

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

IVYSON DA SILVA EPIFÂNIO

**VIGILÂNCIA DO SARS-COV-2 EM ANIMAIS DE COMPANHIA NA REGIÃO
METROPOLITANA DO RECIFE, ESTADO DE PERNAMBUCO**

RECIFE

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

IVYSON DA SILVA EPIFÂNIO

**VIGILÂNCIA DO SARS-COV-2 EM ANIMAIS DE COMPANHIA NA REGIÃO
METROPOLITANA DO RECIFE, ESTADO DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Friguglietti Brandespim

RECIFE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

E64v

Epifânio, Ivyson da Silva

Vigilância do SARS-CoV-2 em animais de companhia na região metropolitana do Recife, estado de Pernambuco / Ivyson da Silva Epifânio. - 2022.

62 f. : il.

Orientador: Daniel Friguglietti .

Inclui referências e anexo(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2022.

1. Coronavírus. 2. Vigilância em saúde. 3. Pandemia. 4. Animais domésticos. I. , Daniel Friguglietti, orient. II. Título

CDD 636.089

IVYSON DA SILVA EPIFÂNIO

**VIGILÂNCIA DO SARS-COV-2 EM ANIMAIS DE COMPANHIA NA REGIÃO
METROPOLITANA DO RECIFE, ESTADO DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Biociência Animal.

Área de concentração: Morfofisiologia, Sanidade Animal, Humana e Ambiental na linha de pesquisa Saúde Única

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniel Friguglietti Brandespim (Orientador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.^a. Dra. Juliana Arena Galhardo (Membro Titular)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior (Membro Titular)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

EPÍGRAFE

“Onde pisamos está o que é bom para manter a vida, nossa casa que tem sentido de lar é toda a floresta onde estão as frutas, roças, caça, e os peixes dos rios de água das montanhas, onde espíritos poderosos guardam nossa natureza, e que não podem ser destruídas pois ajudam a segurar esta última camada de cima, este céu que se desabar vai acabar não só com os yanomami, mas com todos nós”

Povo yanomami

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi realizar a vigilância do SARS-CoV-2 em animais de companhia na Região Metropolitana do Recife - PE, com interface à Saúde Única. Trata-se de um estudo longitudinal prospectivo em cães e gatos realizado em residências cujos tutores estavam em isolamento domiciliar, com diagnóstico laboratorial confirmado para SARS-CoV-2 utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa em tempo real (RT-qPCR). Durante o período de dezembro de 2020 a julho de 2021 foram coletadas 31 amostras de *swabs* orofaríngeos e retais de 16 cães e 15 gatos e encaminhadas para o Laboratório TECSA, localizado na cidade de Belo Horizonte - MG, onde foram realizados os testes de diagnóstico molecular RT-q-PCR quanto à presença de RNA específico para SARS-CoV-2 em dois genes alvos (N1 e N2). Dos animais testados, dois gatos (RE-02F e RE-04F) testaram positivo para SARS-CoV-2 em RT-qPCR. Ambos tiveram *swabs* orofaríngeos positivos, RE-04F teve uma carga viral mais alta (alvo N1: CT 31,65, 11,362 número de cópias de RNA / μ L; alvo N2: CT 33,46, 19,2 número de cópias / μ L) em comparação com RE-02F (alvo N1: CT 34,49, 1,87 número de cópias de RNA / μ L; alvo N2: CT 34,38, 10,65 número de cópias de RNA / μ L). O animal denominado RE-04F também teve um alvo positivo por *swab* retal (alvo N2: CT 36,7, 2,41 número de cópias de RNA / μ L). A amplificação específica de ACTB foi demonstrada em todos os ensaios. A infecção por SARS-CoV-2 detectada nos gatos possivelmente tenha ocorrido devido ao contato próximo gato-humano com tutores positivos, incluindo compartilhar a mesma cama e interagir sem proteção durante o isolamento. Diante dos achados sugere-se que as pessoas infectadas devem tomar os mesmos cuidados em relação ao distanciamento com os animais, medida já adotada pela prevenção da transmissão do novo coronavírus entre humanos para evitar a propagação da infecção aos animais de companhia.

Palavras-chave: Coronavírus, vigilância em saúde, pandemia, animais domésticos.

ABSTRACT

The objective of this research was to carry out the surveillance of SARS-CoV-2 in pets in the Metropolitan Region of Recife - PE with an interface with ONE HEALTH. This is a prospective longitudinal study carried out with dogs or cats in selected homes whose tutors were in home isolation with laboratory diagnosis by RT-QPCR for the SARS-CoV2. During the period from December 2020 to July 2021, 31 samples of presented and rectal swabs were collected from 16 dogs and 15 cats and taken to the TECSA Laboratory, located in the city of Belo Horizonte - MG, where RT-q-PCR molecular diagnostic tests were performed for the presence of RNA specific for SARS-CoV-2 in two target genes (N1 and N2). All samples were tested twice and the result was considered positive when both tests resulted positive. Furthermore, the positive samples were tested once again to confirm the presence of SARS-CoV-2. Among the animals tested, two cats (RE-02F and RE-04F) tested positive for SARS-CoV-2 by RT-qPCR. Both had positive oropharyngeal swabs, RE-04F had a higher viral load (target N1: CT 31.65, 11,362 number of RNA copies / μ L; target N2: CT 33.46, 19.2 number of copies/ μ L) in comparison to RE-02F (target N1: CT 34.49, 1.87 number of RNA copies / μ L; target N2: CT 34.38, 10.65 RNA copies / μ L). The animal named RE-04F also had a positive target by rectal swab (target N2: CT 36.7, 2.41 number of RNA copies / μ L). Specific amplification of ACTB was demonstrated in all assays. The infection by SARS-Co-2 detected in the cats possibly occurred due to close cat-to-human contact with positive owners, including sharing the same bed and interacting without protection during isolation. In light of the findings, it is suggested that infected people have the same care regarding the distance from animals, a measure that is already taken to prevent the transmission of the new coronavirus between humans, to avoid infection of pets.

Key-words: Coronavirus, health surveillance, pandemic, domestic animals

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFCD – Departamento de Agricultura, Pesca e Conservação

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FPS – Serviço Público Federal

GEI-ESPII – Grupo Executivo Interministerial de Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional e Internacional

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MERS-CoV – Síndrome Respiratória do Oriente Médio pelo Coronavírus

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

OMS – Organização Mundial de Saúde

PIF – Peritonite Infecciosa Felina

PNVS – Políticas Nacional de Vigilância em Saúde

RMR – Região Metropolitana do Recife

RNA – Ácido Ribonucleico

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase transcriptase reversa

SARS – Síndrome Respiratória Aguda Grave

SG – Síndrome Gripal

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

VS – Vigilância em Saúde

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Distribuição brasileira de casos de SARS-CoV-2 em gatos e cães relatados à OIE.....	24
Tabela 02	Número total de coletas em cães e gatos por <i>swab</i> orofaríngeo e retal e total de positivos para SARS-CoV-2 por RT-qPCR.....	30
Tabela 03	Ficha Técnica notificada ao serviço veterinário oficial do animal (RE02F).....	31
Tabela 04	Ficha Técnica notificada ao serviço veterinário oficial do animal (RE04F).....	32
Tabela 05	Frequência absoluta (F.A.) e Frequência Relativa (F.R.) das respostas das variáveis relacionadas ao ambiente em residências de tutores positivos para COVID-19, em felinos com resultados positivos e negativos ao Exame de RT-qPCR, na Região Metropolitana do Recife/PE, no ano de 2020 e 2021.....	33
Tabela 06	Frequência absoluta (F.A.) e Frequência Relativa (F.R.) das respostas das variáveis relacionadas aos humanos em residências de tutores positivos para COVID-19, em felinos com resultados positivos e negativos ao Exame de RT-qPCR, na Região Metropolitana do Recife/PE, no ano de 2020 e 2021.....	34
Tabela 07	Frequência absoluta (F.A.) e Frequência Relativa (F.R.) das respostas das variáveis relacionadas a interação humano-animal em residências de tutores positivos para COVID-19, em felinos com resultados positivos e negativos ao Exame de RT-qPCR, na Região Metropolitana do Recife/PE, no ano de 2020 e 2021.....	35

Tabela 08	Análise estatística da associação entre os fatores de interação homem-animal-ambiente coletadas nos questionários de televigilância em residências de tutores positivos para COVID-19 na Região Metropolitana do Recife/PE, no ano de 2020 e 2021.....	36
------------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Esquema de introdução do SARS-CoV-2 através de um hospedeiro intermediário seguido de transbordamento. Em vermelho as setas indicativas desse cenário.....	18
Figura 02	Imagem de distribuição mundial de casos de SARS-CoV-2 em espécies animais relatados à OIE.....	24
Figura 03	Esquema de diretrizes e fluxograma de notificação de SARS-CoV-2 ao Serviço Veterinário Oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.....	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Coronavírus como agente etiológico e zoonótico.....	15
2.2 Forma de transmissão e sintomatologia em humanos	18
2.3 Animais domésticos e a COVID-19.....	19
2.4 Vigilância da notificação de casos.....	22
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos.....	27
4. METODOLOGIA.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
7. REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO I- First report of SARS-CoV-2 detection in two asymptomatic cats of Pernambuco State, northeastern Brazil.....	47

1 INTRODUÇÃO

Especula-se que 60% dos patógenos humanos emergentes são de origem zoonótica, ou seja, são transmitidos do animal para o homem ou vice-versa. Desses, mais de 71% têm origem em animais silvestres. Estes patógenos podem, ao acaso, adquirir mutações genéticas com potencial patogênico alterado, devido a mudanças nas características ou no comportamento socioeconômico, ecológico ou ambiental dos hospedeiros (CUTLER; FOOKS; POEL, 2010).

