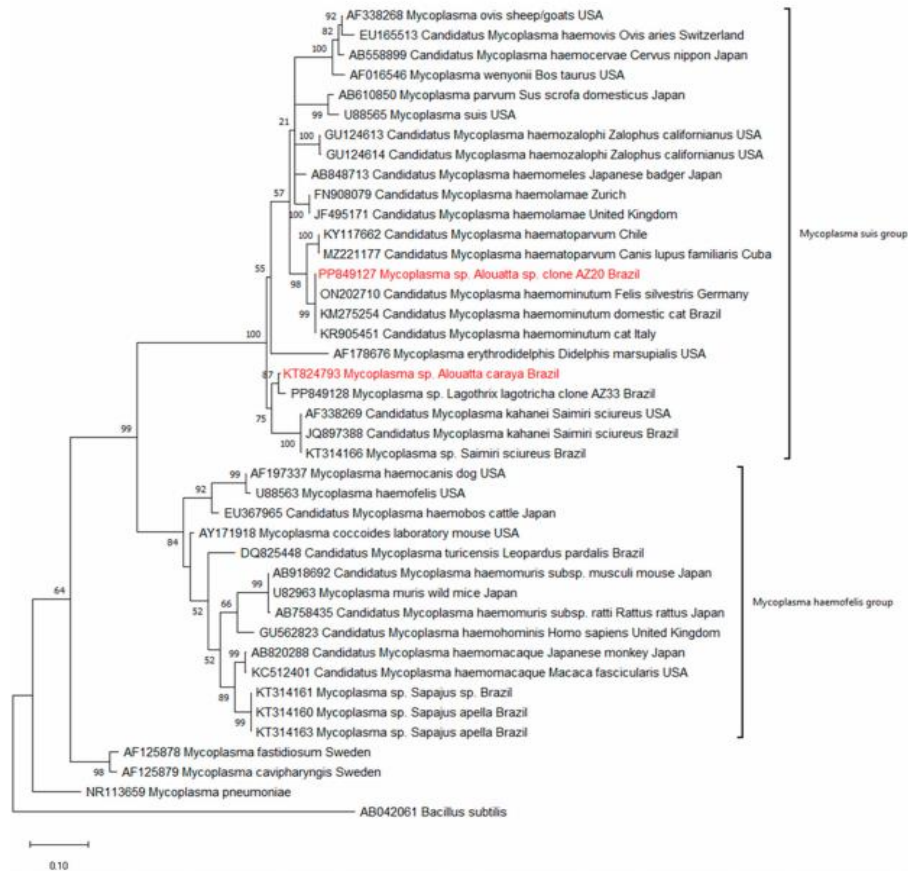


Figure 5. Phylogenetic tree based on an alignment of 600 bp of *Mycoplasma* spp. 16S rRNA gene involving 41 nucleotide sequences, using the ML method and GTR + G as an evolutionary model. The numbers at the branch nodes of the tree indicate bootstrap values from 1000 replications. The scale bar represents the evolutionary distance. The sequences detected in the present study are highlighted in red, with accession numbers provided in parentheses. *Mycoplasma pneumoniae* and *Bacillus subtilis* were used as outgroups.

Coinfections Detected

Of the 29 positive animals, 10 (34.5%) were coinfecting (five maned wolves, two gorillas, one white rhinoceros, one woolly monkey and one hippo). Six animals were coinfecting with two pathogens: one gorilla was coinfecting with piroplasmids and granulocytic/platelet *Anaplasma/Ehrlichia* spp., a single maned wolf was coinfecting with *Leishmania* spp. and *Bartonella* spp., two maned wolves were coinfecting with granulocytic/platelet *Anaplasma/Ehrlichia* spp. and *Leishmania* spp., a single woolly monkey was coinfecting with hemotropic *Mycoplasma* spp. and *Bartonella* spp. and one hippopotamus was coinfecting with piroplasmids and *Bartonella* spp. Four animals were coinfecting with

three pathogens: one gorilla and one white rhino were coinfecting with piroplasmids, hemotropic *Mycoplasma* spp. and *Bartonella* spp.; one maned wolf was coinfecting with granulocytic/platelet *Anaplasma/Ehrlichia* spp., hemotropic *Mycoplasma* spp. and *Leishmania* spp.; and one maned wolf was coinfecting with *Ehrlichia canis*, granulocytic/platelet *Anaplasma/Ehrlichia* spp. and *Bartonella* spp. (Table 3).

Table 3. Coinfections in captive mammals sampled at the Zoo of the Belo Horizonte Municipal Parks and Zoo-Botanical Foundation, Minas Gerais, Brazil between 2021 and 2023.

ID	Species	Granulocytic/Platelet <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> sp.	Monocytic <i>Ehrlichia</i> sp.	<i>Bartonella</i> sp.	Hemotropic <i>Mycoplasma</i> sp.	Piroplasmids	<i>Leishmania</i> spp.	Total Number of Pathogens Coinfected
AZ04	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	–	–	+	+	+	–	3
AZ05	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	+	–	–	–	+	–	2
AZ07	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	–	–	+	–	–	+	2
AZ11	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	+	–	–	+	–	+	3
AZ12	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	+	–	–	–	–	+	2
AZ13	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	+	–	–	–	–	+	2
AZ14	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	+	+	+	–	–	–	3
AZ19	<i>Ceratotherium simum</i>	–	–	+	+	+	–	3
AZ28	<i>Lagothrix lagotricha</i>	–	–	+	+	–	–	2
AZ46	<i>Hippopotamus amphibius</i>	–	–	+	–	+	–	2

+ Positive, – Negative.

4. Discussion

Vector-borne diseases involving various infectious agents, hosts and vectors are highly important to human and animal health. Disease surveillance and control in zoological environments are crucial for preventing outbreaks and protecting both the species on display and nearby human populations [43]. The study results demonstrated a high prevalence of vector-borne pathogens in wild mammals at the Belo Horizonte Zoo-Botanical Foundation, with 72.5% of the tested samples showing positivity for at least one vector-borne pathogen.

It is worth noting that Belo Horizonte is considered an endemic region for most of the agents studied, which corroborates the high occurrence described here. Since the first report of *E. canis* in the city, the pathogen has spread throughout the territory and is being found in various regions of Brazil [44]. Additionally, *A. platys* is endemic in Brazil, with the prevalence varying according to the geographic region, target population and diagnostic methods used [45]. A study conducted in Minas Gerais with Belo Horizonte as the coverage area reported a prevalence of 4.1% and 17.2% of *A. platys* in dry and rainy periods, respectively, both in rural areas, while a lower prevalence was observed in urban areas (5%). Regional and climatic variations directly affect vector population density, providing specific conditions that influence the dissemination of the agent [33].

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a significant public health issue in Belo Horizonte, Brazil, with domestic dogs being the main reservoir host for the causative parasite *Leishmania infantum* [46,47]. Studies have shown that a large portion, estimated at 40–60%, of seropositive dogs are asymptomatic carriers. These asymptomatic dogs can still harbor the parasite, especially on their skin, and contribute to the maintenance of the disease transmission cycle [48]. Furthermore, research in Belo Horizonte has identified a high percentage of infected dogs that were asymptomatic and PCR positive but seronegative, posing challenges for health authorities in implementing effective control measures [49]. The prevalence of CVL in the city's neighborhoods can vary widely, from 0 to 166.7 cases per 1000 dogs [47]. Spatial and temporal analyses have been used to identify priority areas for targeted surveillance and control efforts [46]. Human visceral leishmaniasis (HVL) cases in Belo Horizonte have also been found to be associated with canine seroprevalence and

the human-to-dog ratio, underscoring the importance of addressing the canine reservoir in reducing disease transmission to humans [49].

Despite strict regulations prohibiting the entry of domestic animals into the zoo, stray dogs and cats often infiltrate the area, potentially introducing ectoparasites and pathogens to captive animals [50]. This uncontrolled access increases the risk of transmission of vector-borne diseases, underscoring the importance of stringent biosecurity measures and continuous, comprehensive monitoring of both zoo and stray animals for the health of the captive population and potential public health risks.

For piroplasmids, 22.5% (9/40) of the tested animals were positive, with confirmed detections of *Theileria* sp. related to *T. bicornis* and *Cytauxzoon* sp. related to *C. felis*, indicating a diversity of piroplasma species infecting different hosts. The infection rates in our study align with the literature, which reports values ranging from 5.2% to 96.7% for piroplasms, including *Babesia* spp., *Theileria* spp. and *Cytauxzoon* spp., in wild mammals [51]. For instance, ref. [51] reported a 5.5% prevalence of piroplasms in free-ranging mammals of the Superorder Xenarthra from four Brazilian states, whereas another study in Brazil reported a prevalence of 26.3% (40/152) in wild mammals [52,53]. Ref. [53] reported a 96.7% prevalence in free-ranging jaguars [54]. These differences are possibly due to variations in host species, geographic location and environmental factors [55].

Theileria bicornis has been reported in black and white rhinoceroses in Africa, with implications for their health and conservation. *T. bicornis* infections can be fatal in rhinoceroses, particularly when combined with other stressors such as injury, pregnancy or translocation [56], while *C. felis* is known to infect felids such as jaguars in Brazil [57]. The available evidence strongly suggests that jaguars can act as reservoirs for *C. felis*, harboring and potentially transmitting the parasite to other susceptible hosts. Moreover, *C. felis* infections appear to be capable of causing fatal disease in jaguars, similar to the severe outcomes observed in domestic cats [58,59]. Despite its predominance in wild felids, cases of infection in domestic felids are increasing in Brazil [59].

In this study, we detected sequences of *Theileria* spp. in a 54-year-old female white rhinoceros originating from Africa, housed at the Belo Horizonte Zoo and donated from Germany. To date, there has not been a description of *T. bicornis* in this animal species in Brazil, suggesting that the animal arrived at the zoo with a pre-existing infection, although there are recent reports of a piroplasm with 91.8 to 93.6% identity with *T. bicornis* in bats [60]. Phylogenetic analysis grouped the sequences detected in our study in the same clade as sequences of *T. bicornis* identified in white and black rhinoceroses from Australia and South Africa [56,61]. The phylogenetic similarity between these sequences may indicate a common origin of these pathogens or transmission via vectors sharing a common habitat across these regions [62,63].

Furthermore, *Cytauxzoon* spp. sequences detected in jaguars were closely related to the sequences of *C. felis* found in jaguars, domestic cats and other wild felids from Brazil, South Africa and the United States. This finding supports the global distribution of this protozoan and indicates its ability to infect a variety of feline species across different geographic regions [54,58]. Although the pathogenicity of *Cytauxzoon* spp. genotypes found in Brazil is unknown, free-ranging jaguars likely play a crucial role in the survival of *C. felis* in the wild [54]. Therefore, continuous surveillance and monitoring of the spread of *C. felis* are important, especially in environments where multiple feline species coexist, such as in zoos [58].

The presence of *Leishmania* spp. in maned wolves is a significant finding, highlighting the zoonotic nature of this parasite [64]. Leishmaniasis, particularly visceral leishmaniasis, is a serious disease in both humans and animals. The presence of *Leishmania* spp. in maned wolves is consistent with findings in other wild canids, underscoring the epidemiology of this disease and the need for severe vector control techniques and continuous health monitoring to prevent outbreaks [65]. A study by Silveira et al. (2016) [63] reported a case of *Rangelia vitalii* in a free-ranging maned wolf, which also tested positive for *Leishmania* sp., among other pathogens [64]. Similarly, a study by Mol et al. (2015) [64]

demonstrated the transmissibility of *L. infantum* from maned wolves to the invertebrate vector *Lutzomyia longipalpis*, further emphasizing the role of wildlife in the epidemiology of leishmaniasis [65].

The detection of granulocytic/platelet *Anaplasma/Ehrlichia* spp. in 12.5% of the studied animals is consistent with previous reports of infections in wild and captive animals. Studies conducted by Calchi et al. (2020) and Pereira et al. (2016) [7,66] reported similar prevalences in wild animals in Brazil (*Xenarthra* mammals) and Portugal (cervids and wild boars), with prevalence rates of 27.57% and 24.82%, respectively. The unsuccessful amplification of DNA from *A. phagocytophilum* and *A. platys* might indicate the presence of *Anaplasma* species or genetic variants not detectable by the primers used, limited PCR sensitivity or a low parasitic load in the samples [67]. Previous studies have documented similar challenges in the molecular detection of *Anaplasma* species, where primer specificity and parasitic load significantly influence the success of amplification [68]. Although the DNA of *A. marginale* in members of the Artiodactyla order was not amplified in this study, this pathogen has already been detected in South American deer from Brazil [14].

The identification of *E. canis* in the maned wolf supports the hypothesis that stray dogs may act as carriers of arthropod-borne pathogens to captive wild animals. Serological and molecular studies have detected the antibodies and DNA of *E. canis* in free-ranging maned wolves in Brazil, indicating serious health risks due to the severe nature of ehrlichiosis [69]. Despite being collected from a maned wolf, a wild carnivore native to South America, the results showed a close phylogenetic relationship with strains found in domestic dogs (*C. familiaris*) from Brazil, Cuba, India and Turkey, underscoring their global distribution and the importance of disease surveillance and control. From a taxonomic perspective, the close phylogenetic relationship suggested that the sample may belong to the same species or a species closely related to *E. canis* [70].

This study detected *Bartonella* spp. in 42.5% (17/40) of the animals, including a variety of species. This finding aligns with previous research indicating a significant incidence of *Bartonella* in various mammalian species, both in wild and captive habitats [71,72]. The prevalence in this study is consistent with the findings of Rao et al. (2021) [73], who reported significant proportions of *Bartonella* (38.61%) among small mammals in the Qaidam Basin, western China. A study in Italian Nature Reserve Parks detected *Bartonella* infection in 97 red foxes, eight European badgers, six Eurasian wolves, six European hedgehogs, three beech martens and two deer. The prevalence was 9.84%, with zoonotic species detected in wolves (83.3%), hedgehogs (33.33%) and foxes (4.12%) [73]. *Bartonella rochalimae* was the most common species found in foxes and wolves. Zoonotic species were significantly more frequent in Eurasian wolves ($p < 0.0001$), indicating that they may be reservoirs for infection in humans and domestic animals [74]. In Brazil, several studies have investigated the occurrence of *Bartonella* in wild and domestic animals, revealing a wide diversity of genotypes and potential zoonotic risks [72,75].

ITS phylogenetic analysis grouped *B. clarridgeiae* sequences from cats and fleas with our sequences from gorillas, southern tamanduas, capuchin monkeys and brocket deer. Conversely, *B. henselae* sequences from cats, deer, rodents and humans clustered with our sequences from howler monkeys. These findings expand the known host range for *B. clarridgeiae* and *B. henselae*, suggesting potential underestimation of their prevalence in captive animals [29]. Despite the small sequences used for constructing the phylogeny, it was possible to distinguish between the species. The ITS gene, a noncoding region of ribosomal DNA, varies between *Bartonella* species, enabling their molecular differentiation [76].

Our study revealed a 17.5% prevalence of hemotropic *Mycoplasma* spp. among tested animals infected with multiple species. These bacteria have been detected in numerous nonhuman primates and captive mammals globally [77,78]. In Brazil, several investigations have focused on hemoplasma infections across diverse animal populations. For instance, captive *Allouata* in São Paulo's zoos exhibited a 26.47% positivity rate for hemoplasmas [79], while captive wild carnivores showed high prevalence rates, such as 45.5% in wild felids and 83.3% in wild canids [80]. Moreover, studies involving non-human primates, both

captive and free-ranging, reported an infection rate of 25%, with notable prevalence among black howler monkeys (64.3%) and black-horned capuchins (4.2%) [77]. In the southern Pantanal region, *Mycoplasma* spp. infections were detected in various wild mammals, including *Nasua nasua*, *Cercopithecus thous* and *Leopardus pardalis*, indicating exposure to multiple hemoplasma species [10].

Moreover, our study identified hemotropic *Mycoplasma* spp. in *D. dama*, consistent with previous findings in cervids by André et al. (2020) [80], who reported these bacteria in 40% of free-ranging deer in Brazil, broadening our understanding of hemoplasma distribution in deer populations [81]. These results underscore the importance of further research to elucidate the ecology of these pathogens in captive populations, aligning with the One Health concept, given reports of infection in immunocompromised humans.

Phylogenetic analysis revealed that the sequences identified in this study for hemotropic *Mycoplasma* species are phylogenetically closely related to those of the *M. suis* group. Previous research has demonstrated that hemotropic *Mycoplasma* species form specific evolutionary groups based on their hosts. The placement of the sequences detected in non-human primates within the “*M. suis* group” clade is consistent with this pattern, suggesting a common ancestor between the species that infect NHPs and other animals, reflecting possible specific adaptations to their hosts [82]. Although “*Ca. M. haemominutum*” was detected by 16S rRNA cPCR in the howler monkeys, presumably, this cPCR assay revealed a sequence of the novel *Mycoplasma* sp. because several regions of homology may be found with “*Ca. M. haemominutum*” sequences [77]. The 16S rRNA gene can show 99% homology with sequences of other pathogenic *Mycoplasma* species from different hosts, suggesting a close relationship between the species. However, when other genes are used for molecular characterization, little identity is observed, indicating that they are different species. Therefore, it is necessary to characterize isolates using multiple genes to investigate genetic diversity and accurately determine the species [4,83].

The tree showed that the sequence detected in a captive woolly monkey in the Belo Horizonte Zoo, Minas Gerais, clustered within a clade with hemotropic *Mycoplasma* spp. detected in howler monkeys from southern Brazil. This suggests a possible relationship between the pathogens in different species of Neotropical primates and indicates that these hemoplasmas occur in close geographic locations [77,79]. Furthermore, phylogenetic trees have shown an evident separation of the hemoplasma detected in the woolly monkey from “*Ca. M. kahanei*” was found in squirrel monkeys in Brazil, and hemotropic *Mycoplasma* spp. were detected in *S. apella* in Brazil, indicating the presence of different species, an event that has been previously reported [77,79].

Our study revealed a high prevalence (34.7%) of coinfections by vector-borne pathogens in mammals at the Belo Horizonte Zoo, Brazil. Perles et al. (2023) [4] reported that only a small percentage (8.1%) of the studied animals tested negative for the evaluated agents, with bacterial coinfections being the most common (18.3%), particularly involving *Mycoplasma* spp. and *Bartonella* spp. Comparing it with our findings, we see those coinfections with bacterial pathogens, especially *Mycoplasma* spp. and *Bartonella* spp., are prevalent in both studies. Although vector-borne infections often remain subclinical in wild animals, they may act as opportunistic pathogens in immunocompromised animals under stressful conditions or in the presence of coinfections [4].

For example, hemotropic *Mycoplasma* species can cause severe anemia in cats with concurrent FeLV infection or immunosuppression [4,84]. Coinfections can complicate diagnosis and treatment and worsen prognosis in animals. In a study on cats, 22 out of 624 (4%) tested positive for more than one vector-borne pathogen, with nine cats infected with *Hepatozoon* spp. having antibodies against *Leishmania* spp., *Rickettsia* spp. and *Ehrlichia* spp. [84]. Additionally, the authors of [63] reported a fatal case of parasite coinfection in a threatened maned wolf from Minas Gerais, Brazil [64].

The detection of possible reservoirs of zoonotic pathogens in wildlife is crucial to public health because it allows us to anticipate and prevent the spread of diseases between animals and humans, in line with the concept of *One Health*. In a study conducted in

Switzerland, antibodies against SARS-COV-2 were found in red foxes, Eurasian lynxes and wild cats, indicating that these animals were exposed to the virus, but without signs of active infection [85]. Similarly, our research at the Belo Horizonte Zoo found a significant incidence of zoonotic infections such as *Bartonella* spp., *Mycoplasma* spp. and *Leishmania* spp. in captive mammals, reinforcing the potential risk of disease transmission between animals and humans. These results emphasize the importance of continually monitoring the circulation of zoonotic pathogens in different animal environments to preserve public health and prevent future pandemics.

Our study demonstrated that wild and exotic animals kept in zoos are also at risk of infection with several species of vector-borne pathogens. Our findings showed the high prevalence of these agents that infect and coinfect mammals at the Belo Horizonte Zoo in Brazil, reinforcing the urgent need to improve control measures, including vector control strategies and routine parasitological examinations, to protect animal health and prevent the spread of diseases, while advancing our understanding of parasite–host dynamics in animals, benefiting both public health and wildlife conservation.

Limitations of the present study should be considered. A notable limitation of the present study is that the phylogeny was based on a small fragment (165 to 630 bp) of a conserved gene, which precluded additional phylogenetic inferences to confirm species identification, potentially limiting the resolution of our analyses. Unfortunately, it was not possible to sequence more samples or amplify other gene targets to evaluate the genetic diversity between the vector-borne pathogens. Additionally, short-read sequencing platforms targeting regions of 16S *rRNA* or 18S *rRNA* may not achieve complete taxonomic resolutions consistently obtained through whole-genome sequencing [84]. Future studies should prioritize larger sample sizes and more detailed genetic analyses, including the use of other genes, to improve our understanding of phylogenetic relationships and species differentiation [86].

Although this study identified several pathogens in captive mammals in Brazil, it was not possible to evaluate all pathogens of interest, such as *Toxoplasma gondii*. Detection of *T. gondii* requires specific methods that were not implemented in this study. We recognize the importance of *T. gondii* in wildlife parasitology and public health studies due to its zoonotic potential and significant impact on domestic and wild animals [87,88]. Future research should include the evaluation of this and other relevant pathogens to provide a more comprehensive understanding of the epidemiology of parasitic diseases in captive environments.

Author Contributions: A.P.C.: Conceptualization, investigation, methodology, analysis, formal analysis, data curation, writing—original draft, writing, reviewing and editing. N.C.: Methodology, analysis, writing—review and editing. P.H.C.R.: Methodology, analysis, writing—review and editing. J.V.O.M.: Resources, writing the original draft, writing the review and editing. P.C.S.L.: Methodology. R.O.C.M.: Methodology. H.P.T.: Methodology. C.M.C.: Resources, investigation, supervision and funding acquisition. J.A.G.d.S.: Conceptualization, resources, investigation, supervision, funding acquisition, review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG (APQ-00708–21 and APQ-02531–24), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq and Universidade Federal de Minas Gerais.

Institutional Review Board Statement: All procedures were conducted in accordance with relevant guidelines and regulations. The samples were collected after the signing of a partnership agreement between the Federal University of Minas Gerais (UFMG) and the Municipal Parks and Zoo-botanical Foundation (FPMZB) in strict compliance with applicable ethical guidelines. Samples were sent for analysis to the Veterinary Protozoology Laboratory—ProtoVet, as part of the service provided to FPMZB under the code Siex-UFMG 302557—“Diagnosis and control of hemoparasites in domestic and wild animals”.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: Special thanks are extended to all employees of the laboratory PROTOVET, Residents in Public Health with emphasis on human and wildlife health interfaces, and to the mammal management team at the Municipal Parks and Zoo-Botanical Foundation—FPMZB—in Belo Horizonte.

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

References

- Li, H.; Chen, Y.; Machalaba, C.C.; Tang, H.; Chmura, A.A.; Fielder, M.D.; Daszak, P. Wild animal and zoonotic disease risk management and regulation in China: Examining gaps and One Health opportunities in scope, mandates, and monitoring systems. *One Health* **2021**, *13*, 100301. [CrossRef] [PubMed]
- Ferdous, S.; Chowdhury, J.; Hasan, T.; Dutta, P.; Rahman, M.; Hassan, M.M.; Faruque, R.; Alim, M.A. Prevalence of gastrointestinal parasitic infections in wild mammals of a safari park and a zoo in Bangladesh. *Vet. Med. Sci.* **2023**, *9*, 1385–1394. [CrossRef] [PubMed]
- Panayotova-Pencheva, M.S. Parasites in captive animals: A review of studies in some European zoos. *Der Zool. Gart.* **2013**, *82*, 60–71. [CrossRef]
- Perles, L.; Moraes, M.F.; da Silva, M.X.; Vieira, R.F.C.; Machado, R.Z.; Hoppe, E.G.L.; André, M.R. Co-infection by multiple vector-borne agents in wild ring-tailed coatis (*Nasua nasua*) from Iguaçu National Park, southern Brazil. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 1828. [CrossRef]
- Iatta, R.; Natale, A.; Ravagnan, S.; Mendoza-Roldan, J.; Zattelli, A.; Cavallera, M.A.; Nachum-Biala, Y.; Baneth, G.; Otranto, D. Zoonotic and vector-borne pathogens in tigers from a wildlife safari park, Italy. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **2020**, *12*, 250–325. [CrossRef]
- Almazán, C.; Scimeca, R.C.; Reichard, M.V.; Mosqueda, J. Babesiosis and Theileriosis in North America. *Pathogens* **2022**, *11*, 168. [CrossRef]
- Calchi, A.C.; Vultão, J.G.; Alves, M.H.; Yogui, D.R.; Desbiez, A.L.J.; De Santi, M.; de Souza Santana, M.; Da Silva, T.M.V.; Werther, K.; Teixeira, M.M.G.; et al. *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in Xenarthra mammals from Brazil, with evidence of novel ‘*Candidatus anaplasma* spp.’. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 12615. [CrossRef]
- Da Silveira, J.A.G.; Moreira, S.M.; Nascimento, A.F.D.; de Oliveira, M.M.; dos Santos, H.A.; Estevam, L.G.T.d.M.; Pereira, C.R.; Oliveira, A.G.G.; D’elia, M.L.; Araujo, A.d.C.; et al. Preparing Collared Peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) for Reintroduction into the Wild: A Screening for Parasites and Hemopathogens of a Captive Population. *Pathogens* **2024**, *13*, 47. [CrossRef]
- Harms, C.A.; Maggi, R.G.; Breitschwerdt, E.B.; Clemons-Chevis, C.L.; Solangi, M.; Rotstein, D.S.; Fair, P.A.; Hansen, L.J.; Hohn, A.A.; Lovewell, G.N.; et al. Bartonella species detection in captive, stranded and free-ranging cetaceans. *Vet. Res.* **2008**, *39*, 59. [CrossRef]
- De Sousa, K.C.M.; Herrera, H.M.; Secato, C.T.; Oliveira, A.D.V.; Santos, F.M.; Rocha, F.L.; Barreto, W.T.G.; Macedo, G.C.; Pinto, P.C.E.d.A.; Machado, R.Z.; et al. Occurrence and molecular characterization of hemoplasmas in domestic dogs and wild mammals in a Brazilian wetland. *Acta Trop.* **2017**, *171*, 172–181. [CrossRef]
- Mathieu, A.; Pastor, A.R.; Berkvens, C.N.; Gara-Boivin, C.; Hébert, M.; Léveillé, A.N.; Barta, J.R.; Smith, D.A. *Babesia odocoilei* as a cause of mortality in captive cervids in Canada. *Can. Vet. J.* **2018**, *59*, 52–58. [PubMed]
- Luppi, M.M.; Malta, M.C.; Silva, T.M.; Silva, F.L.; Motta, R.O.; Miranda, I.; Ecco, R.; Santos, R.L. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Vet. Parasitol.* **2008**, *155*, 146–151. [CrossRef] [PubMed]
- Fleischman, D.A.; Chomel, B.B.; Kasten, R.W.; André, M.R.; Gonçalves, L.R.; Machado, R.Z. *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* exposure in captive wild canids in Brazil. *Epidemiol. Infect.* **2015**, *143*, 573–577. [CrossRef] [PubMed]
- Silveira, J.A.; Rabelo, E.M.; Ribeiro, M.F. Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). *Transbound. Emerg. Dis.* **2012**, *59*, 353–360. [CrossRef] [PubMed]
- Yamamoto, K.; Chomel, B.B.; Lowenstine, L.J.; Kikuchi, Y.; Phillips, L.G.; Barr, B.C.; Swift, P.K.; Jones, K.R.; Riley, S.P.D.; Kasten, R.W.; et al. *Bartonella henselae* antibody prevalence in free-ranging and captive wild felids from California. *J. Wildl. Dis.* **1998**, *34*, 56–63. [CrossRef]
- Millán, J.; Di Cataldo, S.; Volokhov, D.V.; Becker, D.J. Worldwide occurrence of hemoplasmas in wildlife: Insights into the patterns of infection, transmission, pathology, and zoonotic potential. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *68*, 3236–3256. [CrossRef]
- Prefeitura de Belo Horizonte; Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica. Belo Horizonte. PBH. Available online: <https://prefeitura.pbh.gov.br/fundacao-de-parques-e-zoobotanica> (accessed on 15 November 2024).
- Birkenheuer, A.J.; Levy, M.G.; Breitschwerdt, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 4172–4177. [CrossRef]
- Massung, R.F.; Slater, K.; Owens, J.H.; Nicholson, W.L.; Mather, T.N.; Solberg, V.B.; Olson, J.G. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 1090–1095. [CrossRef]
- Kawahara, M.; Tajima, T.; Torii, H.; Yabutani, M.; Ishii, J.; Harasawa, M.; Isogai, E.; Rikihisa, Y. *Ehrlichia chaffeensis* infection of sika deer, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 1991–1993. [CrossRef]