Ao final do ano de 2019 foram notificados pela China à Organização Mundial de Saúde (OMS) o aparecimento de vários casos de pneumonia, cujo agente etiológico foi posteriormente confirmado como o novo coronavírus, que por meio do sequenciamento genético, foi denominado de SARS-CoV-2, vírus de origem animal que se adaptou a humanos, causando uma das maiores pandemias já registradas na história (GORBALENYA et al., 2020; BRASIL, 2020a; WHO, 2020; OPAS, 2020).

As investigações epidemiológicas iniciais evidenciaram que a pandemia de SARS-CoV-2 ocorreu pelo transbordamento zoonótico (“spillover”), no qual o grupo de coronavírus já conhecido anteriormente infectando apenas animais silvestres, deu início à infecção em humanos, causando uma forma grave de doença respiratória de forma epidêmica (RODRIGUEZ et al., 2020). Sabe-se que esse transbordamento zoonótico foi influenciado por práticas culturais de consumo constante de animais silvestres na dieta, como serpentes, morcegos, pangolins e civetas pela população asiática, associado ainda a diferenciadas regulamentações e legislações sanitárias nestes países quanto à fiscalização e comercialização de produtos e derivados de animais silvestres, que têm alto potencial de propagação desses patógenos (CUI et al, 2019; MATTAR et al, 2018).

Em cães e gatos domésticos a infecção causada pelo grupo de coronavírus é amplamente conhecida por causar doenças intestinais como a manifestação mais frequente. Existem duas variantes antigênicas para os cães com sintomatologia gastrointestinais e respiratórias (pneumopatia aguda), enquanto em felinos domésticos a doença se restringe a uma infecção gastrointestinal branda, podendo sofrer mutação em alguns animais causando a peritonite infecciosa felina (PIF) (DODDS, 2020).

Com a finalidade de entender como o novo coronavírus se comporta em animais domésticos e se eles podem atuar como amplificador do vírus na cadeia epidemiológica da doença para a transmissão aos seres humanos, torna-se necessária a orientação dos tutores em relação ao adequado manejo de seus animais de estimação, além de atualização da categoria dos médicos veterinários sobre aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnóstico e terapêutico de seus pacientes (DODDS, 2020; GOUMENOU; SPANDIDOS; TSATSAKIS, 2020).

O contato próximo entre pessoas e animais aumenta a susceptibilidade de algumas espécies animais à infecção e também há evidências que alguns animais podem se infectar através do contato próximo a outros animais, fazendo com que os primeiros relatos de cães e gatos positivos para SARS-CoV-2 fossem justamente devido ao contato dos animais com tutores comprovadamente positivos em diversas regiões do mundo (América, Europa e Ásia). Amostras de swab nasal e retal destes animais foram submetidas ao exame de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para a confirmação dos casos (OIE,2021a).

Tendo em vista os relatos sobre a detecção de SARS-CoV-2 em animais domésticos e a grande proximidade entre tutores e seus animais, principalmente cães e gatos, o objetivo deste estudo foi realizar a vigilância do SARS-CoV-2 em animais de companhia na Região Metropolitana do Recife (RMR), estado de Pernambuco, por tratar-se de um estudo inédito no estado e na referida região.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Coronavírus como agente etiológico e zoonótico

Os coronavírus são membros da família *Coronaviridae* e subfamília *Orthocoronavirinae* que está dividida em quatro gêneros (*Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus*) de acordo com suas relações filogenéticas e estruturas genômicas. Os *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* infectam apenas mamíferos, enquanto os *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* infectam principalmente pássaros (ICTV, 2020).

Os coronavírus afetam animais e humanos causando infecções respiratórias e intestinais (MASTERS E PERLMAN, 2013) e não eram considerados virulentos para humanos até o ano de 2002, quando na província de Guangdong na China ocorreu o primeiro surto da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) relacionada ao coronavírus (ZHONG et al., 2003; KSIAZEK et al., 2003), visto que até então os coronavírus circulantes causavam apenas infecções leves em seres humanos.

Dez anos após o primeiro surto da SARS, surgiu em países do Oriente Médio outra doença causada pela mutação do coronavírus altamente virulento para seres humanos, denominada de Síndrome Respiratória do Oriente Médio pelo Coronavírus (MERS-CoV) (ZAKI et al., 2012).

Foi identificado que no início do período da epidemia por SARS relacionado ao coronavírus, todos os pacientes que tiveram contato com animais adoeceram, a partir da identificação de anticorpos anti-SARS-CoV-1 em civetas de palmeira mascarada (*Paguma larvata*) e manipuladores de animais em mercados (GUAN et al., 2003; KAN et al., 2005). No entanto, mais tarde, com o avanço das pesquisas, comprovou-se que estes civetas adquiriram as cepas SARS-CoV-1 de outros animais (KAN et al., 2005). Foi sugerido que os morcegos podem atuar como hospedeiros naturais do coronavírus e que os civetas eram apenas hospedeiros suscetíveis que participaram da cadeia de transmissão, sendo, posteriormente, muitos coronavírus filogeneticamente relacionados ao SARS-CoV-1 identificados em morcegos de diferentes províncias da China, Europa, África e países do sudeste asiático (LAU et al., 2005; TONG et al., 2009).

Um cenário semelhante pode ter acontecido para MERS-CoV que, desde o surto em 2012, foi encontrado em diferentes espécies de morcegos em cinco continentes (ITHETE et al., 2013; YANG et al., 2014). O SARS-CoV-1 e o MERS-CoV foram transmitidos para humanos por civetas de mercado e camelos dromedários, respectivamente (GUAN et al., 2003; HEMIDA et al., 2013).

Em dezembro do ano de 2019, uma nova epidemia surgiu através de uma doença infecciosa na cidade de Wuhan na China, infectando cerca de 2000 pessoas no primeiro mês de registro dos casos. As pesquisas iniciais apontaram que o agente etiológico era um novo coronavírus, relacionado à SARS, denominado como SARS-CoV-2, causador da doença causada pelo coronavírus denominada de COVID-19, pela sua derivação do termo em inglês “Coronavirus Disease” e pelo seu surgimento no ano de 2019, culminando então no termo definido como COVID-19, pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2020).

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, composto por cientistas de todo o mundo, classificou oficialmente este novo coronavírus denominado de SARS-CoV-2, como um vírus RNA fita simples com capsídeo envelopado, que pertence à família *Coronaviridae* e está intimamente relacionado a um grupo de coronavírus do tipo SARS do gênero *Betacoronavirus* e subgênero *Sarbecovirus* (ICTV, 2020).

Até o momento nenhum hospedeiro foi comprovado como o responsável pela COVID-19, sabe-se que uma variedade de espécies pode ser infectada pelo SARS-CoV-2 de forma experimental (cães, gatos, furões, guaxinins, morcegos, hamsters, veados de cauda branca e saguis) ou por contato próximo a humanos comprovadamente portadores do novo coronavírus (gorilas, cães e gatos domésticos, grandes felinos e martas) (MATSUDA et al., 2020).

Ainda é desconhecida a rota de exposição das pessoas ao novo coronavírus através de um suposto reservatório de vida selvagem ou hospedeiro intermediário devido a várias possibilidades de vias de transbordamento, acredita-se que o vírus tenha seu nicho ecológico em reservatório animal (GUDBJARTSSON et al., 2020), por fazer parte do gênero *Betacoronavirus* que é encontrado com bastante frequência em morcegos (RICHARD et al., 2020).

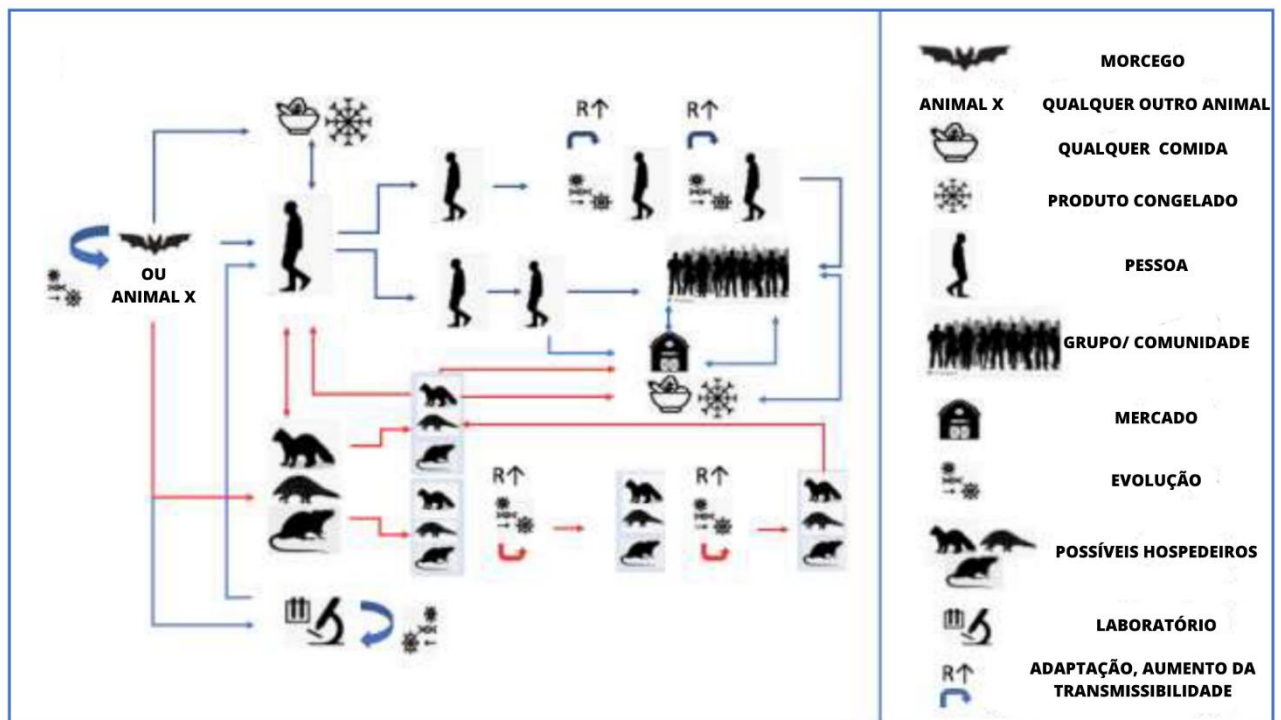
A investigação do surgimento do SARS-CoV-2 em pessoas que transitaram no mercado de Huanan no surgimento dos primeiros casos em 2019, levou em

consideração a exposição de pessoas infectadas advindas de outros locais, a carne contaminada ou demais produtos de consumo alimentar refrigerados ou congelados, como prováveis meios de transmissão do patógeno (GIANOTTI et al., 2021).

O novo coronavírus possivelmente surgiu como resultado de inúmeras mutações que deram ao vírus capacidade de romper a barreira do ciclo interespecies e com auxílio de hospedeiros suscetíveis conseguiram infectar humanos (LU et al., 2020). A teoria mais convincente é a de que os morcegos são os hospedeiros iniciais do vírus, tendo uma distância evolutiva para o SARS-CoV-2 estimada em décadas, necessitando, portanto, de um reservatório, não sendo elucidado ainda, que hospedeiros seriam esses, porém há pesquisas que indicam os pangolins da Malásia (*Manis javanica*) como tais hospedeiros, devido à semelhança entre o sequenciamento metagenômico entre os pangolins e o SARS-CoV-2 (LAM et al., 2020; WONG, 2020).

Como pode ser observado na figura 01, o esquema de introdução do SARS-CoV-2 na população humana através da possibilidade de um reservatório, ocorre por vários animais que se mostram susceptíveis ao novo coronavírus, de forma enzoótica (WHO, 2021c). Ao mesmo tempo com o número crescente de espécies de animais com a presença do SARS-CoV-2, estudos epidemiológicos e sequenciamento genético sugerem que as infecções desses animais ocorreram na maioria das vezes por contato humano-animal. A probabilidade de um reservatório envolvido é considerada alta, porém há necessidade de mais estudos e embasamento científico para tal afirmação (WHO, 2021c).

Figura 01: Esquema de Introdução do SARS-CoV-2 através de um reservatório seguido de transbordamento. Em vermelho as setas indicativas desse cenário.



Fonte: Adaptado do estudo Global das Origens do SARS-CoV-2 convocado pela Organização Mundial de Saúde, 2021.

2.2 Forma de transmissão e sintomatologia em humanos

O vírus é transmitido facilmente através de aerossóis e por contato direto de gotículas do sistema respiratório de pessoa para a pessoa, não sendo bem esclarecida a via de transmissão digestiva. Os assintomáticos também constituem fonte de infecção entre os seres humanos e qualquer indivíduo se torna susceptível a contrair a COVID-19, sendo os idosos, indivíduos com doenças crônicas e imunodeprimidos considerados como grupo de risco principal (ZHANG, 2020).

Há evidências que demonstram que a maior transmissibilidade ocorre de sintomáticos ou de pessoas 48 horas antes da apresentação de sintomas (pré-sintomáticos), devido a grande quantidade de vírus presente sendo eliminados, mesmo que ainda assintomáticos (WHO, 2020).

Os sinais clínicos e sintomas iniciais em humanos são bastante diversificados podendo variar de casos assintomáticos a manifestações leves e graves, sendo desta forma necessário atenção a sintomatologia para classificação e intervenção do paciente que necessite de suporte de hospitalização. A classificação de um caso assintomático é confirmado através de teste laboratorial positivo sem apresentação de sinais ou sintomas. Já um caso leve é considerado através da presença de tosse, coriza ou dor de garganta, podendo apresentar também ageusia, anosmia, calafrios, febre, dor abdominal, diarreia, cefaleia, fadiga e mialgia. Um caso moderado pode apresentar sintomas leves da doença até febre e tosse persistente com piora progressiva com prostração, adinamia, hiporexia e pneumonia. E por fim, um caso grave é caracterizado pela síndrome respiratória aguda grave com presença de dispneia ou desconforto respiratório com saturação de oxigênio menor que 95% ou presença de cianose (BRASIL, 2022).

Ainda há a classificação de caso crítico em pacientes que necessitam de unidades de terapia intensiva devido a complicações como choque séptico, angústia respiratória e pneumonia graves, síndrome associada ao desconforto respiratório, e disfunção múltipla dos órgãos e tecidos (BRASIL, 2022).

2.3 Animais domésticos e a COVID-19

Desde a descoberta e identificação do novo coronavírus, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas no mundo para o entendimento de toda história natural da doença e os animais que possam estar envolvidos na cadeia epidemiológica, seja como hospedeiros, fontes de infecção ou suscetíveis (LUAN et al., 2020).

Em meados de fevereiro de 2020, um cão idoso macho com comorbidades da raça Lulu da Pomerânia, procedente de Hong Kong, testou positivo para SARS-CoV-2 nos exames de diagnóstico moleculares por reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR), e sabidamente seu tutor foi positivo para o novo coronavírus, tratando-se de uma possível transmissão humano-animal. Foram coletadas amostras por *swabs* orais, nasais e retais, todos com resultados considerados fraco positivos, além de sorologia e cultura viral negativa, possivelmente

devido ao curso inicial da doença no momento da coleta. O sequenciamento genético do vírus isolado das pessoas residentes no domicílio e do cão foram bastante semelhantes, indicando que o vírus estava presente no domicílio e pode ter infectado o cão, que se mostrou assintomático, não sendo considerado uma fonte de infecção e liberado da quarentena após dois exames de RT-qPCR negativos (AFCD, 2021; ALMENDROS, 2020).

No início da pandemia, em março do ano de 2020, mais um cão de dois anos de idade, macho, da raça Pastor Alemão, também foi positivo para SARS-CoV-2 através da RT-qPCR, enquanto o outro animal da casa testou negativo, sendo os dois animais assintomáticos, porém o tutor também estava infectado com o vírus causador da COVID-19 (AFCD, 2021; ALMENDROS, 2020).

O Departamento de Agricultura, Pesca e Conservação (AFCD) da China, realizou também no mês de março de 2020 a testagem por RT-qPCR de outros 17 cães e oito gatos de tutores positivos para COVID-19 e que tinham contato próximo com os animais, sendo relatado dois cães e um gato positivos ao exame. É importante reforçar que todos os animais testados não apresentavam sinais clínicos da doença (AFCD, 2021).

Na Bélgica, ainda no início da pandemia, o Serviço Público Federal (FPS) de Saúde Pública, Segurança da Cadeia Alimentar e Meio Ambiente publicou um informe sobre um gato que testou positivo e apresentava sinais sugestivos da COVID-19, como vômito, diarreia e problemas respiratórios, semelhante ao seu tutor que teve diagnóstico positivo após o retorno de uma viagem à Itália. O informe ainda discutiu a possibilidade de semelhança dos sintomas devido à similaridade dos receptores das células respiratórias nos humanos e felinos, assim como destacou a possibilidade da transmissão do homem para o animal de forma acidental, considerando os animais domésticos sem importância epidemiológica na disseminação do vírus e perpetuação do ciclo de transmissão (BRYNER, 2020).

Um estudo chinês, com o objetivo de esclarecer a susceptibilidade dos animais domésticos ao SARS-CoV-2, realizou infecção experimental de cães, gatos e furões por inoculação intranasal com vírus provenientes de ambiente contaminado de Wuhan. Foram infectados experimentalmente cinco gatos isolados em gaiolas, onde dois deles foram eutanasiados no sexto dia após a inoculação e os outros três

continuaram sendo avaliados por 11 dias. Foram utilizados ainda três gatos não infectados experimentalmente em gaiolas próximas aos gatos infectados, como controle. Nos gatos eutanasiados foi encontrado RNA viral nos cornetos nasais, amígdalas e palatos moles, na traqueia e no intestino delgado, sem presença viral em pulmão de nenhum dos gatos eutanasiados. Entre os gatos isolados em gaiolas e avaliados por 11 dias, foi encontrado RNA viral nas fezes em dois gatos a partir do terceiro dia e o outro a partir do quinto dia, sendo todos eles eutanasiados no final. Detectou-se carga viral no palato mole e nas amígdalas de um animal infectado experimentalmente e em palato mole, amígdalas, corneto nasal e traqueia de um gato exposto, evidenciando que houve transmissão de gotículas respiratórias entre esses animais. Os resultados também demonstraram que dois gatos expostos à transmissão não apresentaram nenhuma carga viral nos órgãos pós eutanásia (SHI et al.,2020).

Outro estudo realizado na China, a partir da coleta de 143 amostras de soro de gatos e testadas pelo teste ELISA durante o surto em Wuhan, revelou 14,7% de sororreagentes ao SARS-CoV-2 com titulação variando de 1/20 a 1/1080. Desses animais, três amostras apresentaram reação neutralizante com altos níveis de titulação; sendo esses três animais de tutores positivos, sugerindo a transmissão do vírus do homem para o animal, porém o método não é suficiente para a confirmação da infecção dos gatos pelo vírus causador da COVID-19, visto que a sorologia não confirma a presença do agente e nem o grau de virulência (ZHANG, 2020).