21. De la Fuente, J.; Massung, R.F.; Wong, S.J.; Chu, F.K.; Lutz, H.; Meli, M.; von Loewenich, F.D.; Grzeszczuk, A.; Torina, A.; Caracappa, S.; et al. Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 1309–1317. [\[CrossRef\]](#)
22. Bown, K.J.; Lambin, X.; Ogden, N.H.; Petrovec, M.; Shaw, S.E.; Woldehiwet, Z.; Birtles, R.J. High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 1771–1776. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. De la Fuente, J.; Ruiz-Fons, F.; Naranjo, V.; Torina, A.; Rodríguez, O.; Gortázar, C. Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Res. Vet. Sci.* **2008**, *84*, 382–386. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Ramos, C.A.N.; Ramos, R.A.N.; Araújo, F.R.; Júnior, D.S.G.; Souza, I.I.F.; Ono, T.M.; Pimentel, D.S.; Rosas, E.O.; Faustino, M.A.G.; Alves, L.C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2009**, *18*, 58–62. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Zahler, M.; Rinder, H.; Schein, E.; Gothe, R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Vet. Parasitol.* **2000**, *89*, 241–248. [\[CrossRef\]](#)
26. Silveira, J.A.; Rabelo, E.M.; Ribeiro, M.F. Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.* **2011**, *177*, 61–66. [\[CrossRef\]](#)
27. Birkenheuer, A.J.; Marr, H.; Alleman, A.R.; Levy, M.G.; Breitschwerdt, E.B. Development and evaluation of a PCR assay for the detection of *Cytauxzoon felis* DNA in feline blood samples. *Vet. Parasitol.* **2006**, *137*, 144–149. [\[CrossRef\]](#)
28. Schöni, G.; Nasereddin, A.; Dinse, N.; Schweynoch, C.; Schallig, H.D.; Presber, W.; Jaffe, C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2003**, *47*, 349–358. [\[CrossRef\]](#)
29. Jensen, W.A.; Fall, M.Z.; Rooney, J.; Kordick, D.L.; Breitschwerdt, E.B. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 1717–1722. [\[CrossRef\]](#)
30. Criado-Fornelio, A.; Martínez-Marcos, A.; Buling-Saraña, A.; Barba-Carretero, J.C. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: A molecular study. *Vet. Microbiol.* **2003**, *93*, 307–317. [\[CrossRef\]](#)
31. Bastos, C.; Passos, L.; Facury-Filho, E.; Rabelo, E.; de la Fuente, J.; Ribeiro, M. Protection in the absence of exclusion between two Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* in experimentally infected calves. *Vet. J.* **2010**, *186*, 374–378. [\[CrossRef\]](#)
32. Moreira, S.M. Estudo retrospectivo (1998–2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte: Avaliação clínica e laboratorial de infecções experimentais. Master's Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 2001. Available online: <http://hdl.handle.net/1843/BUOS-8C8DX2> (accessed on 15 November 2024).
33. Costa, V.M.d.M.; Ribeiro, M.F.B.; Duarte, A.L.L.; Manguiera, J.M.; Pessoa, A.F.A.; Azevedo, S.S.; de Barros, A.T.M.; Riet-Correa, F.; Labruna, M.B. Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and trypanosomiasis in a Brazilian semiarid region. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2013**, *22*, 207–213. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Castillo, A.P.; Miranda, J.V.O.; Fonseca, P.L.C.; Silva, S.d.O.; Lopes, R.E.N.; Spanhol, V.C.; Moreira, R.G.; Nicolino, R.R.; Queiroz, D.C.; Santos, L.C.G.d.A.e.; et al. Evidence of SARS-CoV-2 infection and co-infections in stray cats in Brazil. *Acta Trop.* **2024**, *249*, 107056. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Hall, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98. Available online: https://www.academia.edu/2034992/BioEdit_a_user_friendly_biological_sequence_alignment_editor_and_analysis_program_for_Windows_95_98_NT (accessed on 15 November 2024).
36. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [\[CrossRef\]](#)
37. Katoh, K.; Standley, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 772–780. [\[CrossRef\]](#)
38. Nei, M.; Kumar, S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*; Oxford University Press: New York, NY, USA, 2000.
39. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **1980**, *16*, 111–120. [\[CrossRef\]](#)
40. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027. [\[CrossRef\]](#)
41. Jukes, T.H.; Cantor, C.R. Evolution of Protein Molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*; Munro, H., Ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 1969; Volume III, Chapter 24; pp. 21–132.
42. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evol. Int. J. Org. Evol.* **1985**, *39*, 783–791. [\[CrossRef\]](#)
43. Robinette, C.; Saffran, L.; Ruple, A.; Deem, S. Zoos and public health: A partnership on the One Health frontier. *One Health* **2016**, *3*, 1–4. [\[CrossRef\]](#)
44. Silveira, J.A.; Valente, P.C.; Paes, P.R.; Vasconcelos, A.V.; Silvestre, B.T.; Ribeiro, M.F. The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2015**, *6*, 242–245. [\[CrossRef\]](#)
45. Lasta, C.S.; dos Santos, A.P.; Messick, J.B.; Oliveira, S.T.; Biondo, A.W.; Vieira, R.F.d.C.; Dalmolin, M.L.; González, F.H.D. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2013**, *22*, 360–366. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. De Arruda, R.M.F.; Cardoso, D.T.; Teixeira-Neto, R.G.; Barbosa, D.S.; Ferraz, R.K.; Morais, M.H.F.; Belo, V.S.; da Silva, E.S. Space-time analysis of the incidence of human visceral leishmaniasis (VL) and prevalence of canine VL in a municipality of southeastern Brazil: Identification of priority areas for surveillance and control. *Acta Trop.* **2019**, *197*, 105052. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

47. Lopes, J.V.; Michalsky, M.; Pereira, N.C.L.; de Paula, A.J.V.; Souza, A.G.M.; Pinheiro, L.C.; Lima, A.C.V.M.d.R.; de Avelar, D.M.; França-Silva, J.C.; Lanzetta, V.A.S.; et al. Canine visceral leishmaniasis in area with recent Leishmania transmission: Prevalence, diagnosis, and molecular identification of the infecting species. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2020**, *53*, e20200141. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Xavier, S.; Chiarelli, I.; Lima, W.; Gonçalves, R.; Tafuri, W. Canine visceral leishmaniasis: A remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **2006**, *58*, 944–1000. [\[CrossRef\]](#)
49. De Fraga, A.P.; da Silva, V.P.; Salla, P.d.F.; Goulart, F.G.d.O.; Streck, A.F.; Pereira, V.R.Z.B.; de Mello, L.S.; Fonseca, A.S.K.; Ikuta, N.; Lunge, V.R. Canine Leishmaniasis in Southern Brazil: Diagnosis and Clinical Features in Domestic Dogs. *Zoonotic Dis.* **2024**, *4*, 114–122. [\[CrossRef\]](#)
50. André, M.R.; Denardi, N.C.B.; de Sousa, K.C.M.; Gonçalves, L.R.; Henrique, P.C.; Ontivero, C.R.G.R.; Gonzalez, I.H.L.; Nery, C.V.C.; Chagas, C.R.F.; Monticelli, C.; et al. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2014**, *5*, 545–551. [\[CrossRef\]](#)
51. Calchi, A.C.; Yogui, D.R.; Alves, M.H.; Desbiez, A.L.J.; Kluyber, D.; Vultão, J.G.; Arantes, P.V.C.; de Santi, M.; Werther, K.; Teixeira, M.M.G.; et al. Molecular detection of piroplasmids in mammals from the Superorder Xenarthra in Brazil. *Parasitol. Res.* **2023**, *122*, 3169–3180. [\[CrossRef\]](#)
52. Fava, N.M.N.; Alves, T.S.; Lopes, M.G.; Labruna, M.B.; Santos, A.Q.; Cury, M.C. Occurrence and Molecular Identification of Hemoparasites in Wild Mammals Kept in Rehabilitation Centers in Brazil. *Acta Parasitol.* **2022**, *67*, 476–486. [\[CrossRef\]](#)
53. Furtado, M.M.; Taniwaki, S.A.; Metzger, B.; Paduan, K.d.S.; O'dwyer, H.L.; Jácomo, A.T.d.A.; Porfírio, G.E.; Silveira, L.; Sollmann, R.; Tôres, N.M.; et al. Is the free-ranging jaguar (*Panthera onca*) a reservoir for *Cytauxzoon felis* in Brazil? *Ticks Tick-Borne Dis.* **2017**, *8*, 470–476. [\[CrossRef\]](#)
54. McNew, S.M.; Barrow, L.N.; Williamson, J.L.; Galen, S.C.; Skeen, H.R.; DuBay, S.G.; Gaffney, A.M.; Johnson, A.B.; Bautista, E.; Ordoñez, P.; et al. Contrasting drivers of diversity in hosts and parasites across the tropical Andes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2010714118. [\[CrossRef\]](#)
55. Otiende, M.Y.; Kivata, M.W.; Makumi, J.N.; Mutinda, M.N.; Okun, D.; Kariuki, L.; Obanda, V.; Gakuya, F.; Mijele, D.; Soriguer, R.C.; et al. Epidemiology of *Theileria bicornis* among black and white rhinoceros metapopulation in Kenya. *BMC Vet. Res.* **2015**, *11*, 4. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Silva, V.L.d.B.; de Almeida, S.L.H.; Maia, M.O.; Santos, T.; Pavelegini, L.A.D.; Zaffalon, G.B.; Marcili, A.; Morgado, T.O.; Dutra, V.; Nakazato, L.; et al. Post mortem protozoan hemoparasites detection in wild mammals from Mato Grosso state, Midwestern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2021**, *30*, e013021. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Guizelini, C.C.; Nascimento, C.A.; Echeverria, J.T.; Soares, R.L.; Pimenta, M.M.; de Deco-Souza, T.; Esteves, F.C.; Gomes, D.C. Fatal infection caused by *Cytauxzoon felis* in a captive-reared jaguar (*Panthera onca*). *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **2021**, *16*, 187–190. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Fenelon, A.C.G.; da Hora, A.S.; da Silva, K.L.; de Oliveira, G.H.B.; Gonçalves, M.S.e.S.; Pastor, F.M.; Barbosa, F.C.; Siqueira, M.T.S.; Rosalinski-Moraes, F. Co-infection of *Cytauxzoon felis*, *Mycoplasma haemofelis*, and the feline immunodeficiency virus in a domestic cat in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* **2023**, *60*, e210131. [\[CrossRef\]](#)
59. Ikeda, P.; Menezes, T.R.; Torres, J.M.; de Oliveira, C.E.; Lourenço, E.C.; Herrera, H.M.; Machado, R.Z.; André, M.R. First molecular detection of piroplasmids in non-hematophagous bats from Brazil, with evidence of putative novel species. *Parasitol. Res.* **2021**, *120*, 301–310. [\[CrossRef\]](#)
60. Yam, J.; Gestier, S.; Bryant, B.; Campbell-Ward, M.; Bogema, D.; Jenkins, C. The identification of *Theileria bicornis* in captive rhinoceros in Australia. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **2017**, *7*, 85–89. [\[CrossRef\]](#)
61. Otiende, M.Y.; Kivata, M.W.; Jowers, M.J.; Makumi, J.N.; Runo, S.; Obanda, V.; Gakuya, F.; Mutinda, M.; Kariuki, L.; Alasaad, S. Three Novel Haplotypes of *Theileria bicornis* in Black and White Rhinoceros in Kenya. *Transbound. Emerg. Dis.* **2016**, *63*, e144–e150. [\[CrossRef\]](#)
62. Sivakumar, T.; Fujita, S.; Tuvshintulga, B.; Kothalawala, H.; Silva, S.S.P.; Yokoyama, N. Discovery of a new *Theileria* sp. closely related to *Theileria annulata* in cattle from Sri Lanka. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 16132. [\[CrossRef\]](#)
63. Silveira, J.A.G.; D'Elia, M.L.; Avelar, I.d.O.; de Almeida, L.R.; dos Santos, H.A.; Soares, D.F.d.M.; Ribeiro, M.F.B.; Lima, W.d.S.; Ecco, R. *Rangelia vitalii* in a free-ranging maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and co-infections. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **2016**, *5*, 280–285. [\[CrossRef\]](#)
64. Mol, J.P.; Soave, S.A.; Turchetti, A.P.; Pinheiro, G.R.; Pessanha, A.T.; Malta, M.C.; Tinoco, H.P.; Figueiredo, L.A.; Gontijo, N.F.; Paixão, T.A.; et al. Transmissibility of *Leishmania infantum* from maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) and bush dogs (*Speothos venaticus*) to *Lutzomyia longipalpis*. *Vet. Parasitol.* **2015**, *212*, 86–91. [\[CrossRef\]](#)
65. Schäfer, I.; Kohn, B.; Volkmann, M.; Müller, E. Retrospective evaluation of vector-borne pathogens in cats living in Germany (2012–2020). *Parasites Vectors* **2021**, *14*, 123. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Pereira, A.; Parreira, R.; Nunes, M.; Casadinho, A.; Vieira, M.L.; Campino, L.; Maia, C. Molecular detection of tick-borne bacteria and protozoa in cervids and wild boars from Portugal. *Parasites Vectors* **2016**, *9*, 251. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Kolo, A.O.; Collins, N.E.; Brayton, K.A.; Chaisi, M.; Blumberg, L.; Frean, J.; Gall, C.A.; Wentzel, J.M.; Wills-Berriman, S.; De Boni, L.; et al. *Anaplasma phagocytophilum* and Other *Anaplasma* spp. in Various Hosts in the Mnisi Community, Mpumalanga Province, South Africa. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1812. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

68. Salazar, A.; Ochoa-Corona, F.M.; Talley, J.L.; Noden, B.H. Recombinase polymerase amplification (RPA) with lateral flow detection for three *Anaplasma* species of importance to livestock health. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 15962. [\[CrossRef\]](#)
69. Gomes, P.D.; Hirano, L.Q.L.; de Paula, R.C. Epidemiological survey of infectious agents in free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) in Northeastern Brazil. *Braz. J. Microbiol.* **2024**, *55*, 933–941. [\[CrossRef\]](#)
70. Nasr, A.; Ghafar, M.; El hariri, M. Detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks attached to dogs from Egypt; a public health concern. *Vet. Med. J.* **2020**, *66*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
71. Luo, Y.Y.; Yu, D.; Zhang, H.Z.; Liu, Z.X.; Hong, R.D.; Hong, M.; Ai, Z.Q.; Zhu, J.J.; Yin, J.X. Molecular detection of *Bartonella* species in wild small mammals in western Yunnan Province, China. *Front. Vet. Sci.* **2023**, *10*, 1301316. [\[CrossRef\]](#)
72. Mongruel, A.C.B.; Medici, E.P.; Canena, A.d.C.; Dias, C.M.; Machado, R.Z.; André, M.R. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in wild lowland tapirs (*Tapirus terrestris*), the largest land mammals in Brazil. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2023**, *101*, 102042. [\[CrossRef\]](#)
73. Rao, H.; Li, S.; Lu, L.; Wang, R.; Song, X.; Sun, K.; Shi, Y.; Li, D.; Yu, J. Genetic diversity of *Bartonella* species in small mammals in the Qaidam Basin, western China. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1735. [\[CrossRef\]](#)
74. Greco, G.; Zarea, A.A.K.; Sgroi, G.; Tempesta, M.; D'alessio, N.; Lanave, G.; Bezerra-Santos, M.A.; Iatta, R.; Veneziano, V.; Otranto, D.; et al. Zoonotic *Bartonella* species in Eurasian wolves and other free-ranging wild mammals from Italy. *Zoonoses Public Health* **2021**, *68*, 316–326. [\[CrossRef\]](#)
75. Pacheco, T.d.A.; Amaral, R.B.D.; Ikeda, P.; Maia, M.O.; Lee, D.A.B.; Semedo, T.B.F.; de Mendonça, R.F.B.; Pedroni, F.; Horta, M.C.; Rossi, R.V.; et al. Molecular detection and characterization of *Bartonella* spp. in small mammals in the Amazonia and Cerrado biomes, midwestern Brazil. *Acta Trop.* **2024**, *251*, 107129. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Cubilla, M.P.; Santos, L.C.; de Moraes, W.; Cubas, Z.S.; Leutenegger, C.M.; Estrada, M.; Vieira, R.F.; Soares, M.J.; Lindsay, L.L.; Sykes, J.E.; et al. Occurrence of hemotropic mycoplasmas in non-human primates (*Alouatta caraya*, *Sapajus nigritus* and *Callithrix jacchus*) of southern Brazil. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *52*, 6–13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Mongruel, A.C.B.; Somma, A.T.; Pinto, A.C.A.; Campos, C.d.F.; Calado, M.I.Z.; Montiani-Ferreira, F.; Vieira, T.S.W.J.; Vieira, R.F.d.C. First Report of 'Candidatus Mycoplasma haematomacacae' in Laboratory-Kept Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*) Maintained in Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. Sci.* **2022**, *9*, 443. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. De Melo, C.M.F.; Daneze, E.R.; Mendes, N.S.; Ramos, I.A.d.S.; Morales-Donoso, J.A.; Fernandes, S.J.; Machado, R.Z.; André, M.R.; Sobreira, M.F.d.R. Genetic diversity and hematological and biochemical alterations in *Alouatta* primates naturally infected with hemoplasmas in Brazil. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *63*, 104–111. [\[CrossRef\]](#)
79. Carneiro, F.T.; Scaloni, M.C.; Amorim, G.; Silva, W.A.; Honorato, S.M.; Pereira, F.M.; Silva, L.H.; Aquino, L.C.; Paludo, G.R. Hemoplasma infection in wild captive carnivores. *Pesqui. Vet. Bras.* **2020**, *40*, 293–299. [\[CrossRef\]](#)
80. André, M.R.; Duarte, J.M.B.; Gonçalves, L.R.; Sacchi, A.B.V.; Jusi, M.M.G.; Machado, R.Z. New records and genetic diversity of *Mycoplasma ovis* in free-ranging deer in Brazil. *Epidemiol. Infect.* **2020**, *148*, e6. [\[CrossRef\]](#)
81. Mongruel, A.C.B.; Medici, E.P.; Canena, A.D.C.; Calchi, A.C.; Machado, R.Z.; André, M.R. Expanding the Universe of Hemoplasmas: Multi-Locus Sequencing Reveals Putative Novel Hemoplasmas in Lowland Tapirs (*Tapirus terrestris*), the Largest Land Mammals in Brazil. *Microorganisms* **2022**, *10*, 614. [\[CrossRef\]](#)
82. Andrews, K.R.; Besser, T.E.; Stalder, T.; Top, E.M.; Baker, K.N.; Fagnan, M.W.; New, D.D.; Schneider, G.M.; Gal, A.; Andrews-Dickert, R.; et al. Comparative genomic analysis identifies potential adaptive variation and virulence factors in *Mycoplasma ovipneumoniae*. *bioRxiv* **2024**. [\[CrossRef\]](#)
83. De Mello, V.V.C.; Calchi, A.C.; de Oliveira, L.B.; Coelho, T.F.S.B.; Lee, D.A.B.; Franco, E.O.; Machado, R.Z.; André, M.R. Molecular Survey of Piroplasmids and Hemosporidians in Vampire Bats, with Evidence of Distinct Piroplasmida Lineages Parasitizing *Desmodus rotundus* from the Brazilian Amazon. *Parasitologia* **2023**, *3*, 248–259. [\[CrossRef\]](#)
84. Johnson, J.S.; Spakowicz, D.J.; Hong, B.-Y.; Petersen, L.M.; Demkowicz, P.; Chen, L.; Leopold, S.R.; Hanson, B.M.; Agresta, H.O.; Gerstein, M.; et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5029. [\[CrossRef\]](#)
85. Kuhn, J.; Marti, I.; Ryser-Degiorgis, M.-P.; Wernike, K.; Jones, S.; Tyson, G.; Delalay, G.; Scherrer, P.; Borel, S.; Hosie, M.J.; et al. Investigations on the Potential Role of Free-Ranging Wildlife as a Reservoir of SARS-CoV-2 in Switzerland. *Viruses* **2024**, *16*, 1407. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Young, A.D.; Gillung, J.P. Phylogenomics-principles, opportunities and pitfalls of big-data phylogenetics. *Syst. Entomol.* **2020**, *45*, 225–247. [\[CrossRef\]](#)
87. Firouzeh, N.; Borj, H.F.; Ziaali, N.; Kareshk, A.T.; Ahmadijead, M.; Shafiei, R. Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii* by Serological and Molecular Analyses in Different Sheep and Goat Tissues in Northeastern Iran. *Iran. J. Parasitol.* **2023**, *18*, 217–228. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Shafiei, R.; Firouzeh, N.; Rahimi, M.T. Serological and molecular survey of *Toxoplasma gondii* in aborted livestock fetuses from Northeast Iran. *BMC Res. Notes* **2024**, *17*, 290. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

MATERIAL SUPLEMENTAR 1

Tabela 1. Ensaios moleculares utilizados no presente estudo são categorizados pelo agente envolvido, tipo de PCR, gene alvo, sequências de primers, tamanho do amplicon (pb), condições de ciclagem térmica e referências.

Agents	Aim/Primer	Molecular assay	Primers sequences	Fragment size (bp)	Thermal cycling	Reference
<i>Granulocytic/platelet Anaplasma/Ehrlichia</i> (16S rRNA gene)	Screening	nPCR	5'-CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC-3'	932	94°C for 5 min 40 cycles: 94°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 1 min, 72°C for 5 min	Massung <i>et al.</i> 1998
	1 ^a reaction gE3a gE10R 2 ^a reaction gE2 gE9f.		5'-TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC'-3'			
			5'-GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG-3'	546		
			5'-AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT-3'			
<i>Monocytic Ehrlichia spp.</i> (16S rRNA gene)	Screening	nPCR	5'-ACGGACAATTGCTTATAGCCTT	1195	94°C for 5 min 30 cycles: 92 °C for 1 min, 54°C for 1 min and 72°C for 2 min, 72°C for 8 min	Kawahara <i>et al.</i> 2009
	1 ^a reaction NS16SCH1F NS16SCH1R 2 ^a reaction NS16SCH2F NS16SCH2R		5'-ACAACTTTTATGGATTAGCTAAAT			
			5'-GGGCACGTAGGTGGACTAG-3'	443		
			5'-CCTGTTAGGAGGGATACGAC-3'			
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (<i>msp4</i> gene)	Characterization	nPCR	5'-ATGAATTACAGAGAATTGCTTGTAGG-3'	849	94°C for 5 min 30 cycles: 92°C for 1 min, 54 °C for 1 min and 72°C for 2 min, 72 °C for 8 min	de la Fuente <i>et al.</i> 2005
	1 ^a reaction MSP4AP5 MSP4AP3 2 ^a reaction msp4F msp4R		5'-TTAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTATG-3'			
			5'-CTATTGGYGGNGCYAGAGT-3'	381		Bown <i>et al.</i> 2007
			5'-GTTTCATCGAAAATTCCGTGGTA-3'			
<i>Anaplasma marginale</i> (<i>msp4</i> gene)	Characterization	nPCR	5'-GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC-3'	872	94°C for 5 min 30 cycles: 92°C for 1 min, 54°C for 1 min and 72°C for 2 min, 72°C for 8 min	de la Fuente <i>et al.</i> (2008)
	1 ^a reaction MSP45 MSP43 2 ^a reaction AnapF AnapR		5'-CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC-3'			
			5'-CGCCAGCAAACCTTTCCAAA-3'	294		Silveira <i>et al.</i> (2012)
			5'-ATATGGGGACACAGGCAAAT-3'			

MATERIAL SUPPLEMENTAR 1

Table 1. (continuação)

Agents	Aim/Primer	Molecular assay	Primers sequences	Fragment size (bp)	Thermal cycling	Reference
<i>Anaplasma platys</i> (16S rRNA gene)	Characterization		5'-AGTTTGATCATGGCTCAG-3'	*	1 ^a reaction 94°C for 2 min, 40 cycles:	Ramos <i>et al.</i> , 2009
	1 ^a reaction		5'-CCATGGCGTGACGGGCAGTGT-3'		94°C for 1 min,	
	8-F		5'-GATTTTGTCTAGCTTGCTATG-3'	678	45°C for 1 min,	
	1448-R		5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'		72°C for 40 s, 72°C for 4 min.	
	2 ^a reaction				2 ^a reaction	
	PLATYS-F				94°C for 1 min, 40 cycles: 94°C for 1 min, 53°C for 30 s,	
	EHR16S-R				72°C for 30 s, 72°C for 4 min.	
Piroplasmids (18S rRNA gene)	Screening	nPCR	5'-CGGGATCCAACCTGGTTGATCCTGC-3'	1700	94°C for 5 min 30 cycles: 92°C for 1 min, 54°C for 1 min and 72°C for 2 min, 72°C for 8 min	Zahler <i>et al.</i> , 2000
	1 ^a reaction		5'-CCGAATTCCTTGTTACGACTTCTC-3'			
	RIB-19					
	RIB-20					
	2 ^a reaction					
	BabRumF		5'-ACCTCACCAGGTCCAGACAG -3'	430		Silveira <i>et al.</i> , 2011
	BabRumR		5'-GTACAAAGGGCAGGGACGTA-3'			
<i>Leishmania spp.</i> (ITS1 gene)	Screening	cPCR	5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3'	300–350	95°C for 2 min, 37 cycles: 94°C for 30s, 53°C for 1 min, 72°C for 1 min, 72°C for 6 min.	Schonian <i>et al.</i> , 2003
	LITSR		5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'			
	L5.8S					
<i>Bartonella spp.</i> (16S-23S rRNA intergenic region)	Screening	cPCR	5'-CTCTTTCTTCAGATGATGATCC-3'	145-232	95°C for 2 min, 45 cycles: 95°C for 1 min, 60°C for 1 min, 72°C for 30 s, 72°C for 5 min	Jensen <i>et al.</i> 2000
	BartF		5'-AACCAACTGAGCTACAAGCCCT-3'			
	BartR					

MATERIAL SUPPLEMENTAR 1

Table 1. (continuação)

Agents	Aim/Primer	Molecular assay	Primers sequences	Fragment size (bp)	Thermal cycling	Reference
Hemotropic <i>Mycoplasma</i> spp. (16S rRNA)	Screening HBTF HBTR	cPCR	5'-ATACGGCCCATATTCCTACG-3' 5'-TGCTCCACCACTTGTTC-3'	618	94°C for 10 min, 40 cycles: 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 30 s, 72°C for 10 min	Criado-Fornelio <i>et al.</i> , 2003

MATERIAL SUPLEMENTAR 2

Tabela 2. Identificação de mamíferos cativos amostrados no Zoológico dos Parques Municipais e Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, Minas Gerais, entre 2021 e 2023, quanto ao número de identificação, dados de coleta, sexo e positividade molecular para patógenos transmitidos por vetores. Os resultados obtidos nos ensaios de PCR para *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys* e *Anaplasma marginale* não são mostrados, uma vez que todos os animais tiveram resultados negativos.

ID	Collection data	Sex	Species	Granulocytic/platelet <i>Anaplasma/ Ehrlichia</i> sp.	Monocytic <i>Ehrlichia</i> sp.	<i>Bartonella</i> sp.	Hemotropic <i>Mycoplasma</i> sp.	Piroplasmids	<i>Leishmania</i> spp.
AZ01	2021-11-04	M*	<i>Leopardus braccatus</i>	-	-	-	-	Positive	-
AZ02	2021-11-04	M	<i>Leopardus braccatus</i>	-	-	-	-	Positive	-
AZ04	2021-11-22	F*	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	-	-	Positive	Positive	Positive	-
AZ05	2021-11-22	F	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Positive	-	-	-	Positive	-
AZ06	2021-12-07	F	<i>Puma concolor</i>	-	-	-	-	-	-
AZ07	2021-12-16	F	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	-	-	Positive	-	-	Positive
AZ08	2022-02-08	M	<i>Galictis cuja</i>	-	-	-	-	-	-
AZ09	2022-02-08	M	<i>Subulo gouazoubira</i>	-	-	-	-	-	-
AZ11	2022-03-10	F	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Positive	-	-	Positive	-	Positive
AZ12	2022-03-10	F	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Positive	-	-	-	-	Positive
AZ13	2022-03-10	M	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Positive	-	-	-	-	Positive
AZ14	2022-03-16	M	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Positive	Positive	Positive	-	-	-
AZ15	2022-03-16	M	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	-	-	-	-	-	-
AZ16	2022-05-16	M	<i>Dama dama</i>	-	-	-	-	-	-
AZ17	2022-05-16	M	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	-	-	-	-	-	-
AZ18	2022-05-27	M	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	-	-	-	-	-	-
AZ19	2022-05-16	F	<i>Ceratotherium simum</i>	-	-	Positive	Positive	Positive	-
AZ20	2022-05-16	F	<i>Alouatta sp</i>	-	-	-	Positive	-	-
AZ21	2022-05-27	F	<i>Alouatta sp</i>	-	-	-	-	-	-
AZ22	2022-07-27	F	<i>Tamandua tetradactyla</i>	-	-	Positive	-	-	-
AZ25	2022-08-25	F	<i>Panthera leo</i>	-	-	-	-	-	-
AZ27	2022-07-01	F	<i>Ateles sp</i>	-	-	-	-	Positivo	-

Tabela 2. (continuação)

ID	Collection data	Sex	Species	Granulocytic/platelet <i>Anaplasma/ Ehrlichia</i> sp.	Monocytic <i>Ehrlichia</i> sp.	<i>Bartonella</i> sp.	Hemotropic <i>Mycoplasma</i> sp.	Piroplasmids	<i>Leishmania</i> sp.
AZ28	2022-10-25	F	<i>Lagothrix lagotricha</i>	-	-	Positive	Positive	-	-
AZ29	2022-10-25	M	<i>Sapajus apella</i>	-	-	Positive	-	-	-
AZ30	2022-11-15	M	<i>Subulo gouazoubira</i>	-	-	Positive	-	-	-
AZ31	2022-11-21	F	<i>Panthera onca</i>	-	-	-	-	-	-
AZ32	2022-11-24	M	<i>Lagothrix lagotricha</i>	-	-	-	-	-	-
AZ33	2022-11-24	F	<i>Lagothrix lagotricha</i>	-	-	-	Positive	-	-
AZ34	2022-11-24	M	<i>Sapajus apella</i>	-	-	-	-	-	-
AZ35	2022-11-24	F	<i>Lagothrix lagotricha</i>	-	-	-	-	-	-
AZ36	2023-01-24	M	<i>Dama dama</i>	-	-	-	Positive	-	-
AZ37	2023-01-24	M	<i>Dasyprocta sp</i>	-	-	Positive	-	-	-
AZ38	2023-01-26	M	<i>Alouatta sp</i>	-	-	Positive	-	-	-
AZ39	2023-01-26	F	<i>Alouatta sp</i>	-	-	Positive	-	-	-
AZ41	2023-01-26	F	<i>Alouatta sp</i>	-	-	Positive	-	-	-
AZ42	2023-01-26	M	<i>Alouatta sp</i>	-	-	Positive	-	-	-
AZ43	2023-01-26	M	<i>Alouatta sp</i>	-	-	Positive	-	-	-
AZ44	2023-01-25	F	<i>Puma concolor</i>	-	-	Positive	-	-	-
AZ45	2023-02-10	M	<i>Alouatta sp</i>	-	-	Positive	-	-	-
AZ46	2022-11-15	F	<i>Hippopotamus amphibius</i>	-	-	Positive	-	Positive	-

* Male; **Female; - Negative

MATERIAL SUPLEMENTAR 3

Table SM3. Co-infecções em mamíferos mantidos em cativeiro no zoológico da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil no período de 2021 a 2023.