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) reafirma que os seres humanos positivos para SARS-CoV-2 e que possuem animais domésticos, devem restringir o contato com os animais por até 14 dias mesmo não sendo comprovado que os animais transmitam SARS-CoV-2 para humanos. Deve-se evitar, neste período de isolamento, abraçar, beijar, acariciar, dormir e compartilhar comidas com os animais e ainda, se possível, deixar o animal com outro membro sadio da família ou amigo, sempre assegurando boas práticas de higiene e distanciamento social (OIE, 2021).

2.4 Vigilância da notificação de casos

A Vigilância em Saúde (VS) pode ser definida como um processo sistemático contínuo de coleta, análise e disseminação dos dados sobre eventos relacionados à proteção, promoção, prevenção à saúde e controle de riscos, agravos e doenças na população associado aos determinantes de saúde que influenciam no processo saúde-doença com finalidade de redução das vulnerabilidades e morbimortalidade de riscos nos territórios (BRASIL,2018).

A Política Nacional de Vigilância em Saúde (PNVS) orienta a análise da situação de saúde com monitoramento contínuo da população em todo território nacional através de estudos epidemiológicos que identifiquem os indicadores e problemas de saúde para um planejamento que reflita a realidade da população assistida. Ainda menciona que emergências em saúde pública devem compor medidas urgentes de controle e contenção dos riscos, bem como prevenção, de danos e agravos à saúde pública com investigação dos surtos e eventos inusitados com potenciais impactos ambientais (BRASIL,2018).

Devido a situação que a pandemia do novo coronavírus trouxe para o país, foi criado por decreto presidencial o Grupo Executivo Interministerial de Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional e Internacional (GEI-ESPII), com o objetivo de articular, propor e acompanhar medidas de planejamento e enfrentamento com estabelecimento de diretrizes e elaboração de relatórios situacionais frente às emergências de saúde pública a nível nacional e internacional (BRASIL, 2020).

Os vírus respiratórios de importância em saúde pública são monitorados através no Brasil através da vigilância epidemiológica por meio de uma Rede de Vigilância Sentinela de síndrome gripal (SG) e da Vigilância de síndrome respiratória aguda grave (SRAG) em conjunto com os laboratórios centrais de Saúde Pública que através dos casos, hospitalizações e óbitos traçam um perfil epidemiológico dos vírus circulantes e medidas de controle e prevenção. A inclusão do monitoramento da COVID-19 nesta rede de vigilância tem por objetivo fortalecer a resposta a pandemia, objetivando a identificação de forma precoce dos casos com estabelecimento de critério para registro da notificação de casos positivos e suspeitos tanto a nível de serviço público ou privado, estabelecimento de processo de investigações

epidemiológicas para caracterização clínica-epidemiológica traçando-se o perfil de morbimortalidade, medidas de prevenção e controle e comunicação clara e oportuna da COVID-19 no país (BRASIL, 2022).

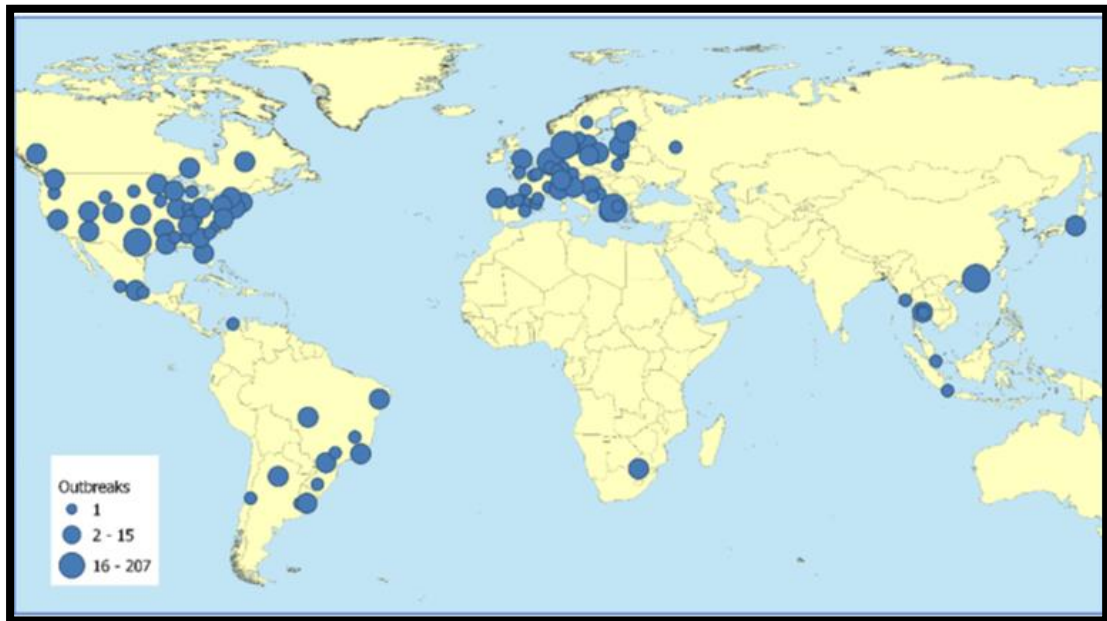
Segundo dados da Organização Mundial de Saúde até o momento foram registrados mais de 396 milhões de casos por COVID-19 com mais de 5 milhões de mortes em decorrência da doença em todo o mundo. O Brasil ocupa a terceira posição mundial com um total de casos acima de 26 milhões, ficando abaixo apenas dos Estados Unidos em relação a quantidade de óbitos pela doença, acumulando um total de mais de 632 mil mortes (WHO, 2022).

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) é uma organização intergovernamental mundial que tem 182 países membros com o objetivo de combater doenças animais. Em relação aos desafios impostos pelo SARS-CoV-2 se faz necessário abordagens inovadoras para combatê-lo, a colaboração intersetorial é imprescindível como resposta dessa crise sanitária com uma rede de especialistas para melhor entendimento das possibilidades de surgimento do novo coronavírus (OIE, 2021a).

O novo coronavírus com seu caráter zoonótico e sua distribuição global faz com que ocorra infecções animais decorrentes de contato próximo entre humanos e animais. O boletim publicado pela OIE e atualizado mensalmente, demonstra a situação global do SARS-CoV-2 nas diversas espécies animais (Figura 2). Atualmente, 625 casos em animais foram relatados no mundo, afetando 17 espécies animais em 32 países (OIE, 2021b).

Ainda os dados atualizados no mês de junho de 2021 do Relatório de Acompanhamento disponibilizado pela OIE, demonstram que foram reportados 79 cães e gatos susceptíveis provenientes de tutores sabidamente positivos com 35 casos positivados no RT-qPCR para o SARS-CoV-2 e um óbito no Brasil, como pode ser observado na tabela 1 (OIE, 2021c).

Figura 02: Distribuição mundial de casos de SARS-CoV-2 em espécies animais relatados à OIE.



Fonte: Imagem do boletim informativo SARS-CoV-2 in animals – situation report 2 da World Organization for Animal Health, (2021).

Tabela 1: Distribuição brasileira de casos de SARS-CoV-2 em gatos e cães

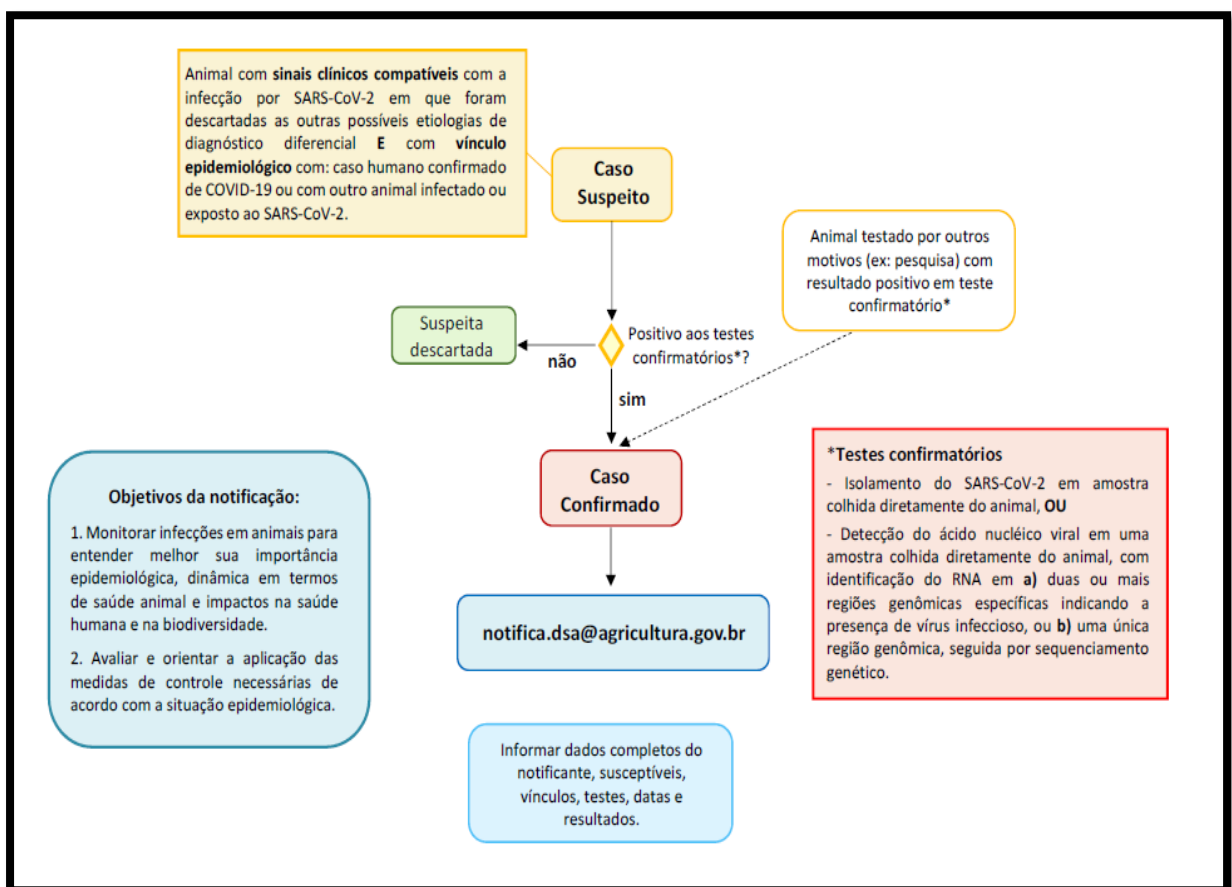
Espécies		Susceptíveis	Casos	Óbitos	Morbidade	Mortalidade
Gatos	Novo	13	3	1	-	-
	Total	40	15	1	37.50	2.50
Cães	Novo	5	2	0	-	-
	Total	39	20	0	51.28	0.00
Total	Novo	18	5	1	-	-
	Total	79	35	1	44.30	1.27