ID	Specie	Granulocytic/platelet <i>Anaplasma/ Ehrlichia</i> sp.	Monocytic <i>Ehrlichia</i> sp.	<i>Bartonella</i> sp.	Hemotropic <i>Mycoplasma</i> sp.	Piroplasmids	<i>Leishmania</i> spp.	Total de patógenos co-infectando
AZ04	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	-	-	+	+	+	-	3
AZ05	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	+	-	-	-	+	-	2
AZ07	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	-	-	+	-	-	+	2
AZ11	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	+	-	-	+	-	+	3
AZ12	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	+	-	-	-	-	+	2
AZ13	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	+	-	-	-	-	+	2
AZ14	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	+	+	+	-	-	-	3
AZ19	<i>Ceratotherium simum</i>	-	-	+	+	+	-	3
AZ28	<i>Lagothrix lagotricha</i>	-	-	+	+	-	-	2
AZ46	<i>Hippopotamus amphibius</i>	-	-	+	-	+	-	2

8.1.4. Resultados e discussão que não constam nos artigos publicados

8.1.4.1. Coinfecção com SARS-CoV-2

Dos nove animais positivos para SARS-CoV-2, a análise de coinfeções com hemopatógenos foi realizada para oito, uma vez que um dos animais não teve sangue total coletado, impossibilitando sua inclusão na avaliação de coinfeções.

A coinfeção com SARS-CoV-2 e outros patógenos foi detectada no 10% (4/40) dos mamíferos: um gato palheiro coinfectado com apenas Piroplasmas, um gorila coinfectado com Piroplasma, *Mycoplasma* hemotrópico e *Bartonella* spp., um gorila coinfectado com Piroplasma e AEGP, e um lobo guará coinfectado com AEGP e *Leishmania* spp. (Quadro 7).

Quadro 7- Combinação de coinfeções com SARS-CoV-2 observada nos mamíferos pertencentes ao plantel da FPMZB no período compreendido entre Nov/2021-Mar/2023.

Animal	Sexo	SARS-CoV-2	<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> granulócitos e plaquetas	<i>Mycoplasma</i> spp. hemotrópico	<i>Bartonella</i> spp.	Piroplasmas	<i>Leishmania</i> spp.
AZ02/Gato palheiro	M	+	-	-	-	+	-
AZ04/Gorila	F	+	-	+	+	+	-
AZ05/Gorila	F	+	+	-	-	+	-
AZ13/Lobo guará	M	+	+	-	-	-	+

M:Macho; F: Fêmea

Em relação à positividade para SARS-CoV-2, foi encontrada uma associação estatisticamente significativa com a presença de *Bartonella* spp. ($p = 0,000$) (Tabela 10). Essa associação mostrou-se protetiva: animais positivos para *Bartonella* spp. foram negativos para SARS-CoV-2, e vice-versa. Por outro lado, as análises não revelaram associações significativas entre SARS-CoV-2 e as demais variáveis apresentadas na tabela.

Tabela 10- Associações estatísticas entre a infecção por SARS-CoV-2 e outros patógenos observadas em mamíferos do plantel da FPMZB no período de novembro de 2021 a março de 2023.

Fator	Valor P								
	SARS-CoV-2 positividade	Piroplasma positividade	C. felis positividade	E. monocítica positividade	AEGP positividade	Mycoplasma spp. positividade	Leishmania spp. positividade	Bartonella spp. positividade	Hemopatógenos
Ordem	0.743	0.649	0.421	0.550	0.462	0.781	0.556	0.621	0.775
E. monocítica positivo	0.800	-	-	-	-	-	-	-	-
AEGP positivo	0.257	-	-	-	-	-	-	-	-
Bartonella spp. positivo	0.000	-	-	-	-	-	-	-	-
Mycoplasma spp. positivo	0.694	-	-	-	-	-	-	-	-
Piroplasmas positivo	0.348	-	-	-	-	-	-	-	-
C. felis positivo	0.947	-	-	-	-	-	-	-	-
Leishmania spp. positivo	0.524	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemopatógeno s positivo	0.690	-	-	-	-	-	-	-	-
Coinfecções positivo	0.271	-	-	-	-	-	-	-	-

-: Não feito, Associações com valor de $P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

AEGP: *Anaplasma*/ *Ehrlichia* sp. granulócitos/plaquetas

8.1.5. DISCUSSÃO

No presente estudo, dos nove animais positivos para SARS-CoV-2, a análise de coinfeções com hemopatógenos foi realizada apenas para oito, uma vez que um dos animais não teve sangue total coletado, impossibilitando sua inclusão na avaliação de coinfeções. A coinfeção com SARS-CoV-2 e outros patógenos foi detectada em 10% (4/40) dos mamíferos. Os patógenos detectados incluíram AEGP, *Mycoplasma* hemotrópico, *Bartonella* spp, Piroplasma e *Leishmania* spp.

Pesquisas sobre a associação com SARS-CoV-2 e outros patógenos têm sido documentadas na literatura. Estudos indicam que a presença de múltiplos patógenos pode agravar a gravidade da COVID-19 e complicar o manejo clínico dos pacientes. Por exemplo, coinfeções com *Staphylococcus aureus* têm sido associadas a taxas de mortalidade mais altas e maior necessidade de cuidados intensivos (Adalbert *et al.*, 2021). Além disso, coinfeções com vírus respiratórios

como a influenza podem levar a complicações graves, incluindo síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e inflamação sistêmica exacerbada (Kim, *et al.*, 2023).

No contexto veterinário, a coinfeção com SARS-CoV-2 e outros patógenos, como observado neste estudo, reflete a complexidade das interações patogênicas. Estudos semelhantes ao presente trabalho realizado em felinos domésticos errantes observaram coinfeções de SARS-CoV-2 e outros patógenos como *Bartonella* spp., *T. gondii*, vírus da imunodeficiência felina (FIV) e *L. infantum*, sugerindo que animais imunossuprimidos podem ser especialmente suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2 (Villanueva-Saz *et al.*, 2022; Castillo *et al.*, 2024).

A coinfeção com múltiplos patógenos pode agravar significativamente o estado de saúde dos animais, especialmente quando combinada com a infecção viral. (Kumar *et al.*, 2018). A presença de Piroplasmas, por exemplo, pode causar anemia e outros problemas hematológicos, enquanto *Mycoplasma* hemotrópico podem resultar em infecções crônicas e debilitantes, além de inflamação crônica e danos aos tecidos (Mol *et al.*, 2015; André *et al.*, 2017). A coinfeção com AEGP pode levar a febre, letargia e alterações nos parâmetros hematológicos, como trombocitopenia e anemia leve (Arrais *et al.*, 2021). Além disso, a presença de *Leishmania* spp. pode agravar ainda mais a saúde do animal, resultando em uma resposta imune ineficaz e na incapacidade do hospedeiro de controlar a infecção. Isso não só potencializa os efeitos negativos das coinfeções, mas também complica o manejo clínico dos animais infectados por SARS-CoV-2 (Moura *et al.*, 2022).

A interação de múltiplos patógenos pode sobrecarregar o sistema imunológico, aumentando a vulnerabilidade do animal e resultando em sinais clínicos mais graves (Kumar *et al.*, 2018). A maioria desses parasitos têm a capacidade de alterar o sistema imunológico do hospedeiro, permitindo-lhes evitar ou superar os sistemas de defesa, o que torna o tratamento e a recuperação ainda mais desafiadores (Hananeh *et al.*, 2022).

Foi descoberta que a positividade para a infecção por SARS-CoV-2 estava associada à negatividade da infecção para *Bartonella* spp. nos mamíferos do zoológico e vice-versa, um fenômeno semelhante foi encontrado por Fraga *et al.* (2022). Os autores demonstraram que a infecção por SARS-CoV-2 em modelos de roedores reduziu a gravidade da malária causada por *Plasmodium*, sugerindo que a exposição a uma variante viral atenuada modula as respostas imunes subsequentes e fornece proteção contra resultados graves associados à infecção por malária.

A associação observada entre a infecção por SARS-CoV-2 e *Bartonella* spp. levanta a hipótese de que *Bartonella* spp. pode influenciar a suscetibilidade ou a progressão da infecção por SARS-CoV-2 ou vice-versa. A coinfeção por *Bartonella* spp. têm sido associada a alterações nas respostas imunes, como reações inflamatórias exacerbadas em psoríase e artrite psoriásica (Santos *et al.*, 2021). No entanto, em hanseníase, a coinfeção com *B. henselae* levou a uma melhora das reações inflamatórias após tratamento específico (Santos *et al.* 2023). Um possível mecanismo para essa interação poderia ser a modulação do sistema imunológico do hospedeiro. *Bartonella* spp. são capazes de alterar suas proteínas de superfície e variar seus antígenos, o que dificulta a resposta imune adaptativa. Além disso, *Bartonella* spp. produzem biofilmes e citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, que suprimem a resposta inflamatória e favorecem a persistência da infecção (Xi *et al.*, 2024). A modulação imunológica causada por *Bartonella* spp. pode afetar a resposta imune do hospedeiro a outros patógenos, incluindo o SARS-CoV-2. No entanto, estudos de coinfeção em modelos animais e humanos são necessários para entender melhor essa interação e suas implicações clínicas.

Até onde sabemos, não existem estudos semelhantes, o que torna este achado inédito. No entanto, é importante considerar as limitações do estudo, como o tamanho relativamente pequeno da amostra, o que pode comprometer a generalização dos resultados. Embora a associação observada seja estatisticamente significativa, deve ser interpretada com cautela até que mais dados, de diferentes populações e contextos, sejam disponíveis.

Ainda existem lacunas significativas na compreensão das coinfeções entre SARS-CoV-2 e parasitos, especialmente quanto ao papel que esses patógenos podem desempenhar na infecção viral. A presença de coinfeções com patógenos imunossupressores e zoonóticos ressalta a necessidade de estudos adicionais. Recomenda-se que futuras pesquisas incluam a observação de sinais clínicos e dados hematológicos detalhados; investigação de como fatores ambientais e biológicos podem influenciar a suscetibilidade dos animais a essas infecções; estudos experimentais que possam esclarecer os mecanismos subjacentes; estudos que envolvam diferentes populações de animais, tanto em cativeiro quanto em vida selvagem; além da investigação da interação entre esses patógenos em nível celular e imunológico. Essas abordagens são fundamentais para desenvolver estratégias de manejo e tratamento mais eficazes, beneficiando tanto a saúde animal quanto humana.

9. CONSIDERAÇÕES GERAIS

No presente trabalho, investigamos a infecção por SARS-CoV-2 e coinfeções parasitárias em 216 mamíferos de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, abrangendo 86 animais domésticos, 78 gatos errantes do Parque Municipal Américo Renné Giannetti (PqMARG) e 52 mamíferos do Jardim Zoológico. As amostras foram coletadas de 211 swabes e 204 amostras sanguíneas.

Os mamíferos do zoológico apresentaram a maior taxa de positividade para SARS-CoV-2 (19,1%), seguidos por animais domésticos (9,3%) e gatos do parque (7,7%). Esses resultados indicam que, em ambientes como o zoológico, onde há maior diversidade de espécies e interação com fatores ambientais e humanos, o risco de infecção é mais elevado.

Swabes retais de mamíferos do zoológico apresentaram a maior taxa de positividade (10,6%), enquanto os animais domésticos tiveram maior detecção em swabes orofaríngeos (8,14%). A presença de RNA viral em ambos os tipos de amostras reforça a possibilidade de replicação viral em diferentes regiões do corpo, sugerindo um possível risco de transmissão fecal-oral.

Embora a infecção por SARS-CoV-2 tenha sido confirmada nos três grupos, nenhum dos animais exibiu sinais clínicos significativos, o que pode indicar uma baixa patogenicidade do vírus ou uma resposta imune eficaz por parte dos animais.

A variante Alpha foi identificada em dois mamíferos do zoológico: um lobo-guará (AZ13) e um veado (AZ16). Essa variante, associada à maior transmissibilidade, circulou amplamente antes do surgimento das variantes Delta e Ômicron. A variante Delta foi detectada apenas em gatos do parque, refletindo sua predominância na população humana no momento da coleta. A transmissão humano-felino é sugerida, assim como a transmissão entre os gatos, conforme confirmado por análises filogenéticas. A variante Ômicron foi encontrada em um cão doméstico (BHC22) e em um gorila (AZ17), coincidindo com sua circulação em humanos e suas mutações indicativas de possível origem animal.

Quanto às infecções por hemopatógenos, os mamíferos do zoológico apresentaram a maior taxa de infecção (72,5%), seguidos pelos gatos do PqMARG (51,3%) e pelos animais domésticos (cães: 45,8%; gatos: 31,6%). Isso pode estar relacionado à maior exposição a vetores e contato com outras espécies, além das condições de manejo em zoológicos. Animais domésticos apresentaram

menor taxa de infecção, possivelmente devido aos melhores cuidados veterinários e condições de vida, em contraste com os gatos errantes, que têm maior risco de exposição a vetores e patógenos.

Todos os grupos apresentaram uma diversidade de hemopatógenos, com predomínio de Anaplasmataceae e *Mycoplasma* spp. hemotrópicos. Os mamíferos do zoológico exibiram maior variabilidade, incluindo *Bartonella* spp., *Theileria* spp. e *Cytauxzoon* spp.

A prevalência de AEGP nos cães do PetCovid (58,3%) reforça a necessidade de monitoramento em ambientes urbanos, onde o carrapato *Rhipicephalus linnaei* facilita a transmissão de patógenos. A detecção de AEGP em diferentes espécies no zoológico sugere circulação ativa dos vetores, tanto em ambientes domésticos quanto cativos.

No Brasil, *Bartonella* spp. já foi identificada em diversos mamíferos, e este estudo é o primeiro a registrar hemopatógenos do gênero *Bartonella* em gatos do PqMARG. A prevalência foi semelhante entre gatos do PqMARG (38,5%) e animais do zoológico (42,5%), com *B. henselae* mais comum nos gatos e *B. clarridgeiae* mais frequente no zoológico, provavelmente devido a diferenças ecológicas entre os hospedeiros.

A detecção de *Mycoplasma* spp. hemotrópicos em todos os grupos demonstra sua ampla distribuição entre espécies e ambientes. Esses patógenos, transmitidos por artrópodes, persistem em diversas condições ambientais, facilitando sua circulação.

Em relação aos piroplasmídeos, os cães do PetCovid apresentaram alta prevalência (37,5%), enquanto os mamíferos do zoológico tiveram taxas moderadas (22,5%). Foi identificada *Theileria* spp. em um rinoceronte-branco, com alta identidade genética com *T. bicornis*, sendo o primeiro registro dessa espécie no Brasil, sugerindo infecção persistente. Além disso, foi detectado *C. felis* em uma onça-pintada, com identidade de 99,77%. Nos gatos do PqMARG, a taxa foi baixa (2,6%), e não houve detecção nos gatos do PetCovid. *C. felis* já foi relatado em felinos selvagens cativos e pode representar risco em áreas onde coexistem gatos domésticos e selvagens, enfatizando a importância do monitoramento.

A *Leishmania* spp. foi detectada pela primeira vez na população de gatos do PqMARG, com prevalência de 15,4%, maior que os 12,9% nos mamíferos do zoológico. A identificação de *L. infantum* no PqMARG e a infecção por *Leishmania* spp. em lobos-guará no zoológico indicam um ambiente propício para a transmissão do patógeno em Belo Horizonte, endêmica para leishmaniose visceral canina.

Os gatos, como reservatórios de *T. gondii*, excretam oocistos que contaminam o ambiente. A soroprevalência foi de 23,1% no PqMARG e 15,8% nos gatos do projeto PetCovid. A presença de gatos errantes facilita a disseminação de *T. gondii*.

A análise de coinfeções mostrou que os cães do projeto PetCovid tiveram a maior taxa (10,4%), seguidos pelos mamíferos do zoológico (10%) e gatos do PqMARG (5,6%). A prevalência de AEGP em cães (58,3%) sugere coinfeções comuns, com associações significativas entre hemopatógenos e SARS-CoV-2 nos gatos do PqMARG.

A prevalência de infecções nos mamíferos do zoológico foi de 72,5%, com 34,5% de coinfeção. Em comparação, os cães do PetCovid mostraram 45,8% de prevalência e 41,7% de coinfeção, enquanto os gatos apresentaram 31,6% e 13,2%, respectivamente. Os gatos do PqMARG enfrentaram alta exposição a patógenos.

A pesquisa não incluiu ectoparasitos, vetores importantes para hemopatógenos, representando uma lacuna a ser explorada em estudos futuros. Os métodos moleculares usados para detectar hemopatógenos mostraram alta taxa de positividade nos testes genéricos, mas a transição para PCRs específicos teve limitações. Sequências menores podem ter dificultado a obtenção de informações detalhadas, mas análises filogenéticas foram realizadas, evidenciando a necessidade de otimização dos métodos de PCR e sequenciamento.

O conhecimento das espécies de parasitos em uma determinada população é importante no direcionamento de ações conservacionistas para animais selvagens em cativeiro que fazem parte das coleções animais em jardins zoológicos. Além disso, o diagnóstico de hemopatógenos e *Toxoplasma gondii* em animais domésticos também é crucial para a saúde pública e para o controle de doenças zoonóticas. Em geral, os resultados demonstram a importância de uma abordagem integrada e multidisciplinar na compreensão das dinâmicas de infecção e coinfeção por SARS-CoV-2 e hemopatógenos e *Toxoplasma gondii* em diferentes ambientes e espécies, contribuindo para uma melhor gestão de saúde animal e pública.

10. CONCLUSÕES

- A pesquisa revelou a presença do vírus SARS-CoV-2 em animais domésticos com tutores positivos para COVID-19, nos gatos do PqMARG e nos mamíferos silvestres do zoológico em Belo Horizonte, Taxas variáveis de infecção foram identificadas em cada grupo.
- A identificação das linhagens específicas do SARS-CoV-2, incluindo SARS-CoV-2 Alpha, SARS-CoV-2 Delta e SARS-CoV-2 Ômicron em animais, destaca a complexidade das infecções em ambientes domésticos e urbanos. A caracterização genômica proporciona uma compreensão mais refinada das origens e transmissão do vírus entre diferentes espécies, além de contribuir para o monitoramento da evolução do vírus em ambientes animais.
- Se identificou molecularmente vários hemopatógenos, incluindo *Anaplasma/Ehrlichia* spp., *Mycoplasma* spp., *Bartonella* spp., Piroplasmida e *Leishmania* spp., nos grupos estudados, o que ressalta a importância epidemiológica desses patógenos. A diversidade genética dos hemopatógenos foi caracterizada, especialmente para *Ehrlichia* spp., *Bartonella* spp., *Mycoplasma* spp., Piroplasmas e *Leishmania* spp com identificação das espécies específicas e sua distribuição entre os grupos de animais.
- Taxas de soroprevalência de *Toxoplasma gondii* variaram entre os grupos de gatos estudados, sendo mais elevadas para os gatos do PqMARG quando comparado com os gatos do Projeto PetCOVID-19, o que ressalta a importância da interação entre os animais domésticos e o meio ambiente na disseminação desse parasito. A ausência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em cães do Projeto PetCOVID-19 indica uma possível diferença de exposição entre as espécies.
- A coinfeção entre SARS-CoV-2 e outros patógenos foi observada, com associações significativas entre SARS-CoV-2 e hemopatógenos em geral nos gatos do PqMARG, e com *Bartonella* spp. nos mamíferos cativos do zoológico, destacando a complexidade das

interações infecciosas e enfatizando a necessidade contínua de estudos multidisciplinares para uma compreensão integral na investigação.

- Este é o primeiro estudo a detectar *Bartonella* spp. nos locais investigados. Além disso, este trabalho marca a primeira vez que *Leishmania infantum* foi identificada nos gatos do PqMARG

REFERÊNCIAS

- ABBASI, H., TABARAEI, A., HOSSEINI, S. M., *et al.* (2022). Real-time PCR Ct value in SARS-CoV-2 detection: RdRp or N gene? *Infection*, 50(2), 537-540. <https://doi.org/10.1007/s15010-021-01674-x>.
- ADALBERT, J.R., VARSHNEY, K., TOBIN, R. *et al.* Clinical outcomes in patients co-infected with COVID-19 and *Staphylococcus aureus*: a scoping review. *BMC Infect Dis* 21, 985 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06616-4>
- AGOPIAN, R. G., DA LUZ, S. C. G., ZEBRAL, A. G. B., *et al.* (2022). First reported cases of SARS-CoV-2 infection in pets in São Paulo, Brazil. *Veterinary world*, 15(11), 2593–2596. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2593-2596>
- AGRICULTURE, FISHERIES AND CONSERVATION DEPARTMENT (AFCD). (2021). Detection of low level of COVID-19 virus in pet dog, Friday, February 28, 2020. https://www.afcd.gov.hk/english/publications/publications_press/pr2335.html Acesso em: 12 de maio de 2023.
- AGUILÓ-GISBERT, J., PADILLA-BLANCO, M., LIZANA, V., *et al.* (2021). First Description of SARS-CoV-2 Infection in Two Feral American Mink (*Neovison vison*) Caught in the Wild. *Animals (Basel)*, 11(5), 1422. doi: 10.3390/ani11051422.
- AHUIR-BARAJA, A. E., RUIZ, M. P., GARIJO, M. M., & LLOBAT, L. (2021). Feline Leishmaniosis: An Emerging Public Health Problem. *Vet Sci*, 8(9), 173. doi: 10.3390/vetsci8090173.
- AKHTARDANESH, B., SHARIFI, I., MOHAMMADI, A., *et al.* (2017). Feline Visceral Leishmaniasis in Kerman, Southeast of Iran: Serological and Molecular Study. *J. Vector Borne Dis*, 54, 96–102.
- AKRAM, I. N., PARVEEN, T., ABRAR, A., MEHMOOD, A. K., & IQBAL, F. (2019). Molecular detection of *Babesia microti* in dogs and cat blood samples collected from Punjab (Pakistan). *Trop. Biomed*, 36, 304–309.
- AKTAS, M., ÖZÜBEK, S., ALTAY, K., IPEK, N. D. S., BALKAYA, I., UTUK, A. E., ... & DUMANLI, N. (2015). Molecular detection of tick-borne rickettsial and protozoan pathogens in domestic dogs from Turkey. *Parasites and Vectors*, 8, 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0763-z>.
- ALANAZI, A. D., ALOUFFI, A. S., ALYOUSIF, M. S., ALSHAHRANI, M. Y., *et al.* (2020). Molecular Survey of Vector-Borne Pathogens of Dogs and Cats in Two Regions of Saudi Arabia. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(1), 25. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010025>

- ALCOVER, M. M., BASURCO, A., FERNANDEZ, A., RIERA, C., FISA, R., GONZALEZ, A., ... & RUÍZ, H. (2021). A Cross-Sectional Study of *Leishmania infantum* Infection in Stray Cats in the City of Zaragoza (Spain) Using Serology and PCR. *Parasit. Vectors*, 14, 178. doi: 10.1186/s13071-021-04682-w.
- ALHO, A. M., LIMA, C., LATROFA, M. S., COLELLA, V., RAVAGNAN, S., CAPELLI, G., ... & OTRANTO, D. (2017). Molecular detection of vector-borne pathogens in dogs and cats from Qatar. *Parasites and Vectors*, 10, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2237-y>.
- AL-MULLA, F., AL-NAKIB, W., & TARIQ, W. (2021). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Infection, Immunological Response, and Vaccine Development. *Journal of Immunology Research*, 2021, 8874351. <https://doi.org/10.1155/2021/8874351>.
- ALVAR, J., CAÑAVATE, C., MOLINA, R., MORENO, J., & NIETO, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57, 1-88. doi: 10.1016/S0065-308X(04)57001-X.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C., ROMERO-SALAS, D., CRUZ-ROMERO, A., GARCÍA-VÁZQUEZ, Z., *et al.* (2014). High prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in Veracruz, Mexico. *BMC veterinary research*, 10, 191. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0191-x>
- ALVARADO-RYBAK, M., SOLANO-GALLEGO, L., & MILLÁN, J. (2016). A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. *Parasites and Vectors*, 9, 538. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1808-7>.
- ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A., BREITSCHWERDT, E. B., & SOLANO-GALLEGO, L. (2018). *Bartonella* infections in cats and dogs including zoonotic aspects. *Parasites & Vectors*, 11, 624. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3152-6>.
- ANDRÉ, M. R., ADANIA, C. H., ALLEGRETTI, S. M., & MACHADO, R. Z. (2011). Hemoplasmas en cánidos y felinos silvestres en Brasil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 42, 342-347. <https://doi.org/10.1638/2010-0198.1>.
- ANDRÉ, M. R., ADANIA, C. H., MACHADO, R. Z., & ALLEGRETTI, S. M. (2009). Molecular detection of *Cytauxzoon* spp. in asymptomatic Brazilian wild captive felids. *J Wildl Dis*, 45, 234–237. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.1.234>.
- ANDRÉ, M. R., BACCARIM DENARDI, N. C., MARQUES DE SOUSA, K. C., & GONÇALVES, L. R. (2014). Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis*, 5, 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.011>.
- ANDRÉ, M. R., CALCHI, A. C., FURQUIM, M. E. C., & DE ANDRADE, I. (2022). Molecular Detection of Tick-Borne Agents in Cats from Southeastern and Northern Brazil. *Pathogens*, 11(1), 106. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010106>.

ANDRÉ, M. R., CALCHI, A. C., FURQUIM, M. E. C., DE ANDRADE, I., ARANTES, P. V. C., DE MELO LOPES, L. C., DEMARCHI, I. K. L. D. N., *et al.* (2022). Molecular detection of tick-borne agents in cats from Southeastern and Northern Brazil. *Pathogens*, 11(1), 106. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010106>

ANDRÉ, M. R., FILGUEIRA, K. D., CALCHI, A. C., *et al.* (2017). Co-infection with arthropod-borne pathogens in domestic cats. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 26(4), 525–531. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017064>

ANDRÉ, M. R., FILGUEIRA, K. D., CALCHI, A. C., SOUSA, K. C. M., & GONÇALVES, L. R. (2017). Co-infection with arthropod-borne pathogens in domestic cats. *Rev Bras Parasitol Vet*, 26(4), 525-531. doi: 10.1590/S1984-29612017064.

ANDRÉ, M. R., HERRERA, H. M., DE JESUS FERNANDES, S., & DE SOUSA, K. C. M. (2015). Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis*, 6, 779–786. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.07.004>.

ANIMAL VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA). (2020). Though COVID-19 cases rare in pets, testing is available. Disponível em: <https://www.avma.org/javma-news/2020-06-01/though-covid-19-cases-rare-pets-testing-available>. Acesso em: 17 de abril de 2023.

AQUINO, E. M. L., SILVEIRA, I. H., PESCARINI, J. M., & AQUINO, R. (2020). Social distancing measures to control the COVID-19 pandemic: potential impacts and challenges in Brazil. *Cien Saude Colet*, 25(suppl 1), 2423-2446. <https://doi.org/10.1590/1413-81232020256.1.10502020>.

ARAUJO OLIVEIRA, B., CAMPOS DE OLIVEIRA, L., CERDEIRA SABINO, E., & OKAY, T. S. (2020). SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 62. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202062044>.

ARAÚJO, DIEGO STANLEY MENDES DE. Estudo de felinos anêmicos no hospital veterinário da UnB no período de outubro 2016 a março 2017. vii, 38 f., il. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) —Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

area in south-eastern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 37(9), 958–962.

ARIANI, C. S. ALMEIDA, GALDINO, M. V., & ARAÚJO JR., J. P. (2019). Seroepidemiological study of feline coronavirus (FCoV) infection in domiciled cats from Botucatu, São Paulo, Brazil. *Pesq Vet Bras*, 39(2), 129-133. doi: 10.1590/1678-5150-pvb-5706.

ARRAIS, R. C., PAULA, R. C., MARTINS, T. F., NIERI-BASTOS, F. A., MARCILI, A., & LABRUNA, M. B. (2021). Survey of ticks and tick-borne agents in maned wolves (*Chrysocyon*

brachyurus) from a natural landscape in Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, 12(2), 101639. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101639>

ARRUDA, I. F., MILLAR, P. R., BARBOSA, A. D. S., ABBOUD, L. C. S., DOS REIS, I. C., MOREIRA, A. S. D. C., GUIMARÃES, M. P. P., & AMENDOEIRA, M. R. R. (2021). *Toxoplasma gondii* in domiciled dogs and cats in urban areas of Brazil: risk factors and spatial distribution. *Toxoplasma gondii* chez les chiens et les chats domiciliés dans des zones urbaines du Brésil : facteurs de risque et répartition spatiale. *Parasite (Paris, France)*, 28, 56. <https://doi.org/10.1051/parasite/2021049>

AYLLÓN, T., DINIZ, P. P., BREITSCHWERDT, E. B., VILLAESCUSA, A., RODRÍGUEZ-FRANCO, F., & SAINZ, A. (2012). Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 12(2), 143–150. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0729>

AZAMI-CONESA, I., GÓMEZ-MUÑOZ, M. T., & MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A. (2021). A Systematic Review (1990-2021) of Wild Animals Infected with Zoonotic Leishmania. *Microorganisms*, 9(5), 1101. doi: 10.3390/microorganisms9051101.

BACHAND, N., RAVEL, A., LEIGHTON, P., STEPHEN, C., NDAO, M., AVARD, E., & JENKINS, E. (2019). Serological and molecular detection of *Toxoplasma gondii* in terrestrial and marine wildlife harvested for food in Nunavik, Canada. *Parasites & vectors*, 12(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3408-9>

BADEN, L. R., EL SAHLY, H. M., ESSINK, B., & KOTLOFF, K. (2021). Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med*, 384(5), 403-416. doi: 10.1056/NEJMoa2035389.

BAHIENSE, C. R., MATOS, A. C. DE, ABATE, H. L., SANTOS, N. J. R. DOS, & VIDOTTO, O. (2020). Ocorrência de *Babesia vogeli*, *Mycoplasma* spp., *Ehrlichia canis* e *Anaplasma* spp. em uma população hospitalar de cães do Oeste do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, 41(6Supl2), 3133–3144. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n6Supl2p3133>

BANETH, G., CARDOSO, L., BRILHANTE-SIMÕES, P., & SCHNITTGER, L. (2019). Establishment of *Babesia vulpes* n. sp. (Apicomplexa: Babesiidae), a piroplasmid species pathogenic for domestic dogs. *Parasit Vectors*, 12, 129. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3385-z>.

BANETH, G., FLORIN-CHRISTENSEN, M., CARDOSO, L., & SCHNITTGER, L. (2015). Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. *Parasit Vectors*, 8(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0830-5>

BANETH, G., KENNY, M. J., TASKER, S., ANUG, Y., SHKAP, V., LEVY, A., & SHAW, S. E. (2004). Infection with a proposed new subspecies of *Babesia canis*, *Babesia canis* subsp. *presentii*, in domestic cats. *J Clin Microbiol*, 42(1), 99-105. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.99-105.2004>

- BANETH, G., NACHUM-BIALA, Y., BIRKENHEUER, A. J., SCHREEG, M. E., PRINCE, H., FLORIN-CHRISTENSEN, M., ... & AROCH, I. (2020). A new piroplasmid species infecting dogs: morphological and molecular characterization and pathogeny of *Babesia negevi* n. sp. *Parasit Vectors*, 13(1), 130. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3995-5>
- BARBOSA, C. M., DURIGON, E. L., THOMAZELLI, L. M., ... & DE ARAUJO, J. (2019). Divergent coronaviruses detected in wild birds in Brazil, including a central park in São Paulo. *Braz J Microbiol*, 50(2), 547-556. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00065-7>
- BARBOSA, M. V., PAULINO, P. G., CAMILO, T. A., MARTINS, D., PAULIS, L., SENNE, N. A., RAMIREZ, O. L. H., ANGELO, I. C., MASSARD, C. L., & SANTOS, H. A. (2021). Spatial distribution and molecular epidemiology of hemotropic *Mycoplasma* spp. and *Mycoplasma haemocanis* infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 87, 104660. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104660>
- BARRS, V. R., PEIRIS, M., TAM, K. W. S., ... & SIT, T. H. C. (2020). SARS-CoV-2 in quarantined domestic cats from COVID-19 households or close contacts, Hong Kong, China. *Emerging Infectious Diseases*, 26(12), 3071-3074. <https://doi.org/10.3201/eid2612.202786>
- BASSO, M. A., MARQUES, C., SANTOS, M., ... & PEREIRA DA FONSECA, I. (2016). Successful treatment of feline leishmaniosis using a combination of allopurinol and N-methyl-glucamine antimoniate. *JFMS Open Reports*, 2(1), 2055116916630002. <https://doi.org/10.1177/2055116916630002>
- BATES, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37, 1097-1106.
- BAWM, S., MYAING, T. T., THU, M. J., ... & KATAKURA, K. (2021). PCR detection and genetic
- BAWM, S., SAGARA, R., KAKISAKA, K., ... & KATAKURA, K. (2021). Identification, genetic variation, and structural analysis of 18S rRNA of *Theileria orientalis* and *Theileria velifera*-like isolates from Myanmar. *Parasitology International*, 82, 102299. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102299>
- BECK, R., VOJTA, L., MRLJAK, V., ... & CACCIÒ, S. M. (2009). Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *International Journal for Parasitology*, 39(7), 843-848. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.12.005>
- BELLINATI, L., CAMPALTO, M., MAZZOTTA, E., ... & NATALE, A. (2022). One-Year Surveillance of SARS-CoV-2 Exposure in Stray Cats and Kennel Dogs from Northeastern Italy. *Microorganisms*, 11(1), 110. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010110>
- BENASSI, J. C., BENVENGA, G. U., FERREIRA, H. L., ... & DE SOUSA OLIVEIRA, T. M. F. (2017). Detection of *Leishmania infantum* DNA in Conjunctival Swabs of Cats by Quantitative

Real-Time PCR. Experimental Parasitology, 177, 93-97. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.004>.

BENEDETTI, F., CURRELI, S., & ZELLA, D. (2020). Mycoplasmas-Host Interaction: Mechanisms of Inflammation and Association with Cellular Transformation. *Microorganisms*, 8(9), 1351. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091351>.

BERENGUER, L. K. A. R., DE ANDRADE GOMES, C. F. C., ... & ALVES, L. C. (2020). *Leishmania infantum* Infection in a Domestic Cat: A Real Treat or an Occasional Finding? *Acta Parasitologica*. <https://doi.org/10.1007/s11686-020-00294-z>.

BESERRA, E. E., GONÇALVES DE OLIVEIRA VARELA, A. S., SANTOS DE LIMA, M., LIMA ALVES, H. D., RIBEIRO VILELA, V. L., & PEREIRA BATISTA, S. (2024). Frequency of hemoparasites in dogs and cats from three cities in the Cariri region, Ceará, Brazil. *Revista Principia*, 61(1), 1–12. <https://doi.org/10.18265/1517-0306a2021id6687>

BIGDELI, M., RAFIE, S. M., NAMAVARI, M. M., & JAMSHIDI, S. (2012). Report of *Theileria annulata* and *Babesia canis* infections in dogs. *Comparative Clinical Pathology*, 21, 375-377. <https://doi.org/10.1007/s00580-012-1505-7>.

BILIĆ, P., KULEŠ, J., BARIĆ RAFAJ, R., & MRLJAK, V. (2018). Canine babesiosis: Where do we stand? *Acta Veterinaria Brno*, 68, 127-160. <https://doi.org/10.2478/acve-2018-0011>.

BIRKENHEUER, A. J., LEVY, M. G., & BREITSCHWERDT, E. B. (2003). Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4172-4177. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>.

BISHOP, R. P., KAPPMAYER, L. S., ONZERE, C. K., ... & FRY, L. M. (2020). Equid infective *Theileria* cluster in distinct 18S rRNA gene clades comprising multiple taxa with unusually broad mammalian host ranges. *Parasites & Vectors*, 13, 261. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04131-0>.

BISHOP, R., MUSOKE, A., MORZARIA, S., GARDNER, M., & NENE, V. (2004). *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. *Parasitology*, 129(Suppl), S271-S283. <https://doi.org/10.1017/s0031182003004748>.

BOGIĆEVIĆ, N., RADOVANOVIĆ, M. E., ... & VALČIĆ, M. (2017). Seroprevalence of *Ehrlichia canis* Infection in Stray Dogs from Serbia. *Macedonian Veterinary Review*, 40(1), 37-42. <https://doi.org/10.1515/macvetrev-2016-0096>.

BONATO, L., FIGUEIREDO, M. A., ... & ANDRÉ, M. R. (2015). Occurrence and molecular characterization of *Bartonella* spp. and hemoplasmas in neotropical primates from Brazilian Amazon. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 42, 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.09.001>.

BOONHOH, W., SONTIGUN, N., FUNGWITHAYA, P., & WONGTAWAN, T. (2023). Hematological analysis of naturally infecting blood parasites in dogs. *Veterinary world*, 16(4), 681–686. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.681-686>

BOSMAN, A. M., PENZHORN, B. L., ... & OOSTHUIZEN, M. C. (2019). A novel Babesia sp. associated with clinical signs of babesiosis in domestic cats in South Africa. *Parasites & Vectors*, 12, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3395-x>.

BOSMAN, A. M., VENTER, E. H., & PENZHORN, B. L. (2007). Occurrence of Babesia felis and Babesia leo in various wild felid species and domestic cats in Southern Africa, based on reverse line blot analysis. *Veterinary Parasitology*, 144, 33-38. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.025>.

BOTERO, Y., RAMÍREZ, J. D., SERRANO-COLL, H., ALEMAN, A., BALLESTEROS, N., MARTINEZ, C., MUÑOZ, M., CALDERON, A., PATIÑO, L. H., GUZMAN, C., CASTAÑEDA, S., HERERRA, Y., & MATTAR, S. (2022). First report and genome sequencing of SARS-CoV-2 in a cat (Felis catus) in Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 117, e210375. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210375>

BOUGHATTAS, S., BEN-ABDALLAH, R., ... & HARRATH, R. (2011). Case of fatal congenital toxoplasmosis associated with I/III recombinant genotype. *Tropical Biomedicine*, 28, 615-619.

BRAGA, Í. A., TAQUES, I. I. G. G., GRONTOSKI, E. C., DE OLIVEIRA DIAS, I. S., PEREIRA, N. A., DE SOUZA RAMOS, D. G., DANTAS-TORRES, F., & DE AGUIAR, D. M. (2021). Exposure of domestic cats to distinct *Ehrlichia canis* TRP genotypes. *Veterinary Sciences*, 8(12), 310. <https://doi.org/10.3390/vetsci8120310>

BRAGA, I. A., DOS SANTOS, L. G., ... & DE AGUIAR, D. M. (2014). Detection of *Ehrlichia canis* in domestic cats in the central-western region of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 641-645. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000200036>.

BRAGA, Í. A., DOS SANTOS, L. G., DE SOUZA RAMOS, D. G., MELO, A. L., DA CRUZ MESTRE, G. L., & DE AGUIAR, D. M. (2014). Detection of *Ehrlichia canis* in domestic cats in the central-western region of Brazil. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 45(2), 641–645. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000200036>

BRAGA, L. (2020, October 21). Estudo com participação da UFMG vai testar cães e gatos para a COVID-19. *UFMG*. <https://www.ufmg.br/estudo-com-participacao-da-ufmg-vai-testar-caes-e-gatos-para-a-covid-19> . Asesado en 22/07/2024

BRAGA, M.DOS., ANDRÉ, M. R., FRESCHI, C. R., TEIXEIRA, M. C., & MACHADO, R. Z. (2012). Molecular and serological detection of Ehrlichia spp. in cats on São Luís Island, Maranhão, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 21(1), 37–41. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612012000100008>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2011). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. Brasília: Ministério da Saúde. p. 07-25. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (2005). Guia de vigilância epidemiológica (6ª ed.). Brasília: Ministério da Saúde. (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 467-501.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2013, 24 de setembro). Instrução Normativa No 50. [PDF]. Disponível em: link

BRAZIL COVID. (2023). Coronavirus Statistics – Worldometer. Disponível em: <https://www.worldometers.info/coronavirus/country/brazil/> Acesso em: 28 jun. 2023.

BREITSCHWERDT, E. B. (2014). Bartonellosis: one-health perspectives for an emerging infectious disease. ILAR J, 55, 46–58. doi: 10.1093/ilar/ilu015.

BREITSCHWERDT, E. B., Abrams-Ogg, A. C., Lappin, M. R., ... Hawkins, E. C. (2002). Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis* -like infection in cats. J Vet Intern Med, 16(6), 642–649. doi: 10.1892/0891-6640(2002)016<0642:mescii>2.3.co;2.

BRENNAN, A., HAWLEY, J., DHAND, N., BOLAND, L., BEATTY, J. A., LAPPIN, M. R., & BARRS, V. R. (2020). Seroprevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Owned Domestic Cats in Australia. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.), 20(4), 275–280. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2520>

BROWN, H. M., Berghaus, R. D., Latimer, K. S., ... Peterson, D. S. (2009). Genetic variability of *Cytauxzoon felis* from 88 infected domestic cats in Arkansas and Georgia. J Vet Diagn Invest, 21(1), 59-63. doi: 10.1177/104063870902100109.

BROWN, H. M., Latimer, K. S., Erikson, L. E., ... Britt, J. O. (2009). Detection of *Cytauxzoon felis* in cougars from Florida. Journal of Wildlife Diseases, 45(1), 234-237.

BULLER, R. S., Arens, M., Hmiel, S. P., ... Storch, G. A. (1999). *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. N Engl J Med, 341(3), 148-155. doi: 10.1056/NEJM199907153410303.

CALLAWAY, E. (2021). Delta coronavirus variant: scientists brace for impact. Nature, 595(7865), 17-18. doi:10.1038/d41586-021-01696-3.

CAO, Y., Hiyoshi, A., & Montgomery, S. (2020). COVID-19 case-fatality rate and demographic and socioeconomic influencers: worldwide spatial regression analysis based on country-level data. BMJ Open, 10(11), e043560. doi: 10.1136/bmjopen-2020-043560.

CARINI, A., & MACIEL, J. (1914). Sobre a moléstia dos cães, chamada Nambi-Uvú, e o seu parasita (*Rangelia vitalii*). *An Paul Med Cir*, 3(2), 65–71.

CARLOS, R. S. A., MARIANO, A. P. M., MACIEL, B. M., *et al.* (2021). First genome sequencing of SARS-CoV-2 recovered from an infected cat and its owner in Latin America. *Transbound Emerg Dis*, 68, 3070–3074. doi: 10.1111/tbed.13984

CARRADE, D. D., FOLEY, J. E., BORJESSON, D. L., & SYKES, J. E. (2009). Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med*, 23(6), 1129-1141. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0384.x

CASSIA, M. P. SANTOS, BARRA, E. C. M., ALMEIDA, J. C. F., JESUS, I. S., CRUZ, A. V., *et al.* (2021). Occurrence of hemotropic mycoplasmas in domestic cats (*Felis catus*) from Belém, Brazil. *International Journal of Development Research*, 11(03), 44949-44952.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). (2020). Confirmation of COVID-19 in Two Pet Cats in New York. Acesso em: 15 de maio de 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/media/releases/2020/s0422-covid-19-cats-NYC.html>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). (2021). Animals and COVID-19. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/daily-life-coping/animals.html>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). (2021). How COVID-19 Spreads. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/how-covid-spreads.html>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). (2021). SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/covid-data/covidview/05282021/variant-surveillance.html>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). (2023). Animals and COVID-19. Updated Apr. 7, 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/daily-life-coping/animals.html>

characterization of piroplasms from dogs in Myanmar, and a possible role of dogs as reservoirs for *Theileria* parasites infecting cattle, water buffaloes, and goats. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 12, 101729. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101729>.

CHEN, J., JIANG, Q., XIA, X., LIU, K., YU, Z., TAO, W., GONG, W., & HAN, J. J. (2020). Individual variation of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 gene expression and regulation. *Aging Cell*, 19(7), e13168. doi: 10.1111/accel.13168

CHEN, X., KANG, Y., LUO, J., PANG, K., XU, X., WU, J., LI, X., & JIN, S. (2021). Next-Generation Sequencing Reveals the Progression of COVID-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 632490. doi: 10.3389/fcimb.2021.632490

CHOMEL, B. B., BOULOUIS, H. J., MARUYAMA, S., & BREITSCHWERDT, E. B. (2006). *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. *Emerging Infectious Diseases*, 12(3), 389-394. doi: 10.3201/eid1203.050931

COREY, L., BEYRER, C., COHEN, M. S., MICHAEL, N. L., BEDFORD, T., & ROLLAND, M. (2021). SARS-CoV-2 Variants in Patients with Immunosuppression. *The New England journal of medicine*, 385(6), 562–566. <https://doi.org/10.1056/NEJMsb2104756>

CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5, 536–544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z

COSTA-JÚNIOR, L. M., REMBECK, K., RIBEIRO, M. F., BEELITZ, P., PFISTER, K., & PASSOS, L. M. (2007). Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. *Veterinary Journal*, 174(3), 673-676. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.11.002

CRIADO, A., MARTINEZ, J., BULING, A., BARBA, J. C., MERINO, S., JEFFERIES, R., ... IRWIN, P. J. (2006). New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Veterinary Parasitology*, 142, 238-247. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.004>

CRIADO-FORNELIO, A., MARTINEZ-MARCOS, A., BULING-SARAÑA, A., & BARBA-CARRETERO, J. C. (2003). Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Veterinary Microbiology*, 93(4), 307-317. doi: 10.1016/s0378-1135(03)00044-0

CRIADO-FORNELIO, A., MARTINEZ-MARCOS, A., BULING-SARAÑA, A., & BARBA-CARRETERO, J. C. (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology*, 113(3-4), 189-201. doi: 10.1016/s0304-4017(03)00078-5

CUI, J., LI, F., & SHI, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181-192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>

CUTLER, S. J., FOOKS, A. R., & VAN DER POEL, W. H. (2010). Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 1-7. doi: 10.3201/eid1601.081467

DA SILVA, A. V., DA SILVA, R. C., ZAMPROGNA, T. O., & LUCAS, T. M. (2010). *Toxoplasma gondii* em suínos com ênfase na contribuição brasileira. *Scientia Medica*, 20(1), 120-130. Recuperado de <https://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/article/view/5884>

DANTAS-TORRES, F., & FIGUEREDO, L. A. (2006). Canine babesiosis: A Brazilian perspective. *Veterinary Parasitology*, 141, 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.030>

DANTAS-TORRES, F., DA SILVA, Y.Y., DE OLIVEIRA MIRANDA, D.E. *et al.* Ehrlichia spp. infection in rural dogs from remote indigenous villages in north-eastern Brazil. *Parasites Vectors* **11**, 139 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2738-3>

DE ADOLFO, M. S., & VIEIRA DA SILVA, A. (2022). Impacto da pandemia COVID-19 sobre cães, gatos e tutores: Percepções e consequências nas relações homem-animal. *Ciências Biológicas*, 26. <https://doi.org/10.13102/semic.vi26.9434>

DE BORTOLI, C. P., ANDRÉ, M. R., SEKI, M. C., PINTO, A. A., MACHADO, S. T., & MACHADO, R. Z. (2012). Detection of hemoplasma and *Bartonella* species and co-infection with retroviruses in cats subjected to a spaying/neutering program in Jaboticabal, SP, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(3), 219-223. doi: 10.1590/s1984-29612012000300008

DE LORENZO, C., BIANCHI, M. V., EHLERS, L. P., VIELMO, A., PEREIRA, P. R., SONNE, L. (2021). Rangelia vitalii molecular and histological quantification in tissues comparing crab-eating foxes (Cercopithecus thous) and domestic dogs. *Ticks and Tick-borne Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101731>

DE OLIVEIRA CM, YANG S, DUARTE MA, FIGUEIREDO DM, DO ROSARIO BATISTA LM, MARR H, MCMANUS CM, ANDRÉ MR, BIRKENHEUER AJ, PALUDO GR. Piroplasmid infection is not associated with clinicopathological and laboratory abnormalities in cats from Midwestern Brazil. *Parasitol Res.* 2022 Sep;121(9):2561-2570. doi: 10.1007/s00436-022-07602-8. Epub 2022 Jul 25. PMID: 35876912; PMCID: PMC10680102.

de Oliveira, C. M., Yang, S., Duarte, M. A., Figueiredo, D. M., do Rosario Batista, L. M., Marr, H., McManus, C. M., André, M. R., Birkenheuer, A. J., & Paludo, G. R. (2022). Piroplasmid infection is not associated with clinicopathological and laboratory abnormalities in cats from Midwestern Brazil. *Parasitology research*, 121(9), 2561–2570. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07602-8>

de Oliveira, C. M., Yang, T. S., Duarte, M. A., Marr, H., McManus, C. M., André, M. R., Birkenheuer, A. J., & Paludo, G. R. (2023). Canine piroplasmids: Molecular detection and laboratory characterization in dogs from Brasilia, Brazil, with the first molecular evidence of dog exposure to a novel opossum-associated Babesia sp. *Ticks and tick-borne diseases*, 14(4), 102181. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102181>

de Oliveira, L. S., Mourão, L. C., Oliveira, K. A., da Matta Agostini, M., de Oliveira, A. C., de Almeida, M. R., Fietto, J. L. R., Conceição, L. G., Filho, J. D. R., Galvão, M. A. M., & Mafra, C. (2009). Molecular detection of Ehrlichia canis in cats in Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(Suppl. 2), 53–54. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02175.x>

DE PAIVA DINIZ, P. P., SCHWARTZ, D. S., DE MORAIS, H. S., & BREITSCHWERDT, E. B. (2007). Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(4), 689-697. doi: 10.1089/vbz.2007.0129

DE SOUSA, K. C. M., FERNANDES, M. P., HERRERA, H. M., FRESCHI, C. R., MACHADO, R. Z., & ANDRÉ, M. R. (2018). Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9, 245-253. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.09.010>

de Souza Barbosa, AB *et al.* Infecção por SARS-CoV-2 em cães domésticos associada à carga viral do dono. *Res. Vet. Sci.* 153 , 61–65 (2022).

Decaro N, Balboni A, Bertolotti L, Martino PA, Mazzei M, Mira F *et al.* SARS-CoV-2 infection in dogs and cats: facts and speculations. *Front Vet Sci* 2021; 8: 619207. doi: 10.3389/fvets.2021.619207 DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.619207>

DECARO, N., & LORUSSO, A. (2020). Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. *Veterinary Microbiology*, 244, 108693. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108693>

DEFAUW, P., SCHOEMAN, J. P., LEISEWITZ, A. L., ... DAMINET, S. (2020). Evaluation of acute kidney injury in dogs with complicated or uncomplicated *Babesia rossi* infection. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 11, 101406. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101406>

DEHIO, C. (2004). Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 58, 365-390. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123700

DENG, J., JIN, Y., LIU, Y., ... TIAN, K. (2020). Serological survey of SARS-CoV-2 for experimental, domestic, companion and wild animals excludes intermediate hosts of 35 different species of animals. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(4), 1745-1749. <https://doi.org/10.1111/tbed.13577>

DESMONTS, G., & REMINGTON, J. S. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, 11(6), 562–568.

DHAMA, K., *et al.* (2020). COVID-19: Zoonotic Aspects. *Veterinary Quarterly*, 40(1), 169-182.

DIAS, H. G., RESCK, M. E. B., CALDAS, G. C., ... DOS SANTOS, F. B. (2021). Neutralizing antibodies for SARS-CoV-2 in stray animals from Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*, 16(3), e0248578. doi: 10.1371/journal.pone.0248578.

DIAZ, M. H., BAI, Y., MALANIA, L., WINCHELL, J. M., & KOSOY, M. Y. (2012). Development of a novel genus-specific real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bartonella* species and genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(5), 1645-1649. doi: 10.1128/JCM.06621-11.

DO, T., KAMYINGKIRD, K., CHIMNOI, W., & INPANKAEW, T. (2021). Evaluation of hematological alteration of vector-borne pathogens in cats from Bangkok, Thailand. *BMC Veterinary Research*, 17, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02737-1>.

DOS SANTOS PETRY, L., DOS SANTOS, A. P., DORNELLES, G. L., MELLO, C. B. E., DA SILVA, A. S., DILLMANN, J. B., & DOS ANJOS LOPES, S. T. (2020). Hemotropic mycoplasma in domestic cats from the central region of Rio Grande do Sul state, Brazil. *Ciência Animal*, 30(1), 1-10.

DOS SANTOS, A. P., DOS SANTOS, R. P., BIONDO, A. W., ... & MESSICK, J. B. (2008). Infección por hemoplasma en paciente VIH positivo, Brasil. *Enfermedades Infecciosas Emergentes*, 14, 1922–1924. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080964>.

DOS SANTOS, A. P., DOS SANTOS, R. P., BIONDO, A. W., DORA, J. M., GOLDANI, L. Z., DE OLIVEIRA, S. T., DE SÁ GUIMARÃES, A. M., TIMENETSKY, J., DE MORAIS, H. A., GONZÁLEZ, F. H., & MESSICK, J. B. (2008). Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 14(12), 1922–1924. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080964>

DRUMMOND, M. R., DOS SANTOS, L. S., ... DINIZ, P. P. V. D. P., *et al.* (2023). Comparison of molecular methods for *Bartonella henselae* detection in blood donors. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 17(6), e0011336. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011336>.

DRUMMOND, M. R., SANTOS, L. S. D., ... VELHO, P. E. N. F. (2023). Detection of *Bartonella henselae* DNA in the blood of patients with livedoid vasculopathy. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2022.07.007>.

DUBEY, J. P. (1991). Toxoplasmosis—an overview. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 22(Suppl), 88–92.

DUBEY, J. P. (2021). *Toxoplasmosis of Animals and Humans* (3rd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003199373>.

DUBEY, J. P., & JONES, J. L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, 38, 1257–1278.

DUBEY, J. P., SU, C., CORTÉS, J. A., SUNDAR, N., GOMEZ-MARIN, J. E., POLO, L. J., ZAMBRANO, L., MORA, L. E., LORA, F., JIMENEZ, J., KWOK, O. C., SHEN, S. K., ZHANG, X., NIETO, A., & THULLIEZ, P. (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Veterinary parasitology*, 141(1-2), 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.037>

DUBEY, J. P., ZARNKE, R., ... BRIGGS, M., *et al.* (2003). *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology*, 116(4), 275-296. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00263-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00263-2).

DUMIC, I., JEVTICIC, D., VESELINOVIC, M., ... RAMANAN, P. (2022). Human Granulocytic Anaplasmosis-A Systematic Review of Published Cases. *Microorganisms*, 10(7), 1433. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071433>

DUMLER, J. S. (2012). *Anaplasma* and *Ehrlichia* infection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1267(1), 114-121.

DUMLER, J. S., BARBET, A. F., ... & RIKIHISA, Y. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6), 2145-2165.

EFSA PANEL ON ANIMAL HEALTH AND WELFARE (AHAW), NIELSEN, S. S., ALVAREZ, J., BICOUT, D. J., CALISTRI, P., CANALI, E., *et al.* (2023). SARS-CoV-2 in animals: susceptibility of animal species, risk for animal and public health, monitoring, prevention and control. *EFSA journal. European Food Safety Authority*, 21(2), e07822. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7822>

ELBEZ-RUBENSTEIN, A. (2009). Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *Journal of Infectious Diseases*, 199, 280–285.

Enriquez, G. F., Macchiaverna, N. P., Argibay, H. D., López Arias, L., Farber, M., Gürtler, R. E., Cardinal, M. V., & Garbossa, G. (2019). Polyparasitism and zoonotic parasites in dogs from a rural area of the Argentine Chaco. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*, 16, 100287. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100287>

EPIFANIO, I. D. S., RODRIGUES, D. D. S., ... BRANDESPIM, D. F. (2021). First report of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection in two asymptomatic cats in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. *Veterinary World*, 14(10), 2839-2842. doi: 10.14202/vetworld.2021.2839-2842.

EPIFANIO, I. D. S., RODRIGUES, D. D. S., DE LIMA, L. B., NOGUEIRA, M. A. A., FELIX, L. R. D. M. P., DE ALMEIDA, B. F., FARIAS, C. K. D. S., *ET AL.* (2021). First report of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection in two asymptomatic cats in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. *Veterinary world*, 14(10), 2839–2842. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2839-2842>

EREMEEVA, M. E., GERNS, H. L., ... KOEHLER, J. E. (2007). Bacteremia, fever, and splenomegaly caused by a newly recognized *Bartonella* species. *New England Journal of Medicine*, 356(23), 2381-2387. doi: 10.1056/NEJMoa065987.

ESPOSITO, M. M., TURKU, S., LEHRFIELD, L., & SHOMAN, A. (2023). The Impact of Human Activities on Zoonotic Infection Transmissions. *Animals : an open access journal from MDPI*, 13(10), 1646. <https://doi.org/10.3390/ani13101646>

EUZÉBY, J. P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 590-592. doi: 10.1099/00207713-47-2-590.

FABER, J., & FONSECA, L. M. (2014). How sample size influences research outcomes. *Dental press journal of orthodontics*, 19(4), 27–29. <https://doi.org/10.1590/2176-9451.19.4.027-029.ebo>

FAN, H., ZHOU, L., LV, J. *et al.* Bacterial coinfections contribute to severe COVID-19 in winter. *Cell Res* 33, 562–564 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41422-023-00821-3>

FAR, I. R., NAVA, S., ... ZINTL, A. (2021). Molecular detection of piroplasmids in ticks infesting dogs and hedgehogs in natural and urban areas in Argentina. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 25, 100563. doi: 10.1016/j.vprsr.2021.100563.

FARNIA, P., AGHAJANI, J., ... VELAYATI, A. A. (2020). Evidence for SARS-CoV-2 circulating among stray dogs and cats: Should we worry about our pets during the COVID-19 Pandemic? *Biomed Biotechnol Res J*, 4(Suppl S1), 49-55. Disponível em: <https://www.bmbtrj.org/text.asp?2020/4/5/49/292079>

FDA. (2021). Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit, Qualitative Assay for Use on Real-Time RT-PCR, Instruments Instructions for Use. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/145265/download>.

FERNANDES, A. J., ELSHAFIE, N. O., ... DOS SANTOS, A. P. (2022). Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in wild boars, hunting dogs, and hunters from two Brazilian regions. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(2), 908-912. doi: 10.1111/tbed.14038.

FERNANDES, S. J. (2018). Diversidade de espécies de *Anaplasma* spp. em bovinos amostrados em Maputo, Moçambique (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Pag. 73. https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/154771/fernandes_sj_me_jabo_int.pdf?sequence=5&isAllowed=y.

FERNÁNDEZ-BASTIT, L., MARFIL, S., ... SEGALÉS, J. (2022). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection and humoral responses against different variants of concern in domestic pet animals and stray cats from North-Eastern Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(6), 3518-3529. doi: 10.1111/tbed.14714.

FERNÁNDEZ-BELLON, H., SOLANO-GALLEGO, L., ... FERRER, L. (2006). Immune Response to *Leishmania infantum* in Healthy Horses in Spain. *Veterinary Parasitology*, 135, 181–185. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.09.007.

FERRAZ, Alexsander *et al.* Anaplasmosis in Domestic Feline (*Felis catus*) on South of Brazil: a Case Report. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 398–401, 2023. DOI: 10.17921/1415-6938.2022v26n4p398-401. Disponível em:

<https://ensaioseciencia.pgsscogna.com.br/ensaioeciencia/article/view/10017>. Acesso em: 28 jul. 2024.

FERROGLIO, E., BOSIO, F., ... ZANET, S. (2014). *Toxoplasma gondii* in sympatric wild herbivores and carnivores: epidemiology of infection in the Western Alps. *Parasites & Vectors*, 7, 196. doi: 10.1186/1756-3305-7-196.