Fonte: Adaptado do Follow-up report 4, World Organization for Animal Health, 2021.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão do governo federal 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), e determinou que os casos de SARS-CoV-2 em animais no Brasil, devem ser notificados à autoridade (Figura 03), conforme

Nota Informativa do MAPA nº 50/2013, uma vez que se enquadra no critério: “notificação também deverá ser imediata para qualquer outra doença animal que não pertença à lista do Anexo desta Instrução Normativa, quando se tratar de doença exótica ou de doença emergente que apresente índice de morbidade ou mortalidade significativo, ou que apresente repercussões para a saúde pública” (BRASIL, 2013).

Figura 03: Esquema de diretrizes e fluxograma de notificação de SARS-CoV-2 ao Serviço Veterinário Oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.



Fonte: Ficha técnica SARS-CoV-2 em animais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2020.

Diante do exposto é necessário uma ação de vigilância integrada entre os serviços humanos e animais por intermédio de uma abordagem sob a ótica da saúde única, que pode ser definida através de um elo entre a saúde da população e saúde dos animais juntamente com o equilíbrio do meio ambiente que compartilham, sendo

um tema discutido de forma mais frequente na atualidade com o grande crescimento populacional e exploração ambiental com desmatamentos para práticas agrícolas ou pecuaristas que influenciam alterações climáticas causando um desequilíbrio entre o meio ambiente, animais e humanos e muitas vezes o surgimento de patógenos zoonóticos, como por exemplo, o SARS-Cov-2 (CDC, 2020).

Para uma atuação em saúde única efetiva se faz necessário que as ações e colaborações sejam multiprofissionais, interdisciplinares e intersetoriais devido à complexidade dos aspectos multicausais que envolvem a tríade (homem-animal-ambiente) no processo saúde-doença (TRILLA, 2020). Em relação a pandemia atual causada pelo novo coronavírus essas colaborações e abordagens visam o fortalecimento das discussões dos condicionantes da saúde entre seres humanos, animais e meio ambiente em todos os níveis de atenção utilizando-se das expertises de forma colaborativa de todos os profissionais envolvidos no enfrentamento da COVID-19 (BONILLA, 2020)

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Realizar a vigilância de SARS-CoV-2 em animais de companhia na Região Metropolitana do Recife, estado de Pernambuco, Brasil.

3.2. Objetivos específicos

- I. Realizar o diagnóstico laboratorial e monitorar, longitudinalmente, a infecção em animais (cães e gatos) de tutores positivos para SARS-CoV-2, com diagnóstico laboratorial confirmado pelo Sistema Único de Saúde;
- II. Notificar órgãos oficiais de vigilância quanto aos casos positivos diagnosticados;
- III. Comparar e determinar as características ambientais e outros fatores associados à infecção nos animais positivos.

4. METODOLOGIA

Foi realizado um estudo longitudinal prospectivo incluindo 16 cães e 15 gatos domésticos, cujo tutor estava em isolamento domiciliar, com diagnóstico laboratorial confirmado para SARS-CoV-2 por RT-qPCR ou resposta imunológica apenas por IgM (caracterizando doença ativa) pelo teste de imunocromatografia (teste rápido), até sete dias da data do diagnóstico, residente na Região Metropolitana do Recife (RMR).

Os participantes foram selecionados por demanda espontânea, com a divulgação da pesquisa em redes sociais, canais de divulgação das instituições de pesquisa, universidades e laboratórios envolvidos e outras mídias eletrônicas. Ainda todos os participantes preencheram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e responderam um questionário de televigilância, com a finalidade de determinar as características ambientais e outros fatores associados à infecção nos animais. As variáveis pesquisadas no questionário estavam relacionadas às características do ambiente onde viviam os animais, sinais clínicos nos animais e seus tutores no momento da coleta do material biológico e ao contato próximo entre os tutores e seus animais.

A pesquisa foi autorizada pelos Comitê de Ética em Pesquisa Humana (Parecer: 4.054.208) e Comitê de Ética no Uso de Animais (Parecer: 4879280420). Para análise da transmissão de SARS-CoV-2 entre humanos e seus animais durante a visita domiciliar para coleta das amostras biológicas também foi realizado a anamnese e aplicado o questionário (anexo I) *in loco* para avaliação do quadro clínico do animal e avaliação ambiental. De cada animal foram coletados *swabs* orofaríngeo e retal (para RT-qPCR), além de sangue total (para diagnósticos diferenciais) e sangue para obtenção de soro, levando em conta a utilização de equipamentos de proteção individual pelos pesquisadores no momento da coleta.

Para fins de análise, os animais que tinham ao menos um *swab* positivo à RT-qPCR e/ou sorologia positiva foram considerados positivos para COVID-19. As amostras obtidas através de *swab* foram 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 processadas através do método de RT-qPCR.

As amostras dos *swabs* foram avaliadas quanto à presença específica para SARS-CoV-2 por isolamento de RNA utilizando kit comercialmente disponível (Maxwell® RSC simplyRNA Tissue Kit, Promega Co., Madison, WI, USA, de acordo com as instruções do fabricante. O RT-qPCR foi realizado em um termociclador comercial (QuantStudio™ 1 – 96-Well 0.2 mL Block, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). O ciclismo consistia em um estágio de manutenção de 50°C, por 15 min e 95°C por 2 min, seguido por 45 ciclos de 95°C por 3 segundos e 55°C por 30 s. Um valor limite de ciclo (valor CT) inferior a 40 foi definido como um resultado de teste positivo. Todas as amostras foram testadas em duplicata e só foram considerados positivos para SARS-CoV-2 quando pelo menos dois genes foram amplificados. Os resultados dos testes, positivos ou negativos, foram informados aos tutores através de contato telefônico e pela emissão de laudo eletrônico em caso dos positivos.

Os dados obtidos dos questionários da televigilância, da anamnese e os resultados laboratoriais foram tabulados em um banco de dados colaborativo em nuvem e posteriormente analisados para obtenção de medidas de efeito e fatores relacionados por modelo de riscos proporcionais, através do cálculo do OR e significância estatística $p < 0,05$ e IC 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas amostras por swab orofaríngeo e retal de 31 animais, entre eles 16 cães e 15 gatos na região metropolitana do Recife, estado de Pernambuco, com diagnóstico confirmado do SARS-CoV-2 em duas amostras felinas, como observado na tabela 02, cujo relato de caso desses animais está detalhado no capítulo I desse manuscrito, em artigo já publicado.

Tabela 02. Número total (N^o) e Percentual (%) de amostras coletadas por swab orofaríngeo e retal e amostras positivas para SARS-CoV-2 por RT-qPCR. em cães e gatos

Espécie	Amostras coletadas		Amostras positivas	
	N ^o *	%**	N ^o *	%**
Cães	16	51,61	-	0,0
Gatos	15	48,39	2	100,0
Total	31	100,0	2	100,0

*N^o: Número total; **%: Porcentagem

De acordo com a orientação contida na Instrução Normativa (IN) nº 50/2013 do MAPA (BRASIL, 2013) os casos detectados de SARS-CoV-2 nos dois felinos foram notificados via e-mail com as informações necessárias como descrito nas tabelas 3 e 4, de acordo com o modelo disponibilizado na respectiva IN. A notificação é obrigatória e imediata por se tratar de uma doença emergente com morbimortalidade importante em humanos, além de que resultados positivos em animais podem gerar medidas inadequadas comprometendo o bem-estar animal com impacto negativo na biodiversidade ou comercialização internacional, por interpretações equivocadas, entretanto, apesar da IN exigir a notificação, não são observadas ações intersetoriais entre os Ministérios da Agricultura e Saúde, como por exemplo, um fluxograma ou plano de ação, diante dos casos de COVID-19, sob a ótica da Saúde Única, que

reconhece que a saúde dos seres humanos, animais, plantas e o ambiente está interconectado e interdependente (CARNEIRO E PETTAN-BREWER, 2021). .