FINOKETTI, F. (2011). Ocorrência dos vírus da imunodeficiência felina (FIV) e leucemia felina (FeLV) em felinos no município de Porto Alegre. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

FIUZA, L. V. R.; CUNHA, J. M. G.; CUNHA, A. G.; CUNHA, A. M. G. (2020). Ciclo de replicação e diagnóstico da infecção pelo SARS-CoV-2. *Revista Fontes Documentais*, 3, 127-140. Disponível em: <http://hdl.handle.net/20.500.11959/brapci/151046>. Acesso em: 23 ago. 2023.

FOLEY, J. E. (2022). Hemotropic Mycoplasma Infections in Animals. MSD Veterinary Manual. <https://www.msddvetmanual.com/circulatory-system/blood-parasites/hemotropic-mycoplasma-infections-in-animals>.

FOROUGH-PARVAR, F., SARKARI, B., ... HATAM, G. (2021). FML-ELISA: A Novel Diagnostic Method for Detection of Feline Leishmaniasis in Two Endemic Areas of Iran. *Journal of Parasitic Diseases*, 45, 279–284. doi: 10.1007/s12639-020-01316-3.

FOURNIER, G. F. da S. R., PINTER, A., ... DIAS, R. A. (2020). Implications of domestic dogs in the epidemiology of *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest and *Rangelia vitalii* in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 29, 1–17. doi: 10.1590/s1984-29612020003.

FOURNIER, G. F., LOPES, M. G., ... GENNARI, S. M. (2014). *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from forest fragments of the municipality of Natal, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(4), 501-508. doi: 10.1590/S1984-29612014092.

FRAZZINI, S., AMADORI, M., ... RIVA, F. (2022). SARS-CoV-2 infections in animals, two years into the pandemic. *Archives of Virology*, 167, 2503–2517. doi: 10.1007/s00705-022-05609-1.

FREIRE, D. A. C., OLIVEIRA, I. V. P. M., FERREIRA, H. I. P., ANDRADE, V. C. P., SILVA, C. R. F., KURISSIO, J. K., *et al.* (2017). Abortion and fetal death in bitches due to anemia caused by vector-borne diseases. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69(05), Sep-Oct. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9439>

FRITZ, D. (2010). A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). *Parasitology Research*, 106, 1339–1342. doi: 10.1007/s00436-010-1804-3.

FRITZ, M., ROSOLEN, B., ... GOUILH, M. A. (2021). High prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in pets from COVID-19+ households. *One Health*, 11, 100192.

FRITZ, M., ROSOLEN, B., KRAFFT, E., BECQUART, P., ELGUERO, E., VRATSKIKH, O., DENOLLY, S., BOSON, B., VANHOMWEGEN, J., *et al.* (2021). High prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in pets from COVID-19+ households. *One health (Amsterdam, Netherlands)*, 11, 100192. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100192>

FURQUIM, M. E. C., DO AMARAL, R., ... ANDRÉ, M. R. (2021). Genetic diversity and Multilocus Sequence Typing Analysis of *Bartonella henselae* in domestic cats from Southeastern Brazil. *Acta Tropica*, 222, 106037. doi: 10.1016/j.actatropica.2021.106037.

FURTADO, M. M., TANIWAKI, S. A., ... TÔRRES, N. M. (2017). Is the free-ranging jaguar (*Panthera onca*) a reservoir for *Cytauxzoon felis* in Brazil? *Ticks and Tick-borne Diseases*, 8, 470–476. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.02.005.

GABRIELLI, S., Otašević, S., ... CANCRINI, G. (2015). Canine Babesioses in Noninvestigated Areas of Serbia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15, 535–538. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1797>.

GALHARDO, J.A., BARBOSA, D.S., KMETIUK, L.B. *et al.* (2023). Molecular detection and characterization of SARS-CoV-2 in cats and dogs of positive owners during the first COVID-19 wave in Brazil. *Sci Rep* 13, 14418. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41285-0>

GANCHÓ, S. I. P. A. (2015). *Caracterização de 70 casos de anemia em gatos* [Dissertação de mestrado, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Faculdade de Medicina Veterinária].

GARAY, A. F. G., FRAENKEL, S., DIAZ, J. J. A. R., RECALDE, O. D. S., GÓMEZ, M. C. V., RIQUELME, J. A. M., ARZE, P. V., CENTURIÓN, G. N. R., BRITOS, M., & ROLÓN, M. (2022). Sensitivity comparison for the *Leishmania* spp. detection in different canine tissues using PCR-HRM. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 55, e0069-2022. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0069-2022>

GARIGLIANY, M., VAN LAERE, A. S., ... DESMECHT, D. (2020). SARS-CoV-2 Natural Transmission from Human to Cat, Belgium, March 2020. *Emerging Infectious Diseases*, 26(12), 3069–3071. doi: 10.3201/eid2612.202223.

GEORGE, J. W., RIDEOUT, B. A., GRIFFEY, S. M., & PEDERSEN, N. C. (2002). Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 63(8), 1172–1178. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.1172>

GINSBURG AS, KLUGMAN KP. COVID-19 pneumonia and the appropriate use of antibiotics. *The Lancet Global Health*. 2020;8(12):e1453–e1454. doi:10.1016/S2214-109X(20)30444-7

GITHAKA, N., KONNAI, S., ... OHASHI, K. (2012). Molecular detection and characterization of potentially new *Babesia* and *Theileria* species/variants in wild felids from Kenya. *Acta Tropica*, 124(1), 71-78. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.06.013.

GONÇALVES, L. R., HARRUS, S., HERRERA, H. M., GUTIÉRREZ, R., PEDRASSANI, D., NANTES, W. A. G., SANTOS, F. M., PORFÍRIO, G. E. O., BARRETO, W. T. G., DE MACEDO, G. C., ASSIS, W. O., CAMPOS, J. B. V., DA SILVA, T. M. V., BIOLCHI, J., DE SOUSA, K. C. M., NACHUM-BIALA, Y., BARROS-BATTESTI, D. M., MACHADO, R. Z., & ANDRÉ, M. R. (2020). Low occurrence of *Bartonella* in synanthropic mammals and associated ectoparasites in peri-urban areas from Central-Western and Southern Brazil. *Acta tropica*, 207, 105513. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105513>

GONÇALVES-OLIVEIRA, J., ROZENTAL, T., GUTERRES, A., TEIXEIRA, B. R., ANDRADE-SILVA, B. E., COSTA-NETO, S. F. D., FURTADO, M. C., MORATELLI, R., D'ANDREA, P. S., & LEMOS, E. R. S. (2020). Investigation of *Bartonella* spp. in Brazilian mammals with emphasis on rodents and bats from the Atlantic Forest. *International journal for parasitology. Parasites and wildlife*, 13, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.07.004>

GUAN, W., NI, Z., ... YAN, Y. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *The New England Journal of Medicine*, 382(18), 1708-1720. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>.

GUIMARÃES, A., RAIMUNDO, J. M., PEIXOTO, M. P., DA SILVA, C. B., PIRES, M. S., SANTOS, H. A., & BALDANI, C. D. (2019). Molecular detection, characterization of *Anaplasma* spp. in domestic cats from Rio de Janeiro state. *Acta tropica*, 191, 239–242. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.003>

GUIMARÃES, A., RAIMUNDO, J. M., RODRIGUES, R. B., PEIXOTO, M. P., SANTOS, H. A., ANDRÉ, M. R., MACHADO, R. Z., & BALDANI, C. D. (2019). *Ehrlichia* spp. infection in domestic cats from Rio de Janeiro State, southeast Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28(1). <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180088>

GUO, Y. R., CAO, Q. D., ... TAN, K. S. (2020). The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Military Medical Research*, 7(1), 11. doi: 10.1186/s40779-020-00240-0.

HABER, M. D., TUCKER, M. D., ... BIRKENHEUER, A. J. (2007). The detection of *Cytauxzoon felis* in apparently healthy free-roaming cats in the USA. *Veterinary Parasitology*, 146, 316–320. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.029>.

HABIBI, G., IMANI, A., ... BOZORGI, S. (2020). Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* and *Theileria annulata* in free-ranging dogs and ticks from Shahriar county, Tehran province, Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 15(3), 321–331. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v15i3.4196>.

HALE, V. L., DENNIS, P. M., ... BOWMAN, A. S. (2022). SARS-CoV-2 infection in free-ranging white-tailed deer. *Nature*, 602(7897), 481-486. doi: 10.1038/s41586-021-04353-x.

HALFMANN, P. J., ... KAWAOKA, Y. (2020). Transmission of SARS-CoV-2 in Domestic Cats. *New England Journal of Medicine*, 383(6), 592-594. doi: 10.1056/NEJMc2013400.

- HAMER, S. A., GHAI, R. R., ZECCA, I. B., *et al.* (2021). SARS-CoV-2 B.1.1.7 variant of concern detected in a pet dog and cat after exposure to a person with COVID-19, USA. *Transboundary and Emerging Diseases*, 00(00), 1–3. <https://doi.org/10.1111/tbed.14122>
- HANANEH, W. M., RADHI, A., MUKBEL, R. M., & ISMAIL, Z. B. (2022). Effects of parasites coinfection with other pathogens on animal host: A literature review. *Veterinary world*, 15(10), 2414–2424. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2414-2424>
- HARVEY, J. W., SIMPSON, C. F., & GASKIN, J. M. (1978). Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. *Journal of Infectious Diseases*, 137(2), 182-188. <https://doi.org/10.1093/infdis/137.2.182>
- HEGARTY, B. C., QUROLLO, B. A., THOMAS, B., PARK, K., CHANDRASHEKAR, R., BEALL, M. J., THATCHER, B., & BREITSCHWERDT, E. B. (2015). Serological and molecular analysis of feline vector-borne anaplasmosis and ehrlichiosis using species-specific peptides and PCR. *Parasites & vectors*, 8, 320. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0929-8>
- HEKER, M. M., NAKAMURA, A. A., & MEIRELES, M. V. (2016). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in Brazilian rabbit farms. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68(4), 977-982. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8836>
- HICKS, C.A.E, WILLI, B., RIOND, B., *et al.* Protective immunity against infection with *Mycoplasma haemofelis*. *Clin Vaccine Immunol* 2015;22(1):108–18.
- HILL, D. E., & DUBEY, J. P. (2013). *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. *International Journal of Parasitology*, 43(2), 107-113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.012>
- HOFFMANN, M., KLEINE-WEBER, H., SCHROEDER, S., KRÜGER, N., HERRLER, T., ERICHSEN, S., ... PÖHLMANN, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- HÖFT, M. A., BURGERS, W. A., & RIOU, C. (2024). The immune response to SARS-CoV-2 in people with HIV. *Cellular & molecular immunology*, 21(2), 184–196. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01087-w>
- HOLSHUE, M. L., DEBOLT, C., LINDQUIST, S., LOFY, K. H., WIESMAN, J., BRUCE, H., ... UYEKI, T. M. (2020). First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *New England Journal of Medicine*, 382(10), 929-936. <https://doi:10.1056/NEJMoa2001191>
- HOMER, M. J., AGUILAR-DELFÍN, I., TELFORD, S. R. III, KRAUSE, P. J., & PERSING, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 451-469. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.451>

HOUBRAKEN, J., KOCSUBÉ, S., VISAGIE, C. M., YILMAZ, N., WANG, X. C., MEIJER, M., ... FRISVAD, J. C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*, 95, 5-169. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>

<https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017000900010>

HU, B., ZENG, L. P., YANG, X. L., GE, X. Y., ZHANG, W., LI, B., ... SHI, Z. L. (2017). Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathogens*, 13(11), e1006698. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006698>

HUANG Y, SKARLUPKA AL, JANG H, BLAS-MACHADO U, HOLLADAY N, HOGAN RJ, ROSS TM. SARS-CoV-2 and Influenza A Virus Coinfections in Ferrets. *J Virol*. 2022 Mar 9;96(5):e0179121. doi: 10.1128/JVI.01791-21

HUANG, Y., SKARLUPKA, A. L., JANG, H., BLAS-MACHADO, U., HOLLADAY, N., HOGAN, R. J., & ROSS, T. M. (2022). SARS-CoV-2 and Influenza A Virus Coinfections in Ferrets. *Journal of virology*, 96(5), e0179121. <https://doi.org/10.1128/JVI.01791-21>

IBGE. (2021). Estimativas da população residente para os municípios e para as Unidades da Federação brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9103-estimativas-de-populacao.html>

INÁCIO, E. L., PÉREZ-MACCHI, S., ALABI, A., BITTENCOURT, P., & MÜLLER, A. (2019). Prevalence and molecular characterization of piroplasms in domestic dogs from Paraguay. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.009>

JAIN, N. C. (1993). *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger.

JAIN, N. C. (2003). *Essentials of Veterinary Hematology*. Malvern, Pennsylvania: Lea & Febiger.

JAIRAK, W., CHAROENKUL, K., CHAMSAI, E., UDOM, K., CHAIYAWONG, S., BUNPAPONG, N., ... AMONSIN, A. (2022). First cases of SARS-CoV-2 infection in dogs and cats in Thailand. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(4), e979–e991. <https://doi.org/10.1111/tbed.14383>

JALOVECKA, M., HAJDUSEK, O., SOJKA, D., KOPACEK, P., & MALANDRIN, L. (2018). The Complexity of Piroplasms Life Cycles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 248. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00248>

JALOVECKA, M., SOJKA, D., ASCENCIO, M., & SCHNITTGER, L. (2019). Babesia life cycle—when phylogeny meets biology. *Trends in Parasitology*, 35, 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.007>

JARRAH, S. A., KMETIUK, L. B., VALLERIANI, F., BONFINI, B., LORUSSO, A., VASINIOTI, V., ... DUTRA, V. (2023). SARS-CoV-2 antibodies in dogs and cats in a highly infected area of Brazil during the pandemic. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1111728. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1111728>

JENSEN, W. A., FALL, M. Z., ROONEY, J., KORDICK, D. L., & BREITSCHWERDT, E. B. (2000). Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5), 1717-1722. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.5.1717-1722.2000>

JOHN, G., SAHAJPAL, N. S., MONDAL, A. K., ANANTH, S., WILLIAMS, C., CHAUBEY, A., ROJANI, A. M., & KOLHE, R. (2021). Next-Generation Sequencing (NGS) in COVID-19: A Tool for SARS-CoV-2 Diagnosis, Monitoring New Strains and Phylodynamic Modeling in Molecular Epidemiology. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(2), 845-867. doi: 10.3390/cimb43020061.

JONES, J. L., & DUBEY, J. P. (2012). Foodborne toxoplasmosis. *Clinical Infectious Diseases*, 55(6), 845-851. doi: 10.1093/cid/cis508.

JONES, J. L., DARGELAS, V., ROBERTS, J., PRESS, C., REMINGTON, J. S., & MONTOYA, J. G. (2009). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 49(6), 878-884. doi: 10.1086/605433.

JONES, J. L., KRUSZON-MORAN, D., SANDERS-LEWIS, K., & WILSON, M. (2007). *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2004, decline from the prior decade. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77, 405-410.

KAUEWMONGKOL, G., LUKKANA, N., YANGTARA, S., KAUEWMONGKOL, S., THENGCHAI SRI, N., SIRINARUMITR, T., JITTAPALAPONG, S., & FENWICK, S. G. (2017). Association of *Ehrlichia canis*, Hemotropic Mycoplasma spp. and *Anaplasma platys* and severe anemia in dogs in Thailand. *Veterinary Microbiology*, 201, 195-200. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.01.022.

KAISER, P. O., RIESS, T., O'ROURKE, F., LINKE, D., & KEMPF, V. A. (2011). *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(1), 7-15. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.06.004.

KASSAB, S. (2021). Identificação molecular de hemoparasitos em cães no município de Rio Branco, Acre. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Acre.

KESSLER, Y., HELFER-HUNGERBUEHLER, A. K., CATTORI, V., MELI, M. L., ZELLWEGER, B., OSSENT, P., ... HOFMANN-LEHMANN, R. (2009). Quantitative TaqMan real-time PCR assays for gene expression normalization in feline tissues. *BMC Molecular Biology*, 10, 106. doi: 10.1186/1471-2199-10-106.

- KETZ-RILEY, C. J., REICHARD, M. V., VAN DEN BUSSCHE, R. A., HOOVER, J. P., MEINKOTH, J., & KOCAN, A. A. (2003). An intraerythrocytic small piroplasm in wild-caught Pallas's cats (*Otocolobus manul*) from Mongolia. *Journal of Wildlife Diseases*, 39, 424–430. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.2.424>
- Kim, D., Lee, J. Y., Yang, J. S., Kim, J. W., Kim, V. N., & Chang, H. (2020). The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, 181(4), 914–921.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>
- KIRKPATRICK, C. E., FARRELL, J. P., & GOLDSCHMIDT, M. H. (1984). *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. *Experimental Parasitology*, 58(2), 125–131. doi: 10.1016/0014-4894(84)90027-4
- KJEMTRUP, A. M., & CONRAD, P. A. (2006). A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. *Veterinary Parasitology*, 138, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.045>
- KJEMTRUP, A. M., WAINWRIGHT, K., MILLER, M., PENZHORN, B. L., & CARRENO, R. A. (2006). *Babesia conradae*, sp. nov., a small canine *Babesia* identified in California. *Veterinary Parasitology*, 138, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.044>
- KLAUS, J., MELI, M. L., WILLI, B., NADEAU, S., BEISEL, C., STADLER, T., ... HOFMANN-LEHMANN, R. (2021). Detection and Genome Sequencing of SARS-CoV-2 in a Domestic Cat with Respiratory Signs in Switzerland. *Viruses*, 13(3), 496. <https://doi.org/10.3390/v13030496>
- KOCAN, K. M., DE LA FUENTE, J., & CABEZAS-CRUZ, A. (2015). The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. *Revue Scientifique et Technique*, 34(2), 577–586. doi: 10.20506/rst.34.2.2381
- KÖSEOĞLU, A. E., CAN, H., GÜVENDİ, M., KARAKAVUK, M., MANYATSI, P., ERKUNT ALAK, S., ... ÜN, C. (2022). Molecular prevalence and genetic diversity of *Bartonella* spp. in stray cats of İzmir, Turkey. *Parasites & Vectors*, 15(1), 305. doi: 10.1186/s13071-022-05431-3
- KUHLMEIER, E., CHAN, T., KLAUS, J., PINEROLI, B., GEISSER, E., HOFMANN-LEHMANN, R., & MELI, M. L. (2022). A Pre- and Within-Pandemic Survey of SARS-CoV-2 RNA in Saliva Swabs from Stray Cats in Switzerland. *Viruses*, 14(4), 681. doi: 10.3390/v14040681
- KUMAR, N., SHARMA, S., BARUA, S., TRIPATHI, B. N., & ROUSE, B. T. (2018). Virological and Immunological Outcomes of Coinfections. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00111–17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00111-17>
- LAM, T. T., JIA, N., ZHANG, Y. W., SHUM, M. H., JIANG, J. F., ZHU, H. C., ... & YUEN, K. Y. (2020). Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*, 583(7815), 282–285. doi: 10.1038/s41586-020-2169-0

LAU, S. K., WOO, P. C., & YUEN, K. Y. (2015). Emerging respiratory and enteric viruses: insights from the genomic and evolutionary perspectives. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 528-542. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3472>

LAURING, A. S., & HODCROFT, E. B. (2021). Genetic Variants of SARS-CoV-2-What Do They Mean? *JAMA*, 325(6), 529-531. doi: 10.1001/jama.2020.27124.

LEE, C.-Y.; LEE, S.-L.; KIM, E.; KANG, J.; JUNG, S.; KIM, N.; JUNG, J.; LEE, D.H.; ROH, Y.-H.; LEE, D. (2023) Whole Blood Viscosity Reference Intervals and Its Correlation with Hematology and Serum Chemistry in Cats Using Scanning Capillary Method. *Animals*, 13, 3694. <https://doi.org/10.3390/ani13233694>

LEHMANN, T., GRAHAM, D. H., DAHL, E., SREEKUMAR, C., LAUNER, F., CORN, J. L., *et al.* (2003). Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. *Infection, Genetics and Evolution*, 3(2), 135-141. [http://dx.doi.org/10.1016/S1567-1348\(03\)00067-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-1348(03)00067-4).

Leisewitz, A. L., Goddard, A., Clift, S., Thompson, P. N., de Gier, J., Van Engelshoven, J. M. A. J. A. J., & Schoeman, J. P. (2019). A clinical and pathological description of 320 cases of naturally acquired *Babesia rossi* infection in dogs. *Veterinary parasitology*, 271, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.06.005>

LI, X. X., & ZHOU, X. N. (2013). Co-infection of tuberculosis and parasitic diseases in humans: a systematic review. *Parasites & vectors*, 6, 1-12.

LI, X., GIORGI, E. E., MARICHANNEGOWDA, M. H., FOLEY, B., XIAO, C., KONG, X. P., *et al.* (2020). Emergence of SARS-CoV-2 through recombination and strong purifying selection. *Science Advances*, 6(27), eabb9153. doi: 10.1126/sciadv.abb9153.

LICITRA, B. N., DUHAMEL, G. E., & WHITTAKER, G. R. (2014). Canine enteric coronaviruses: emerging viral pathogens with distinct recombinant spike proteins. *Viruses*, 6(8), 3363-3376. doi: 10.3390/v6083363.

LICITRA, B. N., MILLET, J. K., & REGAN, A. D. (2020). Animal Coronaviruses and Coronavirus Disease 2019: Lessons for One Health Approach. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(7), e02040-19. <https://doi.org/10.1128/jcm.02040-19>.

LICITRA, B. N., MILLET, J. K., REGAN, A. D., HAMILTON, B. S., RINALDI, V. D., DUHAMEL, G. E., *et al.* (2013). Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerging Infectious Diseases*, 19(7), 1066-1073. doi: 10.3201/eid1907.121094.

LIMA, C., COLELLA, V., LATROFA, M. S., CARDOSO, L., OTRANTO, D., & ALHO, A. M. (2019). Molecular Detection of *Leishmania* spp. in Dogs and a Cat from Doha, Qatar. *Parasites & Vectors*, 12, 125. doi: 10.1186/s13071-019-3394-y.

LIMA, L. S., LEMOS, E. R., & MAFRA, C. L. (2017). Bartonelose felina: revisão de literatura. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 54(3), 241-251.

- LIMA, P. M. (2022). Infecção por *Anaplasma* sp em canino: Relato de caso. *Ciências Agrárias*, 26(112). <https://doi.org/10.5281/zenodo.6855715>
- LITTLE, S. E. (2010). Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40, 1121–1140.
- LIU, C., SHI, W., BECKER, S. T., SCHATZ, D. G., LIU, B., & YANG, Y. (2021). Structural basis of mismatch recognition by a SARS-CoV-2 proofreading enzyme. *Science (New York, N.Y.)*, 373(6559), 1142–1146. <https://doi.org/10.1126/science.abi9310>
- LIU, J., GUAN, G., LIU, Z., LIU, A., MA, M., BAI, Q., *et al.* (2013). Additional data for new *Theileria* sp. from China based on the sequences of ribosomal RNA internal transcribed spacers. *Experimental Parasitology*, 133, 217–221.
- LIU, Y., HU, G., WANG, Y., REN, W., ZHAO, X., JI, F., *et al.* (2021). Functional and genetic analysis of viral receptor ACE2 orthologs reveals a broad potential host range of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(12), e2025373118. doi: 10.1073/pnas.2025373118.
- LOPES, S. T. A., LORETTI, A. P., MAZZANTI, C. M., FRANÇA, R. T., & DA SILVA, A. S. (2014). Canine rangelirosis due to *Rangelia vitalii*: From first report in Brazil in 1910 to current day – A review. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 1–32. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.005>
- LÓPEZ, C., DAPRATO, B., ZAMPOLINI, S., MAZZEO, C., CARDILLO, N., & SOMMERFELT, I. (2011). Risk factors and prevalence of IgG antibodies to *Toxoplasma gondii* in domestic cats: La Matanza, Buenos Aires, Argentina. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol*, 70(1), 29–34.
- LORETTI, A. P., & BARROS, S. S. (2005). Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 134, 193–213. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.011>
- LORUSSO, A., CALISTRI, P., PETRINI, A., SAVINI, G., & DECARO, N. (2020). Novel coronavirus (SARS-CoV-2) epidemic: a veterinary perspective. *Veterinaria Italiana*, 56(1), 5–10. doi: 10.12834/VetIt.2173.11599.1
- LOSOS, G. J. (1986). Babesiosis. In *Infections tropical diseases of domestic animals*. Canada: Longman Scientific, Technical. p.1-97.
- LOUISVILLE ZOO (2020). Female Snow Leopard Tests Positive for SARS-CoV-2 (MEDIA RELEASE). Retrieved from <https://louisvillezoo.org/louisville-zoo-female-snow-leopard-tests-positive-for-sars-cov-2-media-release/>
- LU, R., ZHAO, X., LI, J., NIU, P., YANG, B., WU, H., *et al.* (2020). Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)

- LU, X., WANG, L., SAKTHIVEL, S. K., WHITAKER, B., MURRAY, J., KAMILI, S., LYNCH, B., MALAPATI, L., BURKE, S. A., *et al.*, (2020). US CDC Real-Time Reverse Transcription PCR Panel for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerging infectious diseases*, 26(8), 1654–1665. <https://doi.org/10.3201/eid2608.201246>
- LU, R., ZHAO, X., LI, J., NIU, P., YANG, B., WU, H., WANG, W., SONG, H., HUANG, B., ZHU, N., BI, Y., MA, X., *et al.* (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565-574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- MACHADO, R. Z., DUARTE, J. M., DAGNONE, A. S., & SZABÓ, M. P. (2006). Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). *Veterinary Parasitology*, 139(1-3), 262–266. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.038>
- MACIEIRA, D. B., MESSICK, J. B., CERQUEIRA, A. M., FREIRE, I. M., LINHARES, G. F., ALMEIDA, N. K., & ALMOSNY, N. R. (2005). Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(1), 44–48. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2005.tb00008.x>
- MAGGI, R. G., & BREITSCHWERDT, E. B. (2005). Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1171–1176. doi: 10.1128/JCM.43.3.1171-1176.2005
- MAGGI, R. G., MASCARELLI, P. E., HAVENGA, L. N., NAIDOO, V., & BREITSCHWERDT, E. B. (2013). Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. *Parasites & Vectors*, 6, 103. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3637287/>
- MAIA, C., & CAMPINO, L. (2012). Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. *Journal of Tropical Medicine*, 2012, 541571. <https://doi.org/10.1155/2012/541571>
- MAIA, C., ALMEIDA, B., COIMBRA, M., FERNANDES, M. C., CRISTÓVÃO, J. M., RAMOS, C., ... CAMPINO, L. (2015). Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 8, 138. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0759-8>
- MAIA, C., GOMES, J., CRISTÓVÃO, J., NUNES, M., MARTINS, A., REBÊLO, E., ... CAMPINO, L. (2010). Feline *Leishmania* Infection in a Canine Leishmaniasis Endemic Region, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 174, 336–340. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.030>
- MAIA, L. M. P., CERQUEIRA, A. DE M. F., DE BARROS MACIEIRA, D., DE SOUZA, A. M., MOREIRA, N. S., DA SILVA, A. V., ... ALMOSNY, N. R. P. (2013). Cytauxzoon felis and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” coinfection in a Brazilian domestic cat (*Felis catus*). *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária*, 22, 289–291. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612013000200049>

- MAKSIMOVIĆ, Z., DERVIŠEVIĆ, M., ZAHIROVIĆ, A., & RIFATBEGOVIĆ, M. (2022). Seroprevalence of *Anaplasma* spp. and Ehrlichia spp. and molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma platys* in stray dogs in Bosnia and Herzegovina. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 13(2), 101875. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101875>
- MALHEIROS, J., COSTA, M. M., DO AMARAL, R. B., DE SOUSA, K. C. M., ANDRÉ, M. R., MACHADO, R. Z., & VIEIRA, M. I. B. (2016). Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7, 893–900. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.007>
- MANS, B. J., PIENAAR, R., & LATIF, A. A. (2015). A review of Theileria diagnostics and epidemiology. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4, 104–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.12.006>
- MARQUES, S. B., CALDART, E. T., PALAVRO, A. C. F., FERREIRA, F. P., CORDI, A., & PASQUALI, A. K. S. (2019). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs and cats domiciled in the west of Santa Catarina, Brazil. *Iniciação Científica CESUMAR*, 21(2), 115-122. <https://doi.org/10.17765/1518-1243.2019v21n2p115-122>
- MARTÍN-SÁNCHEZ, J., ACEDO, C., MUÑOZ-PÉREZ, M., PESSON, B., MARCHAL, O., & MORILLAS-MÁRQUEZ, F. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in Cats: Epidemiological Study in Spain. *Veterinary Parasitology*, 145, 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.005>
- MASSINI, P. F., DROZINO, R. N., OTOMURA, F. H., MONGRUEL, A. C. B., VALENTE, J. D. M., TOLEDO, M. J. D. O., ... VIEIRA, R. F. D. C. (2019). Detecção de Hemotropic Mycoplasma sp. en zarigüeyas de orejas blancas (*Didelphis albiventris*) del sur de Brasil. *Revista Brasileira De Parasitología Veterinária*, 28(3), 797–801. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019058>
- MEHLHORN, H., & SCHEIN, E. (1993). The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Advances in Parasitology*, 32, 271–318. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60442-6](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60442-6)
- MEISNER, J., BASZLER, T. V., KUEHL, K. H., RAMIREZ, V., BAINES, A., FRISBIE, L. A., LOFGREN, E. T., DEAVILA, D. M., WOLKING, R. M., BRADWAY, D. S., WILSON, H., LIPTON, B., KAWAKAMI, V., & RABINOWITZ, P. M. (2022). Household transmission of SARS-CoV-2 from humans to pets in Washington and Idaho: burden and risk factors. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2021.04.24.440952. <https://doi.org/10.1101/2021.04.24.440952>
- MENEZES BONFIM, D. (2021). Vigilância genômica do SARS-CoV-2 em Betim, Minas Gerais. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MESQUITA, J. R., HAKZE-VAN DER HONING, R., ALMEIDA, A., LOURENÇO, M., VAN DER POEL, W. H., & NASCIMENTO, M. S. (2015). Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Portugal, 2015. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(6), 586-588. <https://doi.org/10.1111/tbed.12409>

MESQUITA, J. R., OLIVEIRA, A. C., NEVES, F., MENDOZA, J. R., LUZ, M. F., CRESPO, I., DOS SANTOS, T. F., SANTOS-SILVA, S., VILHENA, H., & BARRADAS, P. F. (2021). Hemotropic *Mycoplasma* and *Bartonella* Species Diversity in Free-Roaming Canine and Feline from Luanda, Angola. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(6), 735. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060735>

MESSICK, J. B. (2004). Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): A review and new insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(1), 2-13. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-165X.2004.tb00342.x>

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. (2021). Painei Coronavírus. Recuperado de: <https://covid.saude.gov.br/>

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. (2023). Painei Coronavírus. Recuperado de: <https://covid.saude.gov.br/> acessado 27/06/2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL. (2021). Como se proteger? Confirma medidas não farmacológicas de prevenção e controle da pandemia do novo coronavírus. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/como-se-proteger>

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN DE ESPAÑA. (2020). Comunicación de un caso positivo a sars-cov-2 en cuatro leones en el zoo de Barcelona, en España (21/12/2020). https://www.oie.int/fileadmin/Home/MM/Spain_lions_21.12.2020.pdf

MINNICK, M. F., ANDERSON, B. E., LIMA, A., BATTISTI, J. M., LAWYER, P. G., & BIRTLES, R. J. (2014). Oroya fever and verruga peruana: Bartonelloses unique to South America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7), e2919.