Tabela 03: Ficha Técnica notificada ao serviço veterinário oficial do animal (RE02F*)

1. Dados do animal	Felino – Fêmea – 11 meses - Sem ração definida - Castrada
2. Dados da população exposta	Unidade domiciliar – Moreno, Pernambuco Susceptíveis: 2 felinos / 3 mulheres adultas e 1 homem adulto
3. Resultado/ Laudo de diagnóstico	TECSA laboratórios – Tecnologia em sanidade animal Três adultos da casa com resultado positivo de amostra de <i>Swab</i> de nasofaringe por RT-PCR no dia 04/12/2020 Tipo de amostra colhida - <i>Swab</i> orofaríngeo e retal, coletado por Médico Veterinário Prova laboratorial realizada – RT-PCR Data do resultado laboratorial – No dia 04/12/2020 foram realizadas coletas de <i>Swab</i> orofaríngeo e retal dos dois felinos do domicílio. Um dos gatos testou positivo no dia 13/01/2021
4. Informações clínicas do animal	Animais sem sintomatologia clínica no momento da coleta. São animais com contato próximo ao tutor, dormem na cama, recebem beijos e abraços constantes. Animal em acompanhamento - Sem mortalidade Sem diagnóstico de outras doenças ou comorbidades no animal
5. Informações epidemiológicas	Vínculo epidemiológico com caso humano confirmado – Sim, proprietário com resultado positivo no dia 04/12/2020. Coleta de amostra do gato no dia 04/12/2020, com resultado positivo na RT-PCR. Tipo de contato – Gato de companhia, contato próximo Informação da confirmação do caso humano pelo órgão de saúde pública – Humano testado no Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN/PE)

* RE02F: Amostra de Recife, felino nº 02

Tabela 04: Ficha Técnica notificada ao serviço veterinário oficial do animal (RE04F*)

1. Dados do animal	Felino – Macho – 1 ano - Sem ração definida - Castrado
2. Dados da população exposta	Unidade domiciliar – Recife, Pernambuco Susceptíveis: 1 felino / 3 cães / 1 mulher adulta e 1 homem adulto
3. Resultado/ Laudo de diagnóstico	TECSA laboratórios – Tecnologia em sanidade animal Um homem adulto e uma mulher adulta da casa com resultado positivo de amostra de <i>Swab</i> de nasofaringe por RT-PCR no dia 02/12/2020 e 07/12/2020, respectivamente Tipo de amostra colhida - <i>Swab</i> orofaríngeo e retal, coletado por Médico Veterinário Prova laboratorial realizada – RT-PCR Data do resultado laboratorial – No dia 07/12/2020 foram realizadas coletas de <i>Swab</i> orofaríngeo e retal de um felino e um cão do domicílio. Apenas o felino testou positivo no dia 13/01/2021
4. Informações clínicas do animal	Animais sem sintomatologia clínica no momento da coleta. São animais com contato próximo ao tutor, dormem na cama, recebem beijos e abraços constantes. Animal em acompanhamento - Sem mortalidade Sem diagnóstico de outras doenças ou comorbidades no animal
5. Informações epidemiológicas	Vínculo epidemiológico com caso humano confirmado – Sim, primeiro proprietário com resultado positivo no dia 02/12/2020. Coleta de amostra do gato no dia 07/12/2020, com resultado positivo na RT-PCR. Tipo de contato – Gato de companhia, contato próximo Informação da confirmação do caso humano pela rede de laboratório da Unimed Recife

* RE04F: Amostra de Recife, felino nº 04

Os dados coletados no questionário de diagnóstico situacional do ambiente envolvendo a convivência entre humanos e animais estavam relacionados às variáveis ambientais, humanas e da relação humano-animal, como observado nas tabelas 05, 06 e 07.

Tabela 05 Frequência absoluta (F.A.) e Frequência Relativa (F.R.) das respostas das variáveis relacionadas ao ambiente em residências de tutores positivos para COVID-19, em felinos com resultados positivos e negativos ao Exame de RT-qPCR, na Região Metropolitana do Recife/PE, no ano de 2020 e 2021.

Variáveis ambientais	Exame de RT-qPCR*			
	Positivo		Negativo	
	F.A.**	F.R.***(%)	F.A.	F.R. (%)
Tipo de residência				
Casa	02	18,19	09	81,81
Apartamento	00	00,00	04	100,00
Possui área externa?				
Sim	02	16,67	10	83,33
Não	00	00,00	03	100,00
Tipo de área externa				
Quintal semi ou totalmente calçado	01	14,29	06	85,71
Sacada	01	20,00	04	80,00
Possui abrigo para animais?				
Sim	00	00,00	03	100,00
Não	02	16,67	10	83,33
Frequência de limpeza da casa				
Diariamente				
Sim	01	14,29	06	85,71
Não	01	12,50	07	87,50
a cada 7 dias				
Sim	01	16,67	05	83,33
Não	01	14,29	08	85,71
a cada 15 dias				
Sim	00	00,00	01	100,00
Não	02	15,39	12	92,30
Forma que realiza a limpeza				
Água sanitária				
Sim	01	16,67	05	83,33
Não	01	14,29	08	85,71
Produtos saneantes				
Sim	01	12,50	07	87,50
Não	01	14,29	06	85,71
Sabão e água sanitária				
Sim	00	00,00	01	100,00
Não	02	15,39	12	92,30

* RT-qPCR: Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real; **: F.A.: Frequência Absoluta e ***F.R.;; Frequência Relativa

Tabela 06. Frequência absoluta (F.A.) e Frequência Relativa (F.R.) das respostas das variáveis relacionadas aos humanos em residências de tutores positivos para COVID-19, em felinos com resultados positivos e negativos ao Exame de RT-qPCR, na Região Metropolitana do Recife/PE, no ano de 2020 e 2021.

Variáveis humanas	Exame de RT-qPCR*			
	Positivo		Negativo	
	F.A**	F.R*** (%)	F.A	F.R (%)
Está doente no momento da entrevista?				
Sim	02	40,00	03	60,00
Não	00	00,00	10	100,00
Fez quarentena antes do diagnóstico?				
Sim	02	15,38	11	84,61
Não	00	00,00	02	100,00
Apresentou sintomas?				
Sim	01	8,33	11	91,67
Não	01	33,33	02	66,67

* RT-qPCR: Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real; **: F.A.: Frequência Absoluta e ***F.R.:. Frequência Relativa

Tabela 07. Frequência absoluta (F.A.) e Frequência Relativa (F.R.) das respostas das variáveis relacionadas a interação humano-animal em residências de tutores positivos para COVID-19, em felinos com resultados positivos e negativos ao Exame de RT-qPCR, na Região Metropolitana do Recife/PE, no ano de 2020 e 2021.

Variáveis relação humano-animal	Exame de RT-qPCR*			
	Positivo		Negativo	
	F.A**	F.R*** (%)	F.A	F.R (%)
Adotou animal pós diagnóstico de COVID-19				
Sim	00	00,00	01	100,00
Não	02	14,29	12	85,71
Onde o animal passa a maior parte do tempo?				
Solto dentro de casa	02	14,29	12	85,71
Solto igualmente quintal e dentro de casa	00	00,00	01	100,00
Existem barreiras físicas para impedir que o animal vá para a rua sozinho?				
Sim	02	16,67	10	83,33
Não	00	00,00	03	100,00
Onde o animal dorme?				
Dentro de casa	02	14,29	12	85,71
Quintal	00	00,00	01	100,00
O animal tem acesso a mesa, cama, sofá, poltrona?				
Sim	02	14,29	12	85,71
Não	00	00,00	01	100,00
Tem o hábito de alisar o animal, acariciar ou beijar?				
Sim	02	13,33	13	86,67
Não	00	00,00	00	00,00
Após o contato com o animal, costuma lavar as mãos?				
Sim	00	00,00	08	100,00
Não	02	28,58	05	71,42
Pessoas dormem com o animal?				
Sim	02	22,22	07	77,78
Não	00	00,00	06	100,00
Percebeu algum sinal de resfriado, asse ou diarreia no animal?				
Sim	00	00,00	01	100,00
Não	02	14,29	12	85,71

* RT-qPCR: Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real; **: F.A.: Frequência Absoluta e ***F.R.;; Frequência Relativa

A análise dos resultados de associação entre os fatores de interação homem-animal-ambiente através do *Odds Ratio* (OR), variou de 0,18 a 1,6, mostrando riscos que variam de 18 a 60% maior de adoecimento pela COVID-19 nos felinos de tutores sabidamente positivos, relacionados à variáveis ambientais que envolvem a

residência que possui área externa, frequência de limpeza da casa, forma como o tutor realiza a limpeza e se o mesmo estava doente no momento da entrevista com presença de sintomatologia, entretanto pelo intervalo de confiança e valor de p nenhuma das variáveis demonstrou associação significativa conforme os resultados observados na tabela 08.

Vale ressaltar que apesar de não significativas, nos dois casos de amostras de felinos diagnosticados com COVID-19, ambos tutores eram profissionais médicos-veterinários, os animais viviam dentro de casa e não tinham acesso à rua devido a presença de barreiras físicas que os impediam de sair, dormiam dentro de casa e tinham acesso a sofá, cama e outros móveis, os tutores possuíam hábitos de alisar, acariciar, beijar e dormir com os animais, além de não lavarem as mãos após o contato com os animais, comportamentos esses sugestivos de um contato muito íntimo e próximo, que pudesse favorecer a transmissão do vírus dos mesmos para os seus gatos, devido ao contato íntimo, como ocorre a transmissão do SARS-Cov-2, entre seres humanos.

Tabela 08. Análise estatística da associação entre os fatores de interação homem-animal-ambiente coletadas nos questionários de televigilância em residências de tutores positivos para COVID-19 na Região Metropolitana do Recife/PE, no ano de 2020 e 2021.