MOL, J. P., SOAVE, S. A., TURCHETTI, A. P., PINHEIRO, G. R., PESSANHA, A. T., MALTA, M. C., TINOCO, H. P., FIGUEIREDO, L. A., GONTIJO, N. F., PAIXÃO, T. A., FUJIWARA, R. T., & SANTOS, R. L. (2015). Transmissibility of *Leishmania infantum* from maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) and bush dogs (*Speothos venaticus*) to *Lutzomyia longipalpis*. *Veterinary parasitology*, 212(3-4), 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.024>

MOODY, A. H., & CHIODINI, P. L. (2000). Methods for the detection of blood parasites. *Clinical & Laboratory Haematology*, 22(3), 189-201. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2257.2000.00318.x>

MOREIRA-SOTO, A., WALZER, C., CZIRJAK, G. A., RICHTER, M. H., MARINO, S. F., POSAUTZ, A., ... GREENWOOD, A. D. (2022). Evidencia serológica de que el SARS-CoV-2 no ha surgido en ciervos en Alemania o Austria durante la pandemia de COVID-19. *Microorganismos*, 10, 748. <https://doi.org/10.3390/microorganismos10040748>

MOSTAFAVI, E., EYBPOOSH, S., KARAMOUZIAN, M., KHALILI, M., HAJI-MAGHSOUDI, S., SALEHI-VAZIRI, M., ... BIGLARI, A.; SOBERANA STUDY GROUP. (2023). Efficacy and

Safety of a Protein-Based SARS-CoV-2 Vaccine: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Network Open*, 6(5), e2310302. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.10302>

MOURA MEB, SOUSA NETO AR, CHISSAMBA RE, CARVALHO ARB, PERES NVG, OLIVEIRA TA, VALLE ARMC, FREITAS DRJ. Tendências globais de pesquisas originais sobre a COVID-19 e coinfeção. *Rev Pre Infec e Saúde* [Internet]. 2022;8:4208. Disponível em: <http://periodicos.ufpi.br/index.php/repis/article/view/4208>. DOI: <https://doi.org/10.26694/repis.v8i1.4208>

MUDALIAR, S. V., ACHARY, G., & ALWAR, V. S. (1950). On a species of Babesia in an Indian wild cat (*Felis catus*). *Indian Veterinary Journal*, 26(5), 392–395.

NASH, J. Q., CHISSEL, S., JONES, J., WARBURTON, F., & VERLANDER, N. Q. (2005). Risk factors for toxoplasmosis in pregnant women in Kent, United Kingdom. *Epidemiology and Infection*, 133(3), 475–483. <https://doi.org/10.1017/s0950268804003620>

NATIONAL GEOGRAPHIC. (2020). Seven more big cats test positive for coronavirus at Bronx Zoo. Disponível em: <https://www.nationalgeographic.com/animals/2020/04/tiger-coronavirus-covid19-positive-test-bronx-zoo/>

NAVARRETE, M. G., CORDEIRO, M. D., BATISTA, Y., ALONSO, J. C., MÁRQUEZ, M., ROQUE, E., & FONSECA, A. (2017). Serological detection of *Toxoplasma gondii* in domestic dogs in the western region of Cuba. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*, 9, 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.03.005>

NAVARRO-LOPEZ, R. *et al.* Sequências genômicas quase completas representando um evento de transmissão zoonotica da linhagem B.1.189 do SARS-CoV-2 no México durante 2020. *Microbiol. Resour. Announc.* 11 , e0049722 (2022).

NEVES, M., LOPES, A. P., MARTINS, C., FINO, R., PAIXÃO, C., DAMIL, L., LIMA, C., ALHO, A. M., SCHALLIG, H. D. F. H., DUBEY, J. P., & CARDOSO, L. (2020). Survey of *Dirofilaria immitis* antigen and antibodies to *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* in cats from Madeira Island, Portugal. *Parasites & vectors*, 13(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3988-4>

NICOLA, M., ALSAFI, Z., SOHRABI, C., KERWAN, A., AL-JABIR, A., IOSIFIDIS, C., ... AGHA, R. (2020). The Socio-Economic Implications of the Coronavirus and COVID-19 Pandemic: A Review. *International Journal of Surgery*, 78, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2020.04.018>

NOMAH, D.K., REYES-URUEÑA, J., LLIBRE, J.M. *et al.* (2022). HIV and SARS-CoV-2 Co-infection: Epidemiological, Clinical Features, and Future Implications for Clinical Care and Public Health for People Living with HIV (PLWH) and HIV Most-at-Risk Groups. *Curr HIV/AIDS Rep* 19, 17–25. <https://doi.org/10.1007/s11904-021-00596-5>

NORMAND, V., BOULBRIA, G., BRISSONNIER, M., *et al.* (2020). Comparison of qPCR and blood smear microscopy for the diagnosis of *Mycoplasma suis* in a French veterinary practice. *Porcine Health Management*, 6, 3. <https://doi.org/10.1186/s40813-019-0143-8>

OHIA, C. M. D., & UWALAKA, E. C. (2021). COVID-19: A CALL TO ONE HEALTH ACTION. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*, 19(Suppl 1), S31-S37.

OIE - WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. (2020). Questions and Answers on the 2019 Coronavirus Disease (COVID-19). Disponível em: <https://rr-africa.oie.int/en/news/questions-and-answers-on-the-2019-coronavirus-disease-covid-19/>

OIE. (2020). Events in animals. [Acesso 2020 Nov 16]. Disponível em: <https://www.oie.int/en/scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/questions-and-answers-on-2019novel-coronavirus/events-in-animals/>

OIE. (2021). Questions and answers on COVID-19 and animals. World Organisation for Animal Health. Disponível em: <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/a-covid-22-01-2021.pdf>

OLIVEIRA, L. S., OLIVEIRA, K. A., MOURÃO, L. C., PESCATORE, A. M., ALMEIDA, M. R., CONCEIÇÃO, L. G., ... MAFRA, C. (2009). First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(Suppl 2), 55-56. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02635.x>

OLIVEIRA, M. M. D., FULLER, T. L., BRASIL, P., GABAGLIA, C. R., & NIELSEN-SAINES, K. (2020). Controlling the COVID-19 pandemic in Brazil: a challenge of continental proportions. *Nat. Med.*, 26 (10) (2020 Oct), pp. 1505-1506, <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1071-5>

OLIVEIRA, Marília Santini de; MATOS, Aline da Rocha; Siqueira, Marilda Agudo Mendonça Teixeira de. Conhecendo o Sars-CoV-2 e a Covid-19. In: BUSS, Paulo M.; FONSECA, Luiz Eduardo (org.). *Diplomacia da saúde e Covid-19: reflexões a meio caminho*. Rio de Janeiro: Observatório Covid-19 Fiocruz; Editora Fiocruz, 2020. p. 69-82. ISBN 978-65-5708-029-0. (Série Informação para Ação na Covid-19). <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/44905>

ORESHKOVA, N., MOLENAAR, R. J., VREMAN, S., HARDERS, F., OUDE MUNNINK, B. B., HAKZE-VAN DER HONING, R. W., ... STEGEMAN, A. (2020). SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 25(23), 2001005. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005>

PADILLA-BLANCO, M., AGUILO-GISBERT, J., RUBIO, V., LIZANA, V., CHILLIDA-MARTINEZ, E., CARDELLS, J., ... RUBIO-GUERRI, C. (2022). The Finding of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV-2) en una nutria de río euroasiática salvaje (*Lutra lutra*) destaca la necesidad de vigilancia viral en mustélidos salvajes. *Frente. Veterinario. ciencia*, 9, 826991. doi: 10.3389/fvets.2022.826991.

- PALMER, J. P., GAZÊTA, G., ANDRÉ, M., COELHO, A., CORRÊA, L., DAMASCENO, J., ISRAEL, C., PEREIRA, R., & BARBOSA, A. (2022). Piroplasm Infection in Domestic Cats in the Mountainous Region of Rio de Janeiro, Brazil. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(8), 900. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080900>
- PALMER, J. P., GAZÊTA, G., ANDRÉ, M., COELHO, A., CORRÊA, L., DAMASCENO, J., ISRAEL, C., PEREIRA, R., & BARBOSA, A. (2022). Piroplasm Infection in Domestic Cats in the Mountainous Region of Rio de Janeiro, Brazil. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(8), 900. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080900>
- PALMER, M. V., MARTINS, M., FALKENBERG, S., BUCKLEY, A., CASERTA, L. C., MITCHELL, P. K., ... DIEL, D. G. (2021). Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to SARS-CoV-2. *J Virol*, 95, e00083-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.00083-21>
- PANAIT, L., MIHALCA, A. D., IONICĂ, A. M., *et al.* (2021). Cytauxzoon europaeus sp. nov.: A Morphologically and Genetically Distinct Species of Piroplasm Infecting European Wildcats (*Felis silvestris silvestris*) in the Carpathian Mountains. *Pathogens*, 10(4), 475. doi: 10.3390/pathogens10040475.
- PANTI-MAY, J. A., RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I. (2020). Canine babesiosis: A literature review of prevalence, distribution, and diagnosis in Latin America and the Caribbean. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports*, 21, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100417>.
- PANZERA, Y., MIRAZO, S., BAZ, M., TECHERA, C., GRECCO, S., CANCELA, F., ... BENECH, A. (2022). Detection and genome characterisation of SARS-CoV-2 P.6 lineage in dogs and cats living with Uruguayan COVID-19 patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 117(e220177). <https://doi.org/10.1590/0074-02760220177>.
- PATTERSON, E.I., ELIA, G., GRASSI, A. *et al.* (2020). Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy. *Nat Commun* 11, 6231. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20097-0>
- PEDRASSANI, D., BIOLCHI, J., GONÇALVES, L. R., MENDES, N. S., ZANATTO, D. C. S., CALCHI, A. C., MACHADO, R. Z., & ANDRÉ, M. R. (2019). Molecular detection of vector-borne agents in cats in Southern Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 28(4), 632–643. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019077>
- PEIRIS, J. S. M., YUEN, K. Y., OSTERHAUS, A. D. M., & STÖHR, K. (2003). The Severe Acute Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 349(25), 2431–2441. <https://doi.org/10.1056/nejmra032498>
- PEIXOTO, P. V., SOARES, C. O., SCOFIELD, A., SANTIAGO, C. D., FRANÇA, T. N., BARROS, S. S., (2007). Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. *Vet. Parasitol.*, 145, 383–387. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.023>

- PENNISI, M. G., HOFMANN-LEHMANN, R., RADFORD, A. D., *et al.* (2017). *Anaplasma*, Ehrlichia and Rickettsia species infections in cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. *J Feline Med Surg*, 19(5), 542-548. doi: 10.1177/1098612X17706462
- PENNISI, M. G., LA CAMERA, E., GIACOBBE, L., ORLANDELLA, B. M., LENTINI, V., ZUMMO, S., & FERA, M. T. (2010). Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in clinical samples of pet cats from Southern Italy. *Research in veterinary science*, 88(3), 379–384. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.11.005>
- PENNISI, M. G., PERSICHETTI, M. F. (2018). Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? *Vet Parasitol*, 251, 131-137. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.01.012
- PENZHORN, B. L., & OOSTHUIZEN, M. C. (2020). Babesia species of domestic cats: molecular characterization has opened Pandora's box. *Trends in Parasitology*, 36(12), 978-988.
- PEREIRA, A., MAIA, C. (2021). Leishmania infection in cats and feline leishmaniosis: An updated review with a proposal of a diagnosis algorithm and prevention guidelines. *Curr Res Parasitol Vector Borne Dis*, 1:100035. doi: 10.1016/j.crpvbd.2021.100035
- PEREIRA, A., PARREIRA, R., CRISTÓVÃO, J.M., *et al.* (2020). Phylogenetic Insights on Leishmania Detected in Cats as Revealed by Nucleotide Sequence Analysis of Multiple Genetic Markers. *Infect. Genet. Evol.*, 77, 104069. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104069
- PEREYRA, M. O., BLOTTO, B. L., BALDO, D., *et al.* (2021). Evolution in the Genus *Rhinella*: A Total Evidence Phylogenetic Analysis of Neotropical True Toads (Anura: Bufonidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 447(1), 1-156. <https://doi.org/10.1206/0003-0090.447.1.1>
- PETRY, L. dos S., SANTOS, A. P. dos, DORNELLES, G. L., *et al.* (2020). Hemotropic mycoplasma in domestic cats from the central region of Rio Grande do Sul State, Brazil. *Ciência Animal*, 30(1), 1–10. <https://revistas.uece.br/index.php/cienciaanimal/article/view/9647>
- PINTO, A.B.T., PALUDO, G.R., GAZÊTA, G.S., JARDIM, M.P.B., SCALON, M.C., SILVA, A.B., ALBERNAZ, A.P. (2018). *Anaplasmataceae* em gatos (*Felis catus*) no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(6), 1137-1150. <https://www.scielo.br/j/pvb/a/FS8PSm4gJdhX5kfdszFxtHH/?format=pdf&lang=pt>
- PLANTE, J. A., LIU, Y., LIU, J., XIA, H., JOHNSON, B. A., LOKUGAMAGE, K. G., ZHANG, X., MURUATO, A. E., ZOU, J., FONTES-GARFIAS, C. R., MIRCHANDANI, D., *et al.* (2021). Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature*, 592(7852), 116–121. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2895-3>
- POLACK, F.P., THOMAS, S.J., KITCHIN, N., *et al.* (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *The New England Journal of Medicine*, 383(27), 2603-2615. doi:10.1056/NEJMoa2034577

POUDEL, U., SUBEDI, D., PANTHA, S., DHAKAL, S. (2020). Animal coronaviruses and coronavirus disease 2019: Lesson for One Health approach. *Open Veterinary Journal*, 10(3), 239-251. doi:10.4314/ovj.v10i3.1

PREFEITURA DE BELO HORIZONTE (PBH) (2022). Jardim Zoológico da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZB-BH). Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/fundacao-de-parques-e-zoobotanica/jardim-zoologico>

PREFEITURA DE BELO HORIZONTE (PBH) (2023). Parque Municipal Américo Renné Giannetti. Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/fundacao-de-parques-e-zoobotanica/informacoes/parques/parque-municipal-americo-renne-giannetti>

PRIOLO, V., MARTÍNEZ-ORELLANA, P., PENNISI, M.G., *et al.* (2019). *Leishmania infantum*-specific IFN- γ production in stimulated blood from cats living in areas where canine leishmaniosis is endemic. *Parasites & Vectors*, 12, 133. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3386-y>

PROMED-MAIL (2020). COVID-19 update (51): China (Hong Kong) pet cat. ProMed.

PROMED-MAIL (2020). COVID-19 update (56): China (Hong Kong) animal, dog, final serology positive. ProMed.

QABLAN, M.A., KUBELOVÁ, M., ŠIROKÝ, P., MODRÝ, D., AMR, Z.S. (2012). Stray dogs of northern Jordan as reservoirs of ticks and tick-borne hemopathogens. *Parasitology Research*, 111, 301-307. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2839-4>

RAIMUNDO, J. M., GUIMARÃES, A., AMARO, G. M., SILVA, A. T. D., RODRIGUES, C. J. B. C., SANTOS, H. A., LEMOS, E. R. S., FAVACHO, A. R. M., & BALDANI, C. D. (2022). Prevalence of *Bartonella* species in shelter cats and their ectoparasites in southeastern Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 31(1), e014221. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022006>

RAMASAMY, S., GONTU, A., NEERUKONDA, S., RUGGIERO, D., MORROW, B., GUPTA, S., AMIRTHALINGAM, S., *et al.* (2023). SARS-CoV-2 Prevalence and Variant Surveillance among Cats in Pittsburgh, Pennsylvania, USA. *Viruses*, 15(7), 1493. <https://doi.org/10.3390/v15071493>

RAMOS, R. M. DE C., VILELA, B. B., DE OLIVEIRA, L. A., MULINI, L. I. S. S., ALMEIDA, N. Z., APTEKMANN, K. P., DE OLIVEIRA, L. L., & BARIONI, G. (2024). Occurrence and hematological aspects of dogs with Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Brazilian Journal of Development*, 10(2), 1-19. <https://doi.org/10.34117/bjdv10n2-033>

RAOULT, D., & PAROLA, P. (Eds.) (2007). *Rickettsial Diseases* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.3109/9781420019971>

RASSOULI, M. (2016). High prevalence of hemotropic mycoplasmosis among stray cats in Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(3), 204-207. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)61014-3](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)61014-3)

RAZGŪNAITĖ, MIGLĖ, INDRĖ LIPATOVA, ALGIMANTAS PAULAUSKAS, BIRUTĖ KARVELIENĖ, VITA RIŠKEVIČIENĖ, AND JANA RADZIJEVSKAJA. (2021). "Bartonella Infections in Cats and Cat Fleas in Lithuania" *Pathogens* 10, no. 9: 1209. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091209>

REICHARD, M. V., VAN DEN BUSSCHE, R.A., MEINKOTH, J.H., HOOVER, J.P., KOCAN, A.A. (2005). A new species of Cytauxzoon from Pallas' cats caught in Mongolia and comments on the systematics and taxonomy of piroplasmids. *Journal of Parasitology*, 91, 420–426. <https://doi.org/10.1645/GE-384R>

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. (1999). Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American Cutaneous Leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(4), 530–541.

RENGIFO-HERRERA, C., PILE, E., GARCÍA, A., PÉREZ, A., PÉREZ, D., NGUYEN, F. K., DE LA GUARDIA, V., MCLEOD, R., & CABALLERO, Z. (2017). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pets from metropolitan regions of Panama. Séroprévalence de *Toxoplasma gondii* chez les animaux domestiques des régions métropolitaines du Panama. *Parasite (Paris, France)*, 24, 9. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017009>

RIKIHISA, Y. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: Subversive manipulators of host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 328-339.

RIVERO, R., GARAY, E., BOTERO, Y., SERRANO-COLL, H., GASTELBONDO, B., MUÑOZ, M., BALLESTEROS, N., CASTAÑEDA, S., PATIÑO, LH., RAMIREZ, JD., CALDERON, A., GUZMÁN, C., MARTINEZ-BRAVO, C., ALEMAN, A., ARRIETA, G., MATTAR, S. (2022). Human-to-dog transmission of SARS-CoV-2, Colombia. *Scientific Reports*, 12(1), 7880. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11847-9>

RJEBIBI, M.R., AMAIRIA, S., ROUATBI, M., BEN SALEM, F., MABROUK, M., GHARBI, M. (2016). Molecular prevalence and genetic characterization of piroplasms in dogs from Tunisia. *Parasitology*, 143, 1622–1628. <https://doi.org/10.1017/S003118201600113X>

Rodrigues, K. B. A., Costa, A. R., Galvão, S. R., Santos, H. D., Cavalcante, T. V., Lima, A. K. F., Silva, C. M. G. da, & Dias, F. E. F. (2021). Frequência de Hemoparasitos em Cães e Gatos Domésticos Naturalmente Infectados, Provenientes de Zonas Urbanas no Município de Araguaína, Região da Amazônia Legal- TO, Brasil / Frequency of Hemoparasites in Naturally Infected Dogs and Cats, Coming from Urban Areas in the Municipality of Araguaína, Region of the Legal Amazon - TO, Brazil. *Brazilian Journal of Development*, 7(5), 53147–53159. <https://doi.org/10.34117/bjdv.v7i5.30469>

ROSA, CT., PAZZI, P., NAGEL, S., MCCLURE, V., CHRISTIE, J., TROSKIE, M., DVIR, E. (2014). Theileriosis in six dogs in South Africa and its potential clinical significance. *Journal of the South African Veterinary Association*, 85(1), 1114. <https://doi.org/10.4102/jsava.v85i1.1114>

SACRISTÁN, I., SIEG, M., ACUÑA, F., AGUILAR, E., GARCÍA, S., LÓPEZ, M.J., CEVIDANES, A., HIDALGO-HERMOSO, E., CABELLO, J., VAHLENKAMP, T.W., MILLÁN, J., POULIN, E., NAPOLITANO, C. (2019). Molecular and serological survey of carnivore pathogens in free-roaming domestic cats of rural communities in southern Chile. *Journal of Veterinary Medical Science*, 81, 1740–1748. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0208>

SAIED, A.A., METWALLY, A.A. (2022). SARS-CoV-2 variants of concerns in animals: An unmonitored rising health threat. *VirusDis*. 33, 466–476. <https://doi.org/10.1007/s13337-022-00794-8>

SALIM, B., ALANAZI, A.D., OMORI, R., ALYOUSIF, M.S., ALANAZI, I.O., KATAKURA, K., NAKAO, R. (2019). Potential role of dogs as sentinels and reservoirs for piroplasms infecting equine and cattle in Riyadh City, Saudi Arabia. *Acta Tropica*, 193, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.029>

SALIM, M.A., AKHTAR, R., LATEEF, M., RASHID, M.I., AKBAR, H., SHEHZAD, W., AKHTAR, F., ISLAM, S., FAROOQI, S.H., DURRANI, U.F. (2018). First report on optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of *Babesia felis*. *Indian Journal of Animal Research*, 52, 401–404. <https://doi.org/10.18805/ijar.B-567>

SÁNCHEZ-MORALES, L., SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M., PÉREZ-SANCHO, M., DOMÍNGUEZ, L., & BARROSO-ARÉVALO, S. (2022). The Omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2 variant of concern also affects companion animals. *Frontiers in veterinary science*, 9, 940710. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.940710>

SÁNCHEZ-SALDAÑA, L.; SÁENZ-ANDUAGA, E.; PANCORBO-MENDONZA, J.; ZEGARRA-EL-CARPIO, R.; GARCÉS-VELASCO, N.; REGIS-ROGGERO, A. (2004). Leishmaniasis. *Dermatología Peruana*, 14(2), 82-98. https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v14_n2/pdf/a02.pdf

SANTOS HA, PIRES MS, VILELA JA, SANTOS TM, FACCINI JL, BALDANI CD, THOMÉ SM, SANAVRIA A, MASSARD CL. (2011). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(4), 770-774. <https://doi.org/10.1177/1040638711406974>

SANTOS, A.P.; CONRADO, F.O.; MESSICK, J.B.; BIONDO, A.W.; OLIVEIRA, S.T.; NASCIMENTO, N.C.; PEDRALLI, V.; LASTA, C.S.; GONZÁLEZ, F.H. (2014). Hemoplasma prevalence and hematological abnormalities associated with infection in three different cat populations from Southern Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 23(4), 428-434. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014079>

SANTOS, C. M., BARRA, E. C. M., ALMEIDA, J. C. F., JESUS, I. S., CRUZ, A. V., COSTA, J. C., ... & CASSEB, A. R. (2021). Occurrence of hemotropic mycoplasmas in domestic cats (*Felis catus*) from Belém, Brazil. *IJSR.*, 11, 44949-44952.

SANTOS, L. S., DRUMMOND, M. R., MAGALHÃES, R. F., SILVA, M. N., FERREIRA, P. A. R., & VELHO, P. E. N. F. (2021). Prevalence of infection by *Bartonella* spp. in patients with psoriasis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 96(1), 107-110. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2020.07.004>

SANTOS, L. S., DRUMMOND, M. R., IORI, N. L., GOULART, I. M. B., DA COSTA FRANÇA, A. F. E., DE SOUZA, E. M., & FERREIRA VELHO, P. E. N. (2023). *Bartonella henselae* como um possível gatilho para reações hansênicas crônicas tipo 2. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*;27(S1):102812 <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2023.103516>

SCHÄFER, I., KOHN, B., & MÜLLER, E. (2021). *Anaplasma phagocytophilum* in domestic cats from Germany, Austria, and Switzerland and clinical/laboratory findings in 18 PCR-positive cats (2008–2020). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 1-8. <https://doi.org/10.1177/1098612X211017459>

SCHALM, O.W. (Ed.) (1986). Schalm's Veterinary Hematology. Philadelphia, Lea & Febiger.

SCHLÜTER, D., DÄUBENER, W., SCHARES, G., GROß, U., PLEYER, U., & LÜDER, C. (2014). Animals are key to human toxoplasmosis. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 304(7), 917–929. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.09.002>

SCHNITTGER, L., GANZINELLI, S., BHOORA, R. *et al.* The Piroplasmida Babesia, Cytauxzoon, and Theileria in farm and companion animals: species compilation, molecular phylogeny, and evolutionary insights. *Parasitology Research*, 121, 1207–1245 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07424-8>

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS (SES-MG) (2023): <http://www.saude.mg.gov.br/coronavirus>

Sepúlveda-García, P., Alabi, A., Álvarez, K., Rojas, L., Mella, A., Gonçalves, L. R., André, M. R., Machado, R. Z., Müller, A., & Monti, G. (2023). *Bartonella* spp. in households with cats: Risk factors for infection in cats and human exposure. *One health (Amsterdam, Netherlands)*, 16, 100545. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100545>

Sepúlveda-García, P., Pérez-Macchi, S., Gonçalves, L. R., do Amaral, R. B., Bittencourt, P., André, M. R., & Muller, A. (2022). Molecular survey and genetic diversity of *Bartonella* spp. in domestic cats from Paraguay. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 97, 105181. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105181>

SERGEANT, E., SERGEANT, E.T., LOMBARD, J., & QUILICHINI, M. (1912). La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 5, 93-98.

SHAPIRO, K., BAHIA-OLIVEIRA, L., DIXON, B., DUMÈTRE, A., DE WIT, L.A., VANWORMER, E., VILLENA, I. (2019). Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. Food and Waterborne Parasitology, 15, e00049. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00049>

SHARUN, K., DHAMA, K., PAWDE, A.M., GORTÁZAR, C., TIWARI, R., BONILLA-ALDANA, D.K., RODRIGUEZ-MORALES, A.J., DE LA FUENTE, J., MICHALAK, I., ATTIA, Y.A. (2021). SARS-CoV-2 in animals: potential for unknown reservoir hosts and public health implications. Veterinary Quarterly, 41(1), 181-201. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1921311>

SHI, J., WEN, Z., ZHONG, G., YANG, H., WANG, C., HUANG, B., LIU, R., HE, X., SHUAI, L., SUN, Z., ZHAO, Y., LIU, P., LIANG, L., CUI, P., WANG, J., ZHANG, X., GUAN, Y., TAN, W., WU, G., CHEN, H., BU, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. Science, 368(6494), 1016-1020. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>

SHIGUERU, F.J., GARCIA, J.L., VIDOTTO, M.C., BALARIN, M.R., FABRETTI, A.K., GASPARINI, M.R., COELHO, A.L., VIDOTTO, O. (2008). Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da Região de Londrina, PR [Occurrence and molecular characterization of *Babesia* species in a canine hospital population in the Londrina Region, Parana State, Brazil]. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 17(Suppl 1), 277-283.

SIKORSKI, L.E., BIRKENHEUER, A.J., HOLOWAYCHUK, M.K., MCCLEARY-WHEELER, A.L., DAVIS, J.M. (2010). Babesiosis Caused by a Large *Babesia* Species in 7 Immunocompromised Dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine, 24, 127-131.

SILI, G., BYARUHANGA, C., HORAK, I., STEYN, H., CHAISI, M., OOSTHUIZEN, M.C., NEVES, L. (2021). Ticks and tick-borne pathogens infecting livestock and dogs in Tchicala-Tcholoanga, Huambo Province, Angola. Parasitology Research, 120, 1097-1102. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-07009-3>

SILVA BRF, LABRUNA MB, MARCILI A, SANTOS CR, BASTOS BBB, BORDIN JT, MORAES-FILHO J. (2019). *Rangelia vitalii* infection in a dog from São Paulo city, Brazil: case report. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 56(3), e150791. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2019.150791>

SILVA, A.V., SILVA, R.C., ZAMPROGNA, T.O., LUCAS, T.M. (2010). *Toxoplasma gondii* em Suínos com ênfase na contribuição brasileira. Scientia Medica, 20(1), 120-130.