Variáveis	OR*	Intervalo de confiança (95%)	Valor de p**
Tipo de área externa	0.6667	0.0317 a 14.0339	0.7942
Frequência de limpeza da casa (diariamente)	1.1667	0.0593 a 22.9378	0.9192
Frequência de limpeza da casa (a cada 7 dias)	1.6000	0.0806 a 31.7725	0.7579
Forma que realiza a limpeza (água sanitária)	1.6000	0.0806 a 31.7725	0.7579
Forma que realiza a limpeza (produtos saneantes)	0.8571	0.0436 a 16.8523	0.9192
Apresentou sintomas?	0.1818	0.0078 a 4.2637	0.2896

*OR: Odds ratio; **p: probabilidade

De acordo com a recomendação do guia de vigilância epidemiológica COVID-19 do Ministério da Saúde, a restrição de contato entre pessoas infectadas diminui a chance de transmissão do novo coronavírus orientando procedimentos de

distanciamento social e/ou isolamento associado a uma boa ventilação dos ambientes previnem a transmissão (BRASIL, 2022). Esta orientação deve ser extrapolada para o contato com animais, como recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2021a) e que se pode observar que fatores de interação desprotegida com o animal se apresentou como maior risco de transmissão do vírus entre o humano infectado e seu felino, corroborando com Ruiz-Arrondo et al. (2021) que realizaram um estudo com 23 animais, onde apenas um felino foi positivo através de *swab* orofaríngeo por RT-qPCR, mesmo o animal sendo portador de comorbidades se apresentou assintomático igualmente nos positivos da RMR.

Um outro fator limitante verificado neste estudo e por outros autores, foi o pequeno número de animais positivos reforçando a possibilidade de viés nos resultados em relação às análises de fatores de risco, no entanto as amostras foram coletadas nos epicentros da doença com altas medidas de contenção, bloqueio, confinamento e distanciamento social tornando estes dados relevantes, quando se verifica os hábitos dos tutores positivos para COVID-19 com seus animais de estimação (RUIZ-ARRONDO et al., 2021). Outro estudo descrito na França com 22 gatos e 11 cães provenientes de tutores suspeitos ou positivos para a COVID-19 tiveram como resultado apenas um gato positivo em RT-qPCR e sorologia com sinais respiratórios e digestivos leves e ainda sequenciamento genético idêntico aos circulantes nos franceses naquela época, evidenciando uma infecção natural entre humano e animal (SAILLEAU et al., 2020).

Dois estudos realizados na Tailândia evidenciaram presença de animais positivos também por meio de RT-qPCR e sorologia em cães e gatos provenientes de clínicas particulares e áreas consideradas de alto risco a exemplo de mercados (JAIRAK et al., 2021; JAIRAK et al., 2022) A transmissão do SARS-CoV-2 de visons para gatos, foi relatada em uma fazenda na Holanda evidenciando a transmissão interespecie que também pode contribuir para potencial disseminação do SARS-CoV-2 e deve ser considerado (VANAART et al., 2021).

Lopes et al. (2020) após uma análise sistemática em gatos relataram que a transmissão do vírus SARS-CoV-2 de humanos para felinos possivelmente ocorra devido a receptores celulares bastante parecidos com os humanos, tornando os felinos mais sensíveis a infecção do SARS-CoV-2, entretanto mais estudos e monitoramento contínuo dos animais são indispensáveis. Cabe ainda ressaltar que, a

semelhança de sequência do genoma viral do SARS-CoV-2 de uma amostra de um gato positivo e seus tutores também positivos com resultado de 99,4% de identidade genética, já foi observada como um dos primeiros relatos na América Latina, mostrando o envolvimento do contato próximo entre humanos e animais (CARLOS et al., 2021), como verificado neste estudo, porém ainda sem a caracterização genética

Tais achados, associados aos verificados neste estudo, apesar do reduzido número de amostras positivas, demonstram a possibilidade de transmissão viral dos tutores para os seus animais de estimação e evidenciam a necessidade de ações efetivas intersetoriais e integradas de controle da doença pelos órgãos de saúde pública relacionados, não só à vigilância epidemiológica dos casos humanos, como também à vigilância ambiental em saúde, responsável pelo monitoramento e controle de zoonoses em animais, assim como a necessidade da criação de fluxogramas nas secretarias municipais de saúde, facilitando a comunicação entre os gestores de saúde e a ação efetiva e integrada entre a Vigilância em Saúde e Atenção Primária em Saúde, como preconizado nas Políticas Nacionais de Vigilância e Atenção Básica em Saúde (BRASIL, 2017; BRASIL, 2018), para a promoção da saúde humana.

É importante que as medidas de emergência saúde pública sejam direcionadas para a harmonia e acolhimento do bem estar animal e humano, visto que uma preocupação frequente dos tutores de pets seria onde e como deixá-los em caso de adoecimento e hospitalização por COVID-19 (APPLEBAUMA et al. 2020), associado a um planejamento familiar que possa reduzir o risco do contato entre humanos infectados e seus animais através do recebimento de cuidados na ausência do tutor, priorizando o bem estar animal com atendimento das suas necessidades (RAUKTIS e HOY-GERLACH, 2020; VINCENT et al., 2020).

Os resultados encontrado por Hosie et al (2021) em dois felinos demonstram que a presença do SARS-CoV-2 pode se apresentar com sintomatologia respiratória com formas leves a graves, contrariamente ao observado neste estudo em que os animais não apresentavam sinais clínicos e que as boas práticas de prevenção, como higiene das mãos antes e após o contato com os animais, assim como o uso de máscaras e distanciamento dos animais quando em contato com os mesmos, podem favorecer a redução da transmissibilidade do vírus durante este contato humano-animal, destacando, ainda a importância de uma vigilância em saúde por organizações de saúde pública em infecções zoonóticas.

Alguns estudos já publicados na literatura científica demonstram que o tempo de vida do vírus depende da superfície em que se encontra, sendo mais duradouro em materiais de plástico e aço (72 horas), seguido de papelão (24 horas), cobre e demais metais (4 horas) e poeira (2,5 horas). A realização de limpeza e desinfecção das superfícies e ambientes é uma medida importante para interrupção da cadeia de transmissão do SARS-CoV-2, sendo necessário se atentar a frequência e produtos a serem utilizados (KAMPF et al, 2020, WHO, 2020d). Neste estudo se observou que quanto maior o intervalo de tempo na limpeza do ambiente, maior a razão de chances para o risco, bem como a presença do uso de água sanitária isoladamente no processo de limpeza ou utilização isolada de saneantes e sabão interferiram diretamente no percentual de risco.

A ausência de confirmação em relação aos animais que foram o elo para desencadeamento da pandemia e a relação de transmissibilidade entre animais e humanos sugerem que o vírus quando transmitido de humanos para animais perca a força de reinfetar seres humanos, sendo a rota humano-humano a principal manutenção do momento pandêmico, porém a vigilância, monitoramento e rastreamento do SARS-CoV-2 em animais se faz necessária visto que o vírus infecta uma grande variedade de hospedeiros animais, podendo ainda ser desconhecido a sua importância na infecção de humanos, tornando imprescindível um sistema de vigilância efetivo nos animais domésticos e selvagens (SHARUN et al., 2021).

A partir dos achados nesta pesquisa, se observa a necessidade de outros estudos e um aprofundamento sobre o tema, por se tratar de uma doença de ocorrência relativamente recente em animais e ainda com muitas lacunas a serem respondidas, principalmente relacionadas à epidemiologia e o papel dos animais domésticos diante da infecção por COVID-19. Ainda é preciso reforçar a importância sobre a divulgação das pesquisas já relacionadas ao envolvimento de cães e gatos na cadeia de transmissão, evitando assim, propagação errônea de informações entre a população e conseqüente aumento no número de abandono animal por equívocos nas interpretações da cadeia de transmissão do vírus.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa detectou a presença do vírus do SARS-CoV-2 em dois felinos assintomáticos através de RT-qPCR de *swabs* orofaríngeo e retal demonstrando a transmissão de humanos para felinos possivelmente por contato próximo com seus animais, enfatizando a necessidade de divulgação de informações de restrição de contato e isolamento social em casos positivos de COVID-19 com os pets.

A vigilância do SARS-CoV-2 necessita de um esforço de medidas colaborativas com envolvimento de todos os setores da sociedade com enfoque na saúde única para melhor entendimento da dinâmica de ocorrência da doença associado a mais estudos relacionados a influência da transmissão do novo coronavírus entre humanos e animais, sem nenhum estudo que comprove que o inverso ocorra.

A criação e articulação de políticas públicas que englobem um olhar diferenciado para o trabalho multiprofissional e interdisciplinar com a junção dos diversos saberes acerca do equilíbrio entra a saúde humana, animal e do meio ambiente poderá evitar novas pandemias e controle da atual.

7. REFERÊNCIAS

- AFCD. Agriculture, Fisheries and Conservation Department. News related to COVID-19 and pet animals. Disponível em: https://www.pets.gov.hk/english/highlights/files/COVID19_PR_Updated_Page_Bilingual_0401.pdf. Acesso em: 04 set 2021.
- ALMENDROS A. Can companion animals become infected with Covid-19? *Vet Record*. 2020 Mar; 186: 388-389.
- APPLEBAUM, J.W.; PEEK, C.W.; ZSEMBIK, B.A.; EXAMINING, U.S. pet ownership using the General Social Survey. *Soc. Sci. J.* 2020:1–10. doi: 10.1080/03623319.2020.1728507.
- BONILLA, A. D. K.; DHAMA, K.; RODRIGUEZ, M. A. J. Revisiting the one health approach in the context of COVID-19: a look into the ecology of this emerging disease. *Adv Anim VetSci*. 2020;8(3):234-7. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2020/8.3.234.237>
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 50, de 24 de setembro de 2013. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/31061237/do1-2013-09-25-instrucao-normativa-n-50-de-24-de-setembro-de-2013-31061233. Acesso em 14 set 2021.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Institucional. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/acesso-a-informacao/institucional>. Acesso em: 14 set 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução MS/CNS nº 588, de 12 de julho de 2018. Fica instituída a Política Nacional de Vigilância em Saúde (PNVS), aprovada por meio desta resolução. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília (DF), 2018 ago 13; Seção 1:87.*
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.436, de 21 de setembro de 2017. Aprova a Política Nacional de Atenção Básica, estabelecendo a revisão de diretrizes para a organização da Atenção Básica, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017
- BRASIL. Ministério da Saúde. Coronavírus (COVID-19). Sobre a doença. 2020a. Disponível em: <https://coronavirus.saude.gov.br/sobre-a-doenca>. Acesso em 02 out 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº 10.211, de 30 de janeiro de 2020. Dispõe sobre o Grupo Executivo Interministerial de Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional e Internacional. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília (DF), 2020 jan 31.*
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica: emergência de saúde pública de importância nacional pela doença pelo coronavírus 2019 – covid-19 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 131 p.: il.
- BRYNER, J. Cat infected with COVID-19 from owner in Belgium. *Live Science*. Disponível em: <https://www.livescience.com/cat-infected-covid-19-from-owner.html>. Acesso em: 03 abr 2021.