SILVA, M. H. S., SILVA, J. A., MAGALHÃES, D. F., SILVA, M. X., MENESES, J. N. C., & MOREIRA, E. C. (2010). Caracterização demográfica e epidemiológica de cães e gatos domiciliados em Barbacena, MG. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62(4). <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000400035>

SILVA-SANTOS, M., LIMA, V.F., PIEDADE, G., MEIRA-SANTOS, P., & ROCHA, L. (2014). PREVALÊNCIA DE Babesia spp. EM GATOS ERRANTES DA REGIÃO METROPOLITANA DE ARACAJU/ SERGIPE. *Enciclopédia Biosfera*, 10(19). <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/2389>

SILVEIRA, A. P. S. DA, VIEIRA, V. B. D., BATALINI, L. S., CARMO, S. B. DO, FRIOZI, E., ARRUDA, E. J. DE, LIMA JUNIOR, M. S. DA C., & NEITZKE-ABREU, H. C. (2018). PCR sensitivity of peripheral blood of dogs co-infected with *Leishmania* spp. and *Ehrlichia* spp. in endemic area of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51(6), 843–847. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0040-2018>

SILVEIRA, J. A. G., REIS, I. A., ESTEVAM, L. G. T. M., PINTO, M. C. C., ZWEYGARTH, E., PASSOS, L. M. F., & PAZ, G. F. (2017). Important frequency of *Anaplasma phagocytophilum* infection in a population of domiciled dogs in an urbanized

SILVEIRA, J. A., VALENTE, P. C., PAES, P. R., VASCONCELOS, A. V., SILVESTRE, B. T., & RIBEIRO, M. F. (2015). The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. *Ticks and tick-borne diseases*, 6(3), 242–245. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.01.003>

SILVEIRA, J.A., RABELO, E.M., RIBEIRO, M.F. (2012). Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(4), 353-360. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01278.x>

SILVEIRA, J.A.G., REIS, I.A., ESTEVAM, L.G.T.M., PINTO, M.C.C., ZWEYGARTH, E., PASSOS, L.M.F., PAZ, G.F. (2017). Important frequency of *Anaplasma phagocytophilum* infection in a population of domiciled dogs in an urbanized area in south-eastern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(09). <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000900010>

SINNOTT ESTEVE, V. (2007). Erliquiose e infecções relacionadas em cães. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Curso de Especialização em Análises Clínicas Veterinárias. Trabalhos de Conclusão de Curso de Especialização. <http://hdl.handle.net/10183/13111>

SIT, T.H.C., BRACKMAN, C.J., IP, S.M., TAM, K.W.S., LAW, P.Y.T., TO, E.M.W., YU, V.Y.T., SIMS, L.D., TSANG, D.N.C., CHU, D.K.W., PERERA, R.A.P.M., POON, L.L.M., & PEIRIS, M. (2020). Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature*, 586(7831), 776-778. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2334-5>

SMITH, N.C., GOULART, C., HAYWARD, J.A., KUPZ, A., MILLER, C.M., VAN DOOREN, G.G. (2021). Control of human toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 51(2-3), 95-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.11.001>

SOARES, J.F., DALL'AGNOL, B., COSTA, F.B., KRAWCZAK, F.S., COMERLATO, A.T., ROSSATO, B.C., LINCK, C.M., SIGAHI, E.K., TEIXEIRA, R.H., SONNE, L., HAGIWARA, M.K., GREGORI, F., VIEIRA, M.I., MARTINS, J.R., RECK, J., & LABRUNA, M.B. (2014). Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 202(3-4), 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.058>

SOARES, J.F., GIROTTO, A., BRANDÃO, P.E., DA SILVA, A.S., FRANÇA, R.T., LOPES, S.T., LABRUNA, M.B. (2011). Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 180(3-4), 203-208. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.024>

SOBRINO, R., FERROGLIO, E., OLEAGA, A., ROMANO, A., MILLAN, J., REVILLA, M., ARNAL, M.C., TRISCIUOGGIO, A., GORTÁZAR, C. (2008). Characterization of Widespread Canine Leishmaniasis among Wild Carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology*, 155, 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.003>

SOLANO-GALLEGO, L., KOUTINAS, A., MIRÓ, G., CARDOSO, L., PENNISI, M.G., FERRER, L., BOURDEAU, P., OLIVA, G., BANETH, G. (2009). Directions for the Diagnosis, Clinical Staging, Treatment and Prevention of Canine Leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>

SPADA, E., PROVERBIO, D., GALLUZZO, P., PEREGO, R., BAGNAGATTI DE GIORGI, G., ROGGERO, N., CARACAPPA, S. (2014). Frequency of piroplasms *Babesia microti* and *Cytauxzoon felis* in stray cats from northern Italy. *Biomed Res Int.*, 2014, 943754. <https://doi.org/10.1155/2014/943754>

STAGGEMEIER, R., PILGER, D.A., SPILKI, F.R., CANTARELLI, V.V. (2014). Multiplex SYBR® green real-time PCR (qPCR) assay for the detection and differentiation of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 56, 93–5. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000200001>

STAGGEMEIER, R., VENKER, C. A., KLEIN, D. H., PETRY, M., SPILKI, F. R., & CANTARELLI, V. V. (2010). Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: a molecular study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(7), 873–878. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762010000700006>

STOFFELLA-DUTRA, A.G., DE CAMPOS, B.H., BASTOS E SILVA, P.H., DIAS, K.L., DA SILVA DOMINGOS, I.J., HEMETRIO, N.S., XAVIER, J., IANI, F., FONSECA, V., GIOVANETTI, M., DE OLIVEIRA, L.C., TEIXEIRA, M.M., LOBATO, Z.I.P., FERREIRA, H.L., ARNS, C.W., DURIGON, E., DRUMOND, B.P., ALCANTARA, L.C.J., & DE CARVALHO, M.P.N., *et al.* (2023). SARS-CoV-2 Spillback to Wild Coatis in Sylvatic-Urban

Hotspot, Brazil. Emerging Infectious Diseases, 29(3), 664-667.
<https://doi.org/10.3201/eid2903.221339>

SZWARCWALD, C.L., Boccolini, C.S., da Silva de Almeida, W., *et al.* (2022). Mortalidad por COVID-19 en Brasil, 2020-21: consecuencias de la gestión inadecuada de la pandemia. Arco Salud Pública, 80, 255. <https://doi.org/10.1186/s13690-022-01012-z>

TAN, C.C.S., LAM, S.D., RICHARD, D., *et al.* (2022). Transmission of SARS-CoV-2 from humans to animals and potential host adaptation. Nature Communications, 13, 2988. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30698-6>

TASKER, S. (2010). Haemotropic mycoplasmas: What's their real significance in cats? J Feline Med Surg., 12(5), 369-381. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2880789/>

THEILER, A. (1910). *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov). The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. In Theiler, A. (Ed.), Report of the Government on Veterinary Bacteriology in Transvaal. Department of Agriculture, South Africa, 1908–1909, p. 7–64.

TIRADO, T.C., BAVIA, L., AMBROSIO, A.R., CAMPOS, M.P., DE ALMEIDA SANTIAGO, M., MESSIAS-REASON, I.J., & FIGUEIREDO, F.B. (2021). A comparative approach on the activation of the three complement system pathways in different hosts of Visceral Leishmaniasis after stimulation with *Leishmania infantum*. Dev Comp Immunol., 120, 104061. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104061>

TIWARI, R., DHAMA, K., SHARUN, K., IQBAL YATOO, M., MALIK, Y.S., SINGH, R., MICHALAK, I., SAH, R., BONILLA-ALDANA, D.K., RODRIGUEZ-MORALES, A.J. (2020). COVID-19: animals, veterinary and zoonotic links. Vet Q., 40(1), 169-182. <https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1766725>

TRAPP, S.M., MESSICK, J.B., VIDOTTO, O., JOJIMA, F.S., & DE MORAIS, H.S.A. (2006). *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. Vet Parasitol., 141, 177–180. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.036>

TRINCHEIRAS, J., MARTINS, ., SANTOS-SILVAS, M., ALVES, M., & SANTOS, A. (2020). *Anaplasma phagocytophilum*: Repercussão da infecção da fauna silvestre em cães e gatos de uma zona endêmica. Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária, 10, 40–48. <http://hdl.handle.net/10437/10164>

TRONCOSO TORO, I. E., URIBE HENRÍQUEZ, P. A., ARRÚÉ BRENET, K. C., VALENZUELA CONTRERAS, A. A., & FISCHER WIETHUCHTER, C. (2015). Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en gatos (*Felis catus*, Linnaeus 1758) residentes en San Carlos, Chile. *Revista de Medicina Veterinaria*, (29), 23-31.

ULLMANN, L. S., DA SILVA, R. C., DE MORAES, W., CUBAS, Z. S., DOS SANTOS, L. C., HOFFMANN, J. L., MOREIRA, N., GUIMARAES, A. M., MONTAÑO, P., LANGONI, H., & BIONDO, A. W. (2010). Serological survey of *Toxoplasma gondii* in captive Neotropical felids from Southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 172(1-2), 144-146. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.013>

VARELA, A. S. (2003). Tick-borne Ehrlichiae and Rickettsiae of dogs. In: BOWMAN, D.D. *Companion and exotic animal parasitology*. Disponível em: <https://www.ivis.org/library/companion-and-exotic-animal-parasitology/tick-borne-ehrlichiae-and-rickettsiae-of-dogs> Acesso em: 6 junho 2023.

VASCONCELOS, M. F. (2010). Estudo Da Infecção Por Babesia Spp. Em Cães Da Região Periurbana De Brasília, Distrito Federal. Dissertação.

VERITY, R., OKELL, L. C., DORIGATTI, I., WINSKILL, P., WHITTAKER, C., IMAI, N., CUOMO-DANNENBURG, G., THOMPSON, H., WALKER, P. G. T., FU, H., DIGHE, A., GRIFFIN, J. T., BAGUELIN, M., BHATIA, S., BOONYASIRI, A., CORI, A., CUCUNUBÁ, Z., FITZJOHN, R., GAYTHORPE, K., ... FERGUSON, N. M. (2020). Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: A model-based analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(6), 669-677. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30243-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30243-7)

VILAS BOAS DE MELO C, PETERS F, VAN DIJKEN H, LENZ S, VAN DE VEN K, WIJSMAN L, GOMERSBACH A, SCHOUTEN T, VAN KASTEREN PB, VAN DEN BRAND J, DE JONGE J. 2022. Influenza Infection in Ferrets with SARS-CoV-2 Infection History. *Microbiol Spectr* 10:e01386-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01386-22>

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. (2022). Serological evidence of SARS-CoV-2 and co-infections in stray cats in Spain. *Transboundary and emerging diseases*, 69(3), 1056–1064. <https://doi.org/10.1111/tbed.14062>

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. (2022). Serological evidence of SARS-CoV-2 and co-infections in stray cats in Spain. *Transboundary and emerging diseases*, 69(3), 1056–1064. <https://doi.org/10.1111/tbed.14062>

VILLANUEVA-SAZ, S., MARTÍNEZ, M., GINER, J., GONZÁLEZ, A., TOBAJAS, A. P., PÉREZ, M. D., LIRA-NAVARRETE, E., GONZÁLEZ-RAMÍREZ, A. M., MACÍAS-LEÓN, J., VERDE, M., YZUEL, A., HURTADO-GUERRERO, R., ARIAS, M., SANTIAGO, L., AGUILÓ-GISBERT, J., RUÍZ, H., LACASTA, D., MARTELES, D., & FERNÁNDEZ, A. (2023). A cross-sectional serosurvey of SARS-CoV-2 and co-infections in stray cats from the second wave to the

sixth wave of COVID-19 outbreaks in Spain. *Veterinary research communications*, 47(2), 615–629. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-10016-7>

VILLELA, D. A. M., NORONHA, T. G. DE, BASTOS, L. S., PACHECO, A. G., CRUZ, O. G., CARVALHO, L. M., CODEÇO, C. T., GOMES, M. F. DA, C., COELHO, F. C., FREITAS, L. P., LANA, R. M., *et al.* (2021). Effectiveness of Mass Vaccination in Brazil against Severe COVID-19 Cases. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.09.10.21263084>

WAGNER, J. E. (1976). A fatal cytauxzoonosis-like disease in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 168(7), 585-588.

WALLS, A. C., PARK, Y. J., TORTORICI, M. A., WALL, A., MCGUIRE, A. T., & VEESLER, D. (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>

WANG, J.L., LI, T.T., LIU, G.H., ZHU, X.Q., & YAO, C. (2017). Two Tales of Cytauxzoon felis Infections in Domestic Cats. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(4), 861-885. <https://doi.org/10.1128/CMR.00010-17>

WANG, L., MITCHELL, P.K., CALLE, P.P., BARTLETT, S.L., MCALOOSE, D., KILLIAN, M.L., YUAN, F., FANG, Y., GOODMAN, L.B., FREDRICKSON, R., ELVINGER, F., TERIO, K., FRANZEN, K., STUBER, T., DIEL, D.G., & TORCHETTI, M.K. (2020). Complete genome sequence of SARSCoV-2 in a tiger from a U.S. zoological collection. *Microbiology Resource Announcements*, 9:e00468-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00468-20>

WEISS, S.R., & LEIBOWITZ, J.L. (2011). Coronavirus pathogenesis. *Advances in Virus Research*, 81, 85-164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2>.

WEISS, S.R., NAVAS-MARTIN, S. (2005). Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 69(4), 635-664. doi: 10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005.

WENGI, N., WILLI, B., BORETTI, F.S., CATTORI, V., RIOND, B., MELI, M.L., REUSCH, C.E., LUTZ, H., & HOFMANN-LEHMANN, R. (2008). Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. *Vet Microbiol.*, 126(1-3), 132-141. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.06.018.

WESTFALL, D. S., JENSEN, W. A., REAGAN, W. J., RADECKI, S. V., & LAPPIN, M. R. (2001). Inoculation of two genotypes of Hemobartonella felis (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. *American Journal of Veterinary Research*, 62(5), 687–691. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.687>

WILLI, B., BORETTI, F.S., CATTORI, V., TASKER, S., MELI, M.L., REUSCH, C., LUTZ, H., & HOFMANN-LEHMANN, R. (2005). Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in

Switzerland. *J Clin Microbiol.*, 43(6), 2581-2585. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.6.2581-2585.2005>.

WILLI, B., NOVACCO, M., MELI, M., WOLF-JÄCKEL, G., BORETTI, F., WENGI, N., LUTZ, H., & HOFMANN-LEHMANN, R. (2010). Haemotropic mycoplasmas of cats and dogs: transmission, diagnosis, prevalence and importance in Europe. *Schweiz Arch Tierheilkd.*, 152(5), 237-244. doi: 10.1024/0036-7281/a000055.

WILLIAMSON, E.J., WALKER, A.J., BHASKARAN, K., BACON, S., BATES, C., MORTON, C.E., CURTIS, H.J., MEHRKAR, A., EVANS, D., INGLESBY, P., COCKBURN, J., MCDONALD, H.I., MACKENNA, B., TOMLINSON, L., DOUGLAS, I.J., RENTSCH, C.T., MATHUR, R., WONG, A.Y.S., GRIEVE, R., HARRISON, D., FORBES, H., SCHULTZE, A., CROKER, R., PARRY, J., HESTER, F., HARPER, S., PERERA, R., EVANS, S.J.W., SMEETH, L., & GOLDACRE, B. (2020). Factors Associated with COVID-19-Related Death Using OpenSAFELY. *Nature*, 584(7821), 430-436. doi: 10.1038/s41586-020-2521-4.

WOAH - World Organisation for Animal Health (2021). *Theileria spp. - THEILERIOSIS IN WILDLIFE*. <https://www.woah.org/app/uploads/2021/05/theileria-spp-new-or-unusual-occurrencesinfection-with.pdf>

WOO, P.C., LAU, S.K., HUANG, Y., & YUEN, K.Y. (2009). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med* (Maywood), 234(7), 1117-1127. doi: 10.3181/0903-MR-94.

WOO, P.C., LAU, S.K., LAM, C.S., LAU, C.C., TSANG, A.K., & LAU, J.H. (2014). 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. *Journal of Virology*, 88(13), 7099–7109. <https://doi.org/10.1128/jvi.02343-13>.

WOO, P.T.K. (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomosis. *Acta Trop*, 27, 384–386.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (OMS), WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE), & FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). (2020). Taking a Multisectoral, One Health Approach: A Tripartite Guide to Addressing Zoonotic Diseases in Countries. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/EN_TripartiteZoonosesGuide_webversion.pdf.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2010). Control of the Leishmaniasis: Report of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. WHO Technical Report Series. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2020). WHO Director-General's Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19 - 11 March 2020. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2021). Operational Considerations to Expedite Genomic Sequencing Component of GISRS Surveillance of SARS-CoV-2. WHO/2019-nCoV/genomic_sequencing/GISRS/2021.1. Sample Selection. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1332762/retrieve>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2021). Tracking SARS-CoV-2 Variants. Disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2023). Weekly Epidemiological Update on COVID-19 - 17 August 2023. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---17-august-2023>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). CORONAVIRUS DISEASE (COVID-19). (2023) Weekly Epidemiological Update on COVID-19 - 13 April 2023, Edition 138 | Emergency Situational Updates. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---13-april-2023>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Coronavirus Disease (COVID-19) WHO-Convened Global Study of Origins of SARS-CoV-2: China Part Joint WHO-China Study: 14 January - 10 February 2021 30 March 2021 | COVID-19: Animal-Human Interface and Food Safety, Final Joint Report, 120 pages. Acesso 27 Abril 2023. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). (2022). SARS-COV-2 in animals – Situation report 12 30/04/2022. <https://www.woah.org/app/uploads/2022/05/sars-cov-2-situation-report-12.pdf>

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). (2023). Events in Animal. COVID-19 - WOAH - World Organisation for Animal Health. Acesso Maio 15, 2023. Disponível em: <https://www.woah.org/en/what-we-offer/emergency-and-resilience/covid-19/#ui-id-3>

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH) (FOUNDED AS OIE). (2022). Considerations on monitoring SARS-CoV-2 in animals. July 2022. [Acesso 2023 Maio 23]. Disponível em: <https://www.woah.org/app/uploads/2022/08/en-sars-cov-2-surveillance.pdf>

WU S, MENG J, YU F, ZHOU C, YANG B, CHEN X, YANG G, SUN Y, CAO W, JIANG J, WU J, ZHAN L. (2023). Molecular epidemiological investigation of piroplasms carried by pet cats and dogs in an animal hospital in Guiyang, China. *Front Microbiol.* Oct 12;14:1266583. doi: 10.3389/fmicb.2023.1266583. PMID: 37901826; PMCID: PMC10602747.

WU, F., ZHAO, S., YU, B., CHEN, Y. M., WANG, W., SONG, Z. G., ... ZHANG, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265-269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>

WU, Z., & MCGOOGAN, J. M. (2020). Characteristics of and important lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: Summary of a report of 72,314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*, 323(13), 1239-1242. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>

XI, Y., LI, X., LIU, L., XIU, F., YI, X., CHEN, H., & YOU, X. (2024). Sneaky tactics: Ingenious immune evasion mechanisms of Bartonella. *Virulence*, 15(1), 2322961. <https://doi.org/10.1080/21505594.2024.2322961>

XIAO, K., ZHAI, J., FENG, Y., ZHOU, N., ZHANG, X., ZOU, J. J., ... & ZHANG, X. (2020). Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature*, 583(7815), 286-289. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2313-x>

XU, D., ZHANG, J., SHI, Z., SONG, C., ZHENG, X., ZHANG, Y., ... & WANG, C. (2015). Molecular detection of vector-borne agents in dogs from ten provinces of China. *Parasites and Vectors*, 8, 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1120-y>

YABSLEY, M., & SHOCK, B. (2012). Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology*, Oxford, 2, 18-31.

YANG, S., & ROTHMAN, R. E. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet. Infectious diseases*, 4(6), 337-348. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01044-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01044-8)

ZANET, S., TRISCIUOGLIO, A., BOTTERO, E., DE MERA, I.G., GORTAZAR, C., CARPIGNANO, M.G., FERROGLIO, E. (2014). Piroplasmosis in wildlife: Babesia and Theileria affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps. *Parasites & Vectors*, 7, 70. doi: 10.1186/1756-3305-7-70.

ZARRA-NEZHAD, F., BORUJENI, M. P., MOSALLANEJAD, B., & HAMIDINEJAT, H. (2017). A seroepidemiological survey of *Toxoplasma gondii* infection in referred dogs to Veterinary Hospital of Ahvaz, Iran. *International journal of veterinary science and medicine*, 5(2), 148-151. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.08.006>

ZHANG, H., CHANG, Z., MEHMOOD, K., WANG, Y., REHMAN, MU., NABI, F., SABIR, AJ., LIU, X., WU, X., TIAN, X., ZHOU, D. (2017). First report of Ehrlichia infection in goats, China. *Microbial Pathogenesis*, 110, 275-278. doi: 10.1016/j.micpath.2017.07.012.

ZHANG, H., PENNINGER, J.M., LI, Y., ZHONG, N., SLUTSKY, A.S. (2020). Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Medicine*, 46(4), 586-590. doi: 10.1007/s00134-020-05985-9.

ZHANG, Q., ZHANG, H., GAO, J., HUANG, K., YANG, Y., HUI, X., HE, X., LI, C., GONG, W., ZHANG, Y., *et al* (2020). A serological survey of SARS-CoV-2 in cats in Wuhan. *Emerging Microbes & Infections*, 9, 2013–2019. doi: 10.1080/22221751.2020.1817796.

ZHOU, H., CHEN, X., HU, T., LI, J., SONG, H., LIU, Y., WANG, P., LIU, D., YANG, J., HOLMES, E. C., HUGHES, A. C., BI, Y., & SHI, W. (2020). A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Current biology: CB*, 30(11), 2196–2203.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.023>

ZHOU, P., YANG, X.L., WANG, X.G., HU, B., ZHANG, L., ZHANG, W., SHI, Z.L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.

ZHU, N., ZHANG, D., WANG, W., LI, X., YANG, B., SONG, J., ZHAO, X., HUANG, B., SHI, W., LU, R., Niu, P., ZHAN, F., MA, X., WANG, D., XU, W., WU, G., GAO, GF., TAN, W.; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.

ANEXO 1

Anexo 1. Autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais.



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/linhagem	Gatos / Indiferente
Nº de animais	69
Peso/Idade	4kg / 5(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Domicílio dos tutores
*Espécie/linhagem	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 2

Anexo 2. Autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais.

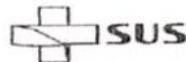
	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
UFMG	CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 185 / 2016, relativo ao projeto intitulado "MANEJO DE GATOS COMUNITÁRIOS NO MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS", que tem como responsável Júlia Angélica Gonçalves da 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 certificates 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 3

Anexo 3. Termo de Autorização Institucional entre Universidade Federal de Minas Gerais e Secretaria Municipal de Saúde/ Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte.



PREFEITURA MUNICIPAL
DE BELO HORIZONTE



TERMO DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL

À *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.

Responsáveis pela pesquisa:

a) Secretaria Municipal de Saúde/Gerência de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte

Maria Helena Franco Moraes (CPF: 627451406 63),
Vanessa de Oliveira Pires Fiúza (CPF: 652880506 78),
Eduardo Viana Vieira Gusmão (CPF: 9892187860 53),
Silvana Tecles Brandão (CPF: 666398246 04)

b) Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

- Depto. Parasitologia/ICB

Profa. Júlia Angélica Gonçalves da Silveira

Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

Msc. Hudson Andrade dos Santos

- 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

- 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: Graduanda em Biologia, IC

- 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)

Glendalesse Nunes Rocha de Faria Teixeira (Residente em Saúde Pública)

- Depto. Clínica e Cirurgia Veterinárias/EV

Prof. Renato de Lima Santos

Amanda Pifano Neto Quintal

Diogo César Enedino Lacerda

c) Universidade Federal de Uberlândia - UFU

- ICBIM

Prof. Sydnei Magno da Silva

GERÊNCIA DE CONTROLE DE ZOONOSSES/GVSI/SMISA/PHI

Av. Afonso Pena, 2.336 4º andar - Funcionários

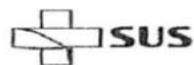
CEP: 30130-007 - BELO HORIZONTE - MG

Fone: (031) 3277.78.01 – Fax: 3277.95.46 - zoonoses@phb.gov.br

Anexo 3. Continuação.



PREFEITURA MUNICIPAL
DE BELO HORIZONTE



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:

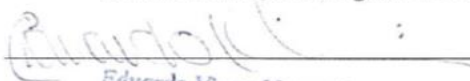
- Caracterizar os gatos comunitários analisados quanto as variáveis: espécie, sexo (macho e fêmea), idade (filhote, jovem e adulto), condição corporal, sinais clínicos específicos, diagnóstico presuntivo e o local de origem e destinação;
- Identificar agentes etiológicos potencialmente patogênicos (parasitos, 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 82753-2

GERÊNCIA DE CONTROLE DE ZOONOSSES/GVSI/SMISA/PBH
Av. Alfredo Penteado, 2.336 F. andar - Funcionários
CEP: 30191-007 - BELO HORIZONTE, MG
Fone: (031) 3271.78.01 - Fax: 3277.95.46 - zoonoses@pbh.gov.br

ANEXO 4

Anexo 4. Termo de Autorização Institucional entre Universidade Federal de Minas Gerais/ Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica (FPMZB) de Belo Horizontes.



Termo de compromisso - Pesquisas Científicas na FPMZB

Protocolo nº

Eu, Júlia Angélica Gonçalves da Silveira, portador da CI MG 10944-999, CPF 046715996-35 orientador / responsável técnico pela execução do projeto “Levantamento do vírus Sars-Cov-2 e coinfeção com parasitos em mamíferos pertencentes à Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: caracterização parasitológica e molecular baseada na perspectiva de Saúde Única” _ a ser realizado por Anisleidy Pérez Castillo e Júlia Angélica Gonçalves da Silveira na Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica (FPMZB), declaro ser responsável pelo desenvolvimento da pesquisa na FPMZB, bem como estar ciente da inexistência de qualquer vínculo empregatício ou benefícios adicionais, senão os previstos no projeto apresentado. Declaro ainda estar ciente do disposto na Portaria PRES- FPMZB nº 06/2020, de 07 de março de 2020 e todas as normas, regulamentos e legislação pertinentes à FPMZB e por cumprir suas determinações.

Comprometo-me a fornecer à Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica:

- Uma cópia digital do produto técnico e das publicações científicas originárias da pesquisa para o e-mail pesquisasfpmzb@pbh.gov.br até 60 dias após o término da mesma;
- Ceder à FPMZB o direito de uso do material fotográfico, imagens de vídeo, softwares e afins, como também produtos ou subprodutos resultantes do Projeto;
- Estar disponível, mediante agenda com a supervisão da FPMZB, para realizar apresentação ou palestra do trabalho final colaborando na capacitação de funcionários;
- Citar o nome da FPMZB nos produtos da pesquisa e quando os resultados da pesquisa obtiverem divulgação em congresso, encontros ou publicações.

Estou ciente de que, caso não seja realizado o Projeto, deverei oficializar o cancelamento do mesmo junto a FPMZB, através do e-mail pesquisasfpmzb@pbh.gov.br, fornecendo relatório com os resultados parciais da pesquisa.

Local e data

Anexo 4. Continuação.



Belo Horizonte, 04 de agosto de 2021

Assinatura do proponente (orientador/responsável técnico)

Júlia Angélica Gonçalves da Silveira



ANEXO 5

Anexo 5. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

I. DADOS SOBRE A PESQUISA

Título do Protocolo de Pesquisa:

Pesquisador:

Cargo/Função:

Duração da Pesquisa:

Justificativa

O SARS-CoV-2, coronavírus de origem zoonótica, foi detectado em humanos na China no final de 2019. Uma vez estabelecida a transmissão entre humanos, a doença COVID-19 se tornou pandêmica e até o momento não foi completamente esclarecido o papel dos animais domésticos e selvagens na cadeia de transmissão e manutenção do vírus. Considerando os recentes relatos sobre a detecção de SARS-CoV-2 em animais de Hong Kong, Bélgica e Estados Unidos, e a grande proximidade entre pessoas e seus animais de estimação, principalmente cães e gatos, inclusive observada no Brasil, torna-se importante elucidar aspectos da história natural da doença, como o possível ciclo zoonotrófico em um estudo multicêntrico para a vigilância de SARS-CoV-2 em pets, em consonância com os preceitos do Sistema Único de Saúde e da Saúde Única (indissociabilidade entre saúde humana, animal e ambiental). Esta é uma proposta inédita pois, até o momento, não se conhece uma rede de colaboração de enfrentamento à SARS-CoV-2 cujo enfoque seja em Saúde Única e na promoção da articulação de ações voltadas aos animais de companhia entre as diversas regiões, envolvendo diferentes instituições de ensino e pesquisa nacionais e internacionais.

Objetivos

Objetivo geral

Promover a vigilância de SARS-CoV-2 em animais de companhia do Brasil com interface à Saúde Única.

Objetivos específicos

- Realizar o diagnóstico laboratorial e monitorar, longitudinalmente, a infecção em animais (cães e gatos) de tutores positivos para a COVID-19, com diagnóstico laboratorial confirmado pelo Sistema Único de Saúde.
- Comparar e determinar as características ambientais e outros fatores associados à infecção nos animais positivos, em diferentes regiões do país.
- Propor um fluxograma padrão e proposta de ações para o controle da COVID-19 em animais de estimação em parceria com órgãos de vigilância em saúde, em especial vigilância ambiental e zoonoses, e atenção primária, nas diferentes regiões do país.

Metodologia

Será realizado um estudo longitudinal prospectivo, com dois momentos de avaliação, sendo incluídos animais de companhia cujo tutor esteja em isolamento domiciliar, com diagnóstico laboratorial confirmado para SARS-CoV-2 através de RT-qPCR ou resposta imunológica apenas por IgM (caracterizando doença ativa), até sete dias da data do diagnóstico, residente em uma das capitais Belo Horizonte (MG), Campo Grande (MS), Curitiba (PR), Recife (PE), São Paulo (SP).

Para análise da transmissão de SARS-CoV-2 entre humanos e seus animais, serão coletadas amostras biológicas com intervalo médio de sete dias, de pelo menos um animal de companhia da residência. A cada visita será realizada a anamnese e será aplicado o questionário in loco para avaliação do quadro clínico do animal e avaliação ambiental (Anexo 3). De cada animal serão coletados swabs nasal, orofaríngeo e retal (para RT-qPCR), além de sangue total (para diagnósticos diferenciais) e sangue para obtenção de soro (para soroneutralização), totalizando cinco amostras por animal por visita. Para fins de análise, os

Anexo 5. Continuação.

animais que tenham ao menos um swab positivo à RT-qPCR e/ou sorologia positiva serão considerados positivos para COVID-19. As amostras obtidas através de swab serão conservadas em tubos estéreis contendo meio de transporte (estabilizante para vírus e RNA) sob refrigeração (2-8°C) por até 72h, congeladas em -20°C por até 30 dias ou em -80°C por tempo indeterminado e serão processadas através do método de RT-qPCR. Será estabelecido controle de qualidade interlaboratorial para amostras positivas e mesmo número de amostras negativas (aleatório).

Amostras positivas à RT-qPCR serão submetidas ao cultivo celular para isolamento viral e posterior sequenciamento genético para análises filogenéticas. Amostras de sangue total serão conservadas a -80oC e processadas, caso necessário, para o diagnóstico de outras doenças nestes animais. Amostras de soro serão conservadas a -80oC e processadas através de soroneutralização, a fim de avaliar a conversão sorológica e a titulação de anticorpos anti-SARS-CoV-2 nos animais de companhia.

Os dados obtidos aos questionários, à anamnese e os resultados laboratoriais serão tabulados em um banco de dados colaborativo em nuvem e posteriormente analisados para obtenção de risco relativo e análise das variáveis com estatística descritiva e regressão logística, utilizando os softwares R, OpenEpi e SAS. Serão incluídas no banco de dados as informações sobre as metas e indicadores referentes ao item “h”, para os relatórios gerenciais desta pesquisa.

Os resultados dos testes serão o mais brevemente possível informados aos tutores / familiares através de contato telefônico e pela emissão de laudo (resultado de exame) eletrônico, que será enviado por e-mail ou aplicativo de comunicação. Em caso de resultado positivo, os demais animais da residência também serão testados em pool por espécie animal e os familiares serão orientados a estabelecer o acompanhamento veterinário por 14 dias e intensificação das medidas de higiene e proteção individual e coletiva.

Esclarecimentos aos participantes da pesquisa.

A participação é voluntária, as informações fornecidas serão confidenciais e mantidas no anonimato e a pessoa poderá retirar o seu consentimento a qualquer tempo sem prejuízo algum. As informações serão apresentadas apenas numericamente em divulgações científicas.

Portanto, convido o(a) Sr.(a) para colaborar com a pesquisa.

_____, ____ de _____ de 20____.

ASSINATURA
PESQUISADOR:
RG/UF:

II. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

_____, ____ de _____ de 20____.

ASSINATURA
SUJEITO DE PESQUISA OU REPRESENTANTE LEGAL:
RG/UF:

ANEXO 6

Anexo 6. Ficha de Anamnese e Questionário local

1. Nome / identificação:
2. Raça:
3. Sexo:
4. Idade:
5. Castrado: () S () N
6. Vacinas (últimos 12 meses): () N () Polivalente () Antirrábica () Leishmaniose () Outras: _____
7. Vermífugo (últimos 12 meses): () S () N
8. Repelentes: () S () N SE SIM: Quais? () Coleira - marca: _____ () Topspot - marca: _____ () Outros: _____
9. Frequenta veterinário () S () N SE SIM: Data da última visita ao veterinário: _____ Procedimentos / diagnóstico realizados (descrever): _____
10. Alimentação: () Ração: Qual? _____ () Comida caseira () Ração e comida caseira () Outros: _____
11. Apetite: () Normorexia () Polifagia () Hiporexia
12. Ingestão hídrica: () Normodipsia () Polidipsia
13. Urina: () Normúria () Poliúria
14. Fezes: () Normais () Ressecadas () Amolecidas () Diarreicas
- Aspecto _____
15. Vômito: () N () S: Aspecto _____
16. Portador de outras condições de saúde? () N () S SE SIM: Quais? () Doenças infecciosas (descrever) () Não infecciosas / crônicas (descrever)
17. Uso de medicamento: () N () S: Quais (descrever): _____

EXAME FÍSICO

Peso:

Escore corporal:

Temperatura:

Mucosas:

Ausculata:

FC:

Inspeção de boca:

Inspeção de pele:

Reflexo de tosse:

COVID-19 - Sintomático () S () N

AMBIENTE

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

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

ANEXO 7

Anexo 7a: Identificação de cães provenientes domésticos provenientes de Belo Horizonte, Minas Gerais no período compreendido entre janeiro de 2021 a agosto de 2022., quanto ao número de identificação, dados de coleta, sexo, idade e positividade molecular para patógenos transmitidos por vetores. Os resultados obtidos nos ensaios de PCR para *Babesia vogeli*, *E. canis* e *Leishmania* spp. não são mostrados, pois todos os animais apresentaram resultados negativos.

Animal	Data de coleta	Sexo	Idade	AEGP	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>A. platys</i>	EM	MH	Piroplasmas
BHC01	16.01.2021	F*	1.5	Positivo	-	Positivo	-	-	-
BHC02	16.01.2021	M**	3	Positivo	-	-	-	-	Positivo
BHC03	16.01.2021	M	8	-	-	-	-	-	-
BHC04	16.01.2021	M	6	-	-	-	-	-	Positivo
BHC05	20.01.2021	M	13	Positivo	-	Positivo	-	-	-
BHC06	20.01.2021	M	2	-	-	-	Positivo	-	Positivo
BHC07	20.01.2021	F	1.5	Positivo	-	-	-	-	-
BHC08	26.02.2021	M	10	Positivo	Positivo	-	-	-	Positivo
BHC09	26.02.2021	M	16	Positivo	-	-	-	-	Positivo
BHC10	26.03.2021	F	3	Positivo	-	-	-	-	-
BHC11	31.03.2021	F	8	Positivo	-	Positivo	-	-	Positivo
BHC12	09.04.2021	F	11	Positivo	-	Positivo	-	-	Positivo
BHC13	07.05.2021	F	7	Positivo	-	-	-	-	Positivo
BHC14	07.05.2021	M	5	Positivo	-	-	-	-	Positivo
BHC15	02.07.2021	F	15	Positivo	-	-	-	-	Positivo
BHC16	06.08.2021	M	7	Positivo	-	Positivo	Positivo	Positivo	-
BHC17	17/01/2022	F	9	Positivo	-	-	-	-	-
BHC18	20/01/2022	F	4	Positivo	-	-	-	-	-
BHC19	20/01/2022	M	8	-	-	-	-	-	-
BHC20	20/01/2022	M	1.2	-	-	-	-	-	-
BHC21	20/01/2022	M	1,4	Positivo	-	-	-	-	Positivo
BHC22	22/01/2022	F	2	Positivo	-	-	-	-	Positivo
BHC23	10/02/2022	F	4	Positivo	-	-	-	Positivo	-
BHC24	11/02/2022	F	4.5	-	-	-	-	-	-
BHC25	11/02/2022	M	4.10	Positivo	-	-	-	-	-
BHC26	08/02/2022	F	7	-	-	-	-	-	Positivo
BHC27	16/02/2022	F	8	Positivo	-	Positivo	-	-	Positivo
BHC28	16/02/2022	F	0.9	Positivo	-	-	-	-	-

* Fêmea; **Macho; - Negative; AEGP: *Anaplasma/ Ehrlichia* sp. granulócitos/plaquetas; EM: *Ehrlichia* sp. monocítica; MH: *Mycoplasma* sp. hemotrópico

Anexo 7a: (continuação)

Animal	Data de coleta	Sexo	Idade	AEGP	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>A. platys</i>	EM	MH	Piroplasmas
BHC29	16/02/2022	M	2	-			-	-	Positivo
BHC30	17/02/2022	M	10	Positivo	-	-	-	-	-
BHC31	17/02/2022	F	16	Positivo	-	-	-	-	-
BHC32	22/02/2022	F	1.5	-			-	-	Positivo
BHC33	22/02/2022	F	1	Positivo	-	-	-	-	Positivo
BHC34	03/03/2022	F	14	Positivo	-	-	-	-	-
BHC35	03/03/2022	F	10	Positivo	-	-	-	-	-
BHC36	03/03/2022	M	10	-			-	-	-
BHC37	26/05/2022	M	1.3	Positivo	-	-	-	-	Positivo
BHC38	13/06/2022	M	0.6	Positivo	-	-	-	-	-
BHC39	15/06/2022	M	3	-			-	Positivo	-
BHC40	15/06/2022	F	3	-			-	Positivo	-
BHC41	28/06/2022	M	7	-			-	-	-
BHC42	05/07/2022	F	7	-			-	-	-
BHC43	05/07/2022	F	11	-			-	Positivo	-
BHC44	05/07/2022	M	2	-			-	-	-
BHC45	05/07/2022	F	6	-			-	-	-
BHC46	05/07/2022	F	7	-			-	Positivo	-
BHC47	21/07/2022	M	3.5	-			-	-	-
BHC48	02/08/2022	F	5	-			-	Positivo	-

Anexo 7b: Identificação de gatos domésticos de Belo Horizonte, Minas Gerais com relação ao número de identificação, dados de coleta, sexo, idade, soropositividade e/ou infecção por patógenos detectados entre janeiro de 2021 e agosto de 2022. Os resultados obtidos nos ensaios de PCR para *Anaplasma/Ehrlichia* sp. granulócitos/plaquetas, *Piroplasma* e *Leishmania* spp. não são mostrados, pois todos os animais apresentaram resultados negativos.

Animal	Data de coleta	Sexo	Idade	EM	<i>E. canis</i>	<i>Bartonella</i> sp	MH	<i>Mycoplasma haemofelis</i>	<i>Candidatus M. haemominutum</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
BHG01	12.03.2021	M*	2	-		-	-			-
BHG02	30.03.2021	F**	10	-		-	-			-
BHG03	31.03.2021	M	2	-		-	-			-
BHG04	07.05.2021	F	7	-		-	-			-
BHG05	07.05.2021	M	3	Positivo		-	-			-
BHG06	12.05.2021	F	5	Positivo		-	-			-
BHG07	23.07.2021	F	10	Positivo		-	-			Positivo
BHG08	23.07.2021	F	1.5	-		-	-			-
BHG09	23.07.2021	M	3	-		-	-			Positivo
BHG10	03.08.2021	F	1.5	Positivo		-	-			Positivo
BHG11	-	F	3.5	Positivo		-	-			Positivo
BHG12	17/01/2022	M	7	-		-	-			Positivo
BHG13	20/01/2022	M	9	Positivo		-	-			-
BHG14	27/01/2022	M	4	-		-	Positivo	-	Positivo	-
BHG15	27/01/2022	F	6	Positivo		-	-			-
BHG16	27/01/2022	F	3	Positivo		-	Positivo	Positivo	Positivo	-
BHG17	27/01/2022	M	3.5	Positivo		-	-			-
BHG18	27/01/2022	M	0.10	-		-	-			Positivo
BHG19	27/01/2022	F	2	Positivo	Positivo	-	Positivo	Positivo	Positivo	-
BHG20	27/01/2022	M	4	-		-	Positivo	-	Positivo	-
BHG21	22/01/2022	M	3	-		Positivo	Positivo	-	-	-
BHG22	07/02/2022	M	4	-		-	-			-
BHG23	10/02/2022	F	8	-		Positivo	-			-
BHG24	11/02/2022	M	2	-		-	-			-
BHG25	11/02/2022	M	9	-		Positivo	-			-
BHG26	11/02/2022	M	ND	-		-	-			-
BHG27	14/02/2022	F	2.4	-		-	-			-
BHG28	14/02/2022	M	< 1	-		-	-			-

< 1: menos que 1 ano * Macho; **Fêmea; - Negativo; EM: *Ehrlichia* sp. monocítica; MH: *Mycoplasma* sp. hemotrópico

Anexo 7b: (continuação)

Animal	Data de coleta	Sexo	Idade	EM	<i>E. canis</i>	<i>Bartonella</i> sp	MH	<i>Mycoplasma haemofelis</i>	<i>Candidatus M. haemominutum</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
BHG29	17/02/2022	F	2	Positivo	-	-	-			-
BHG30	03/05/2022	F	1	-		-	-			-
BHG31	03/05/2022	M	4	-		-	-			-
BHG32	26/05/2022	F	1	-		-	-			-
BHG33	26/05/2022	M	2.6	-		-	-			-
BHG34	15/06/2022	M	1.5	-		-	-			-
BHG35	23/06/2022	F	13	-		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	-
BHG36	28/06/2022	F	8	-		Positivo	Positivo	-	-	-
BHG37	05/07/2022	F	4	-		-	Positivo	-	-	-
BHG38	05/07/2022	F	3	-		Positivo	-			-

ANEXO 8

Anexo 8. Identificação de gatos provenientes do Parque Municipal Américo Rene Giannetti, Belo Horizonte, Minas Gerais, quanto ao número de identificação, dados de coleta, sexo, idade e positividade molecular para patógenos transmitidos por vetores.

Animal	Data de coleta	Sexo	Idade	AEGP	<i>A. platys</i>	EM	<i>E. canis</i>	<i>Bartonella</i> sp.	Espécies <i>Bartonella</i>	MH	Espécies <i>Mycoplasma</i>	Piroplasmas	<i>Leishmania</i> sp.	Espécies <i>Leishmania</i>
GP01	08.02.2021	M*	Adulto	Positivo	-	-	-	Positivo	<i>B. henselae</i>	-	-	-	-	-
GP02	08.02.2021	M	Jovem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GP03	15.02.2021	F**	Adulto	-	-	Positivo	-	-	-	-	-	-	-	-
GP04	15.02.2021	F	Adulto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GP05	15.02.2021	M	Adulto	-	-	Positivo	-	Positivo	<i>B. henselae</i>	-	-	-	-	-
GP06	22.02.2021	M	Adulto	-	-	-	-	-	-	Positivo	<i>M. haemominutun</i>	-	-	-
GP07	22.02.2021	F	Adulto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GP08	22.02.2021	F	Adulto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GP09	01.03.2021	F	Adulto	-	-	-	-	Positivo	<i>B. henselae</i>	-	-	-	Positivo	<i>L. infantum</i>
GP10	01.03.2021	F	Adulto	-	-	-	-	Positivo	<i>B. henselae</i>	-	-	-	Positivo	<i>L. infantum</i>
GP11	15.03.2021	M	Adulto	-	-	-	-	-	-	Positivo	<i>M. haemominutun</i>	-	-	-
GP12	22.03.2021	M	Adulto	-	-	-	-	Positivo	<i>B. clarridgeiae</i>	-	-	-	-	-
GP13	22.03.2021	M	Adulto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GP14	22.03.2021	M	Adulto	-	-	-	-	Positivo	<i>B. henselae</i>	-	-	-	-	-
GP15	29.03.2021	F	Adulto	-	-	-	-	Positivo	<i>B. henselae</i>	-	-	-	-	-
GP16	29.03.2021	F	Adulto	-	-	-	-	Positivo	<i>B. henselae</i>	-	-	-	-	-
GP17	29.03.2021	M	Adulto	-	-	-	-	Positivo	<i>B. henselae</i>	-	-	-	-	-
GP18	29.03.2021	F	Adulto	-	-	-	-	Positivo	<i>B. henselae</i>	-	-	-	-	-
GP19	11.05.2021	M	Adulto	-	-	-	-	Positivo	<i>B. clarridgeiae</i>	-	-	-	-	-
GP20	11.05.2021	F	Adulto	-	-	-	-	Positivo	<i>B. henselae</i>	-	-	-	-	-
GP21	12.05.2021	F	Jovem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GP22	12.05.2021	F	Adulto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GP23	12.05.2021	M	Adulto	-	-	-	-	Positivo	<i>B. henselae</i>	-	-	-	-	-
GP24	12.05.2021	F	Adulto	-	-	Positivo	Positivo	-	-	-	-	-	-	-
GP25	12.05.2021	F	Adulto	-	-	Positivo	-	Positivo	<i>B. henselae</i>	-	-	-	-	-
GP26	12.05.2021	F	Adulto	-	-	Positivo	Positivo	Positivo	<i>B. henselae</i>	-	-	-	-	-
GP27	12.05.2021	F	Filhote	-	-	-	-	Positivo	<i>B. henselae</i>	-	-	-	-	-
GP30	13.05.2021	F	Adulto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Male; **Female; - Negative; AEGP: *Anaplasma/ Ehrlichia* sp. granulócitos/plaquetas; EM: *Ehrlichia* sp. monocítica; MH: *Mycoplasma* sp. hemotrópico

Anexo 8: (continuação)

Animal	Data de coleta	Sexo	Idade	AEGP	<i>A. platys</i>	EM	<i>E. canis</i>	<i>Bartonella</i> sp.	Espécies <i>Bartonella</i>	MH	Espécies <i>Mycoplasma</i>	Piroplasmas	<i>Leishmania</i> sp.	Espécies <i>Leishmania</i>
GP31	13.05.2021	F	Adulto	-		Positivo	-	-	-	-		-	-	
GP32	13.05.2021	F	Adulto	Positivo	-	-		-	-	-		-	-	
GP33	13.05.2021	M	Adulto	-		-		Positivo	<i>B. clarridgeiae</i>	-		-	-	
GP34	14.05.2021	F	Adulto	-		-		-	-	-		-	-	
GP35	14.05.2021	M	Adulto	-		Positivo	-	-	-	-		-	-	
GP36	14.05.2021	M	Adulto	-		-		Positivo	<i>B. clarridgeiae</i>	-		-	-	
GP37	14.05.2021	F	Adulto	-		-		-	-	-		-	-	
GP38	20.05.2021	M	Adulto	-		-		-	-	-		-	Positivo	<i>L. infantum</i>
GP39	20.05.2021	M	Adulto	-		-		-	-	-		-	-	
GP40	20.05.2021	M	Filhote	-		-		-	-	-		-	-	
GP41	20.05.2021	F	Filhote	-		-		Positivo	<i>B. henselae</i>	-		-	-	
GP42	21.05.2021	M	Adulto	-		-		-	-	Positivo	<i>M. haemominutun</i>	-	-	
GP43	21.05.2021	F	Filhote	Positivo	-	-		-	-	-		-	-	
GP44	25.05.2021	F	Adulto	-		-		-	-	-		-	-	
GP45	25.05.2021	M	Adulto	Positivo	Positivo	-		-	-	-		-	Positivo	<i>L. infantum</i>
GP46	27.05.2021	M	Adulto	-		-		Positivo	<i>B. clarridgeiae</i>	-		-	-	
GP47	27.05.2021	F	Adulto	-		Positivo	-	Positivo	<i>B. henselae</i>	-		-	-	
GP48	27.05.2021	M	Adulto	-		Positivo	-	-	-	-		-	-	
GP49	27.05.2021	M	Adulto	-		-		Positivo	<i>B. henselae</i>	-		-	-	
GP50	27.05.2021	F	Adulto	-		-		Positivo	<i>B. henselae</i>	-		-	-	
GP51	28.05.2021	M	Adulto	-		-		Positivo	<i>B. henselae</i>	-		-	-	
GP52	01.06.2021	M	Adulto	-		-		-	-	-		-	-	
GP53	01.06.2021	F	Adulto	-		-		-	-	-		-	-	
GP54	01.06.2021	M	Adulto	-		-		-	-	-		Positivo	-	
GP55	04.06.2021	F	Adulto	Positivo	-	-		-	-	-		-	-	
GP56	08.06.2021	F	Adulto	-		-		Positivo	<i>B. clarridgeiae</i>	-		-	-	
GP57	08.06.2021	M	Adulto	-		-		-	-	-		-	-	
GP58	08.06.2021	M	Adulto	Positivo	-	-		-	-	-		-	-	

Anexo 8: (continuação)

Animal	Data de coleta	Sexo	Idade	AEGP	<i>A. platys</i>	EM	<i>E. canis</i>	<i>Bartonella</i> sp.	Espécies <i>Bartonella</i>	MH	Espécies <i>Mycoplasma</i>	Piroplasmas	<i>Leishmania</i> sp.	Espécies <i>Leishmania</i>
GP59	08.06.2021	M	Adulto	-		-		-	-	-		-	-	
GP60	09.06.2021	F	Adulto	Positivo	-	-		-	-	-		-	-	
GP61	10.06.2021	F	Adulto	Positivo	Positivo	-		-	-	-		-	-	
	10.06.2021	M	Adulto	Positivo	-	-		-	-		<i>M. haemofelis</i> <i>M. haemominutun</i>	-	-	
GP62										Positivo				
GP63	17.06.2021	M	Adulto	Positivo	-	-		-	-	-		Positivo	-	
GP64	18.06.2021	F	Adulto	-		-		Positivo	<i>B. henselae</i>	-		-	-	
GP65	18.06.2021	F	Adulto	Positivo	-	-		-	-	-		-	-	
	18.06.2021	F	Adulto			-		Positivo	<i>B. clarridgeiae</i>	Positivo	<i>M. haemominutun</i>	-	-	
GP66				-										
GP67	15.07.2021	M	Adulto	-		-		-	-	-		-	-	
GP68	15.07.2021	M	Adulto	Positivo	-	-		-	-	-		-	-	
GP69	15.07.2021	F	Adulto	-		Positivo	-	-	-	-		-	-	
GP70	15.07.2021	F	Adulto	Positivo	-	-		-	-	-		-	Positivo	<i>L. infantum</i>
GP71	15.07.2021	F	Adulto	Positivo	-	-		-	-	-		-	-	
GP72	15.07.2021	F	Adulto	Positivo	Positivo	-		-	-	-		-	-	
GP73	22.07.2021	M	Adulto	Positivo	-	-		-	-	-		-	-	
GP74	29.07.2021	M	Adulto	-		-		-	-	-		-	Positivo	<i>L. infantum</i>
GP75	29.07.2021	M	Adulto	Positivo	-	-		-	-	-		-	Positivo	<i>L. infantum</i>
GP76	12.08.2021	F	Adulto	Positivo	-	-		-	-	-		-	Positivo	<i>L. infantum</i>
	12.08.2021	F	Adulto	Positivo	-		-	-	-		<i>M. haemominutun</i>	-	Positivo	<i>L. infantum</i>
GP77						Positivo				Positivo				
GP78	12.08.2021	M	Adulto	-		-		Positivo	<i>B. henselae</i>	-		-	Positivo	<i>L. infantum</i>
	02.09.2021	F	Adulto	-		-		Positivo	<i>B. henselae</i>	-		-	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
GP79														
GP80	02.09.2021	F	Adulto	-		-		Positivo	<i>B. henselae</i>	-		-	Positivo	<i>L. infantum</i>

ANEXO 9

Anexo 9: Características das amostras coletadas de mamíferos pertencentes ao plantel da FPMZB Belo Horizonte, MG, no período compreendido entre de novembro 2021 a março 2023.

Identidade	Data de coleta	Espécie	Nome Científico	Ordem/Família	Sexo	Sangue total	Swabe oral	Swabe retal	Swabe nasal
AZ01	04.11.2021	Gato palheiro	<i>Leopardus braccatus</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	M*	Sim	Sim	Sim	sim
AZ02	04.11.2021	Gato palheiro	<i>Leopardus braccatus</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	M	Sim	Sim	Sim	sim
AZ03	04.11.2021	Gato palheiro	<i>Leopardus braccatus</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	F**	-	Sim	Sim	sim
AZ04	22.11.2021	Gorila	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Ordem Primates. Família Hominidae	F	Sim	Sim	Sim	sim
AZ05	22.11.2021	Gorila	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Ordem Primates. Família Hominidae	F	Sim	Sim	Sim	sim
AZ06	07.12.2021	Onça Parda	<i>Puma concolor</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	F	Sim	Sim	Sim	sim
AZ07	16.12.2021	Lobo Guará	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Ordem: Carnivora. Família Canidae	F	Sim	Sim	Sim	-
AZ08	08.02.2022	Furão	<i>Galictis cuja</i>	Ordem: Carnivora. Família: Mustelidae.	M	Sim	Sim	Sim	sim
AZ09	08.02.2022	Veado Catingueiro	<i>Subulo gouazoubira</i>	Ordem: Artiodactyla. Família: Cervidae	M	Sim	Sim	Sim	sim
AZ10	08.02.2022	Cervo Nobre	<i>Cervus elaphus</i>	Ordem: Artiodactyla.. Família: Cervidae	F	-	Sim	Sim	sim
AZ11	10.03.2022	Lobo Guará	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Ordem: Carnivora. Família Canidae	F	Sim	Sim	Sim	sim
AZ12	10.03.2022	Lobo Guará	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Ordem: Carnivora. Família Canidae	F	Sim	Sim	Sim	sim
AZ13	10.03.2022	Lobo Guará (óbito 1er semestre 2023)	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Ordem: Carnivora. Família Canidae	M	Sim	Sim	Sim	sim
AZ14	16.03.2022	Lobo Guará	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Ordem: Carnivora. Família Canidae	M	Sim	Sim	Sim	sim
AZ15	16.03.2022	Lobo Guará	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Ordem: Carnivora. Família Canidae	M	Sim	Sim	Sim	sim
AZ16	16.05.2022	Cervo Dama	<i>Dama dama</i>	Ordem: Artiodactyla. Família: Cervidae	M	Sim	Sim	Sim	sim
AZ17	16.05.2022	Gorila	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Ordem Primates. Família Hominidae	M	Sim	Sim	Sim	sim
AZ18	27.05.2022	Lobo Guará	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Ordem: Carnivora. Família Canidae	M	Sim	Sim	Sim	sim
AZ19	27.07.2022	Rinoceronte	<i>Ceratotherium simum</i>	Ordem Perissodactyla. Família Rhinocerotidae.	F	Sim	-	-	-

M*: Macho F**: Fêmea

Anexo 9: (continuação)

Identidade	Data de coleta	Espécie	Nome Científico	Ordem/Família	Sexo	Sangre total	Swab oral	Swab retal	Swab nasal
AZ20	27.07.2022	Bugio	<i>Alouatta sp</i>	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	F	Sim	-	-	-
AZ21	27.07.2022	Bugio	<i>Alouatta sp</i>	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	F	Sim	-	-	-
AZ22	25.08.2022	Tamanduá (obito1er semestre 2023)	<i>Tamandua tetradactyla</i>	Ordem: Pilosa. Família: Myrmecophagidae.	M	Sim	-	-	-
AZ25	25.08.2022	Leão	<i>Panthera leo</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	M	Sim	Sim	Sim	Sim
AZ26	01.06.2022	Mico leão dourado	<i>Leontopithecus rosalia</i>	Ordem Primates. Família Callitrichidae	M	-	-	-	-
AZ27	01.07.2022	Macaco aranha	<i>Ateles sp</i>	Ordem Primates. Família Atelidae	M	Sim	Sim	Sim	Sim
AZ28	25.10.2022	Macaco barrigudo	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Ordem Primates. Família Atelidae	F	Sim	Sim	Sim	-
AZ29	25.10.2022	Macaco prego	<i>Sapajus apella</i>	Ordem Primates. Família Cebidae	M	Sim	Sim	Sim	-
AZ30	15.11.2022	Veado Catingueiro (obito1er semestre 2023)	<i>Brown Brocket Deer (Subulo gouazoubira)</i>	Ordem: Artiodactyla.. Família: Cervidae	M	Sim	Sim	Sim	Sim
AZ31	21.11.2022	Onça Pintada	<i>Panthera onca</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	F	Sim	Sim	Sim	sim
AZ32	24.11.2022	Macaco barrigudo	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Ordem Primates. Família Atelidae	M	Sim	Sim	Sim	-
AZ33	24.11.2022	Macaco barrigudo	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Ordem Primates. Família Atelidae	F	Sim	Sim	Sim	-
AZ34	24.11.2022	Macaco Pregro	<i>Sapajus apella</i>	Ordem Primates. Família Cebidae	M	Sim	Sim	Sim	-
AZ35	24.11.2022	Macaco Barrigudo	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Ordem Primates. Família Atelidae	F	Sim	Sim	Sim	-
AZ36	24.1.2023	Cervo Dama	<i>Dama dama</i>	Ordem: Artiodactyla.. Família: Cervidae	M	Sim	Sim	Sim	sim
AZ37	24.1.2023	Cutia	<i>Dasyprocta sp</i>	Ordem Rodentia. Família: Dasyproctidae	M	Sim	Sim	Sim	sim
AZ38	26.1.2023	Bugio	<i>Alouatta sp</i>	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	M	Sim	Sim	Sim	sim
AZ39	26.1.2023	Bugio	<i>Alouatta sp</i>	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	F	Sim	Sim	Sim	sim
AZ40	26.1.2023	Bugio	<i>Alouatta sp</i>	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	F	-	Sim	Sim	sim
AZ41	26.1.2023	Bugio	<i>Alouatta sp</i>	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	F	Sim	Sim	Sim	sim
AZ42	26.1.2023	Bugio	<i>Alouatta sp</i>	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	M	Sim	Sim	Sim	sim
AZ43	26.1.2023	Bugio	<i>Alouatta sp</i>	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	M	Sim	Sim	Sim	sim

Anexo 9: (continuação)

Identidade	Data de coleta	Espécie	Nome Científico	Ordem/Família	Sexo	Sangre total	Swab oral	Swab retal	Swab nasal
AZ44	25.01.2023	Onça Parda	<i>Puma concolor</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	F	Sim	Sim	Sim	sim
AZ45	10.02.2023	Bugio	<i>Alouatta sp</i>	Ordem: Primates. Família: Cebidae.	M	Sim	Sim	Sim	sim
AZ46	15.11.2022	Hipopótamo	<i>Hippopotamus amphibius</i>	Ordem: Artiodactyla. Família: Hippopotamidae	F	Sim	Sim	Sim	Sim
AZ47	21.11.2022	Mico leão preto	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	Ordem Primates. Família Callithrichidae.	M	-	Sim	Sim	-
AZ48	24-11.2022	Macaco prego	<i>Sapajus apella</i>	Ordem Primates. Família Cebidae	F	-	Sim	Sim	-
AZ49	24.11.2022	Macaco prego	<i>Sapajus apella</i>	Ordem Primates. Família Cebidae	M	-	Sim	Sim	-
AZ51	24.11.2022	Sagui imperial	<i>Saguinus imperator</i>	Ordem Primates. Família Callithrichidae	M	-	Sim	Sim	-
AZ52	24.11.2022	Sagui imperial	<i>Saguinus imperator</i>	Ordem Primates. Família Callithrichidae	M	-	Sim	Sim	-
AZ53	24.11.2022	Cobo de meia lua (óbito)	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	Ordem: Artiodactyla. Família: Bovidae	M	-	Sim	Sim	Sim
AZ56	24.11.2022	Sagui imperial	<i>Saguinus imperator</i>	Ordem Primates. Família Callithrichidae	M	-	Sim	Sim	-
AZ57	03.03.2023	Onça parda	<i>Puma concolor</i>	Ordem: Carnivora. Família Felidae.	M	-	Sim	Sim	Sim