Carlos RSA, Mariano APM, Maciel BM, et al. First genome sequencing of SARS-CoV-2 recovered from an infected cat and its owner in Latin America. *Transbound Emerg Dis.* 2021;68:3070–3074. <https://doi.org/10.1111/tbed.13984>

CARNEIRO, L. A.; PETTAN-BREWER, C. One Health: Conceito, História e Questões Relacionadas – Revisão e Reflexão. In: MIRANDA, A. M. M (org.). *Pesquisa em saúde & ambiente na Amazônia: perspectivas para sustentabilidade humana e ambiental na região.* Editora Científica Digital. 1. Ed. Guarujá. SP. 2021. p. 219 – 240. Doi. 10.37885/210504857. Acesso em 17 fev 2022.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention Saving Lives By Taking a One Health Approach Atlanta: Centers for disease control and prevention; 2020. Disponível em: https://stacks.cdc.gov/view/cdc/49400/cdc_49400_DS1.pdf?. Acesso em: 10 jan 2022.

CUI, J.; LI, F.; SHI-LI, Z. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(3):181-92. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>

CUTLER, S.J.; FOOKS, A. R.; POEL, W. H. 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>

DODDS, W. J. Coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19) and Companion Animal Pets. *Journal of Immunology and Allergy*, v. 1, n. 2, p. 1-3,. 2020.

GIANOTTI, R.; BARBERIS, M.; FELLEGARA, G.; GALVAN-CASAS, C.; GIANOTTI, E. (2021). COVID-19 related dermatosis in November 2019. Could this case be Italy's patient zero? *Br J Dermatol.*

GORBALENYA, A.E.; BAKER, S.C.; BARIC, R.S.; GROOT, R.J.; DROSTEN, C.; GULYAEVA, A.A.; HAAGMANS, B.L.; LAUBER, C.; LEONTOVICH, A.M.; NEUMAN, B.W.; PENZAR, D.; PERLMAN, S.; POON, L.L.M.; SAMBORSKIY, D.; SIDOROV, I.A.; SOLA, I.; ZIEBUHR, J. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group. **BioRxiv.** doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862>

GOUMENOU, M.; SPANDIDOS, D.A.; TSATSAKIS, A. Possibility of transmission through dogs being a contributing factor to the extreme Covid-19 outbreak in North Italy. *Molecular Medicine Reports*, v. 21, n. 6, p. 2293-2295, 2020. Disponível em: doi: 10.3892/mmr.2020.11037.

GUAN, Y. et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302, 276–278 (2003)

GUDBJARTSSON, D.F.; HELGASON, A.; JONSSON, H.; MAGNUSSON, O.T.; MELSTED, P.; NORDDAHL, G.L. et al. (2020). Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic Population. *N Engl J Med* 382, 2302-2315.

HEMIDA, M. G. et al. Middle East Respiratory Syndrome (MERS) coronavirus seroprevalence in domestic livestock in Saudi Arabia, 2010 to 2013. *Euro. Surveill.* 18, 21–27 (2013).

HOSIE, M. J.; EPIFANO, I.; HERDER, V.; ORTON, R. J.; STEVENSON, A.; JOHNSON, N. et al. Detection of SARS-CoV-2 in respiratory samples from cats in the UK associated with human-to-cat transmission. *Vet Rec.* 2021;e247. <https://doi.org/10.1002/vetr.247>

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV 9th Report (2011). Positive Sense RNA Viruses (2011) - Positive Sense RNA Viruses. Coronaviridae – Figures. Taxonomy - Then and Now. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/223/coronaviridae-figures. Acesso em: 02 fev 2022.

ITHETE, N. L. et al. Close relative of human Middle East respiratory syndrome coronavirus in bat, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1697–1699 (2013).

Jairak, W., Charoenkul, K., Chamsai, E., Udom, K., Chaiyawong, S., Bunpapong, N., Boonyapisitsopa, S., Tantilertcharoen, R., Techakriengkrai, N., Surachetpong, S., Tangwangvivat, R., Suwannakarn, K., & Amonsin, A. (2021). First cases of SARS-CoV-2 infection in dogs and cats in Thailand. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/tbed.14383>

Jairak, W., Charoenkul, K., Chamsai, E., Udom, K., Chaiyawong, S., Hangsawek, A., Waenkaew, S., Mungaomklang, A., Tangwangvivat, R., & Amonsin, A. (2022). Survey of SARS-CoV-2 in dogs and cats in high-risk areas during the second wave of COVID-19 outbreak, Thailand. *Zoonoses and Public Health*, 00, 1–9. <https://doi.org/10.1111/zph.12907>

KAMPF, G.; TODT, D.; PFAENDER, S.; STEINMANN, E.; (2020). Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of Hospital Infection*. 104, 246-251.

KAN, B. et al. Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. *J. Virol.* 79, 11892–11900 (2005).

Khan Sharun, Kuldeep Dhama, Abhijit M. Pawde, Christian Gortázar, Ruchi Tiwari, D. Katterine Bonilla-Aldana, Alfonso J. Rodriguez-Morales, José de la Fuente, Izabela Michalak & Youssef A. Attia (2021): SARS-CoV-2 in animals: potential for unknown reservoir hosts and public health implications, *Veterinary Quarterly*, DOI: 10.1080/01652176.2021.1921311

KSIAZEK, T. G. et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1953–1966 (2003).

LAM, T. T.Y.; SHUM, M. H. H.; ZHU, H.C.; TONG, Y. G.; NI, X.B.; LIAO, Y.S. et al. Identifying SARS-Cov-2 related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* 2020 Mar; 1-5. doi: 10.1038/s41586-020-2169-0.

LANA, R. I. M. et al. Emergência do novo coronavírus (SARS-CoV-2) e o papel de uma vigilância nacional em saúde oportuna e efetiva. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 36, n. 3, p. 01-05, 2020. DOI: 10.1590/0102-311x00019620. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v36n3/1678-4464-csp-36-03-e00019620.pdf>. Acesso em: 09 de abr. 2020.

LAU, S. K. et al. Genetic characterization of Betacoronavirus lineage C viruses in bats reveals marked sequence divergence in the spike protein of pipistrellus bat coronavirus HKU5 in Japanese pipistrelle: implications for the origin of the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 87, 8638–8650 (2013).

LAU, S. K. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 14040–14045 (2005).

- LOPES, O. F. M.; GOMES, N. R. S.; FREITAS, D. R. J.; EVANGELISTA, L. S. M. COVID-19 e os animais domésticos: há alguma evidência de relação entre eles? *J. Health Biol Sci.* 2020;8(1):1-6. doi: 10.12662/2317-3219jhbs.v8i1.3225.p1-6.2020
- LU, R.; ZHAO, X.; LI, J.; NIU, P.; YANG, B.; WU, H. et al. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020 Fev; 395(10224): 565-574.
- LUAN, J.; LU, Y.; JIN, X.; ZHANG, L. Spike protein recognition of mammalian ACE2 predicts the host range and an optimized ACE2 for SARS-CoV-2 infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Mar. pii: S0006-291X(20)30526-X. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.047.
- MASTERS, P. S.; PERLMAN, S. in *Fields Virology Vol. 2* (eds Knipe, D. M. & Howley, P. M.) 825–858 (Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
- MATSUDA, T.; SUZUKI, H.; OGATA, N. (2002). Phylogenetic analyses of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 reflected the several routes of introduction to Taiwan, the United States, and Japan. arXiv 08802.
- MATTAR, S.; GONZÁLEZ, M. Zoonotic emergence of coronavirus: a potential public risk for Latin America. *Rev MVZ Cordoba.* 2018;23(3):6775-7. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1408>
- MORAIS, H. A. O novo coronavírus e os animais de companhia – Atualização de 1 de junho de 2020. Disponível em: <<https://revistaclinicaveterinaria.com.br/blog/covid-19-animais-de-companhia-atualizacao-1-6-2020/>>. Acesso em 25 maio 2020.
- OIE. World Organisation for Animal Health. Follow-up report 4. The event is ongoing. Weekly follow-up reports will be submitted. 2021c. Disponível em: <https://wahis.oie.int/#/report-info?reportId=34358>. Acesso em: 12 set 2021.
- OIE. World Organization for Animal Health. Questions and Answers on the 2019 Coronavirus Disease (COVID-19). 2021a. Disponível em: <<https://www.oie.int/en/scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/questions-and-answers-on-2019novel-coronavirus/>>. Acesso em: 03 ago 2021.
- OIE. World Organization for Animal Health. SARS-CoV-2 in animals – situation report 8. 2021b Disponível em: <https://www.oie.int/en/what-we-offer/emergency-and-resilience/covid-19/#ui-id-3>. Acesso em: 03 fev 2022.
- OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. Folha Informativa-COVID 19. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875>. Acesso em: 02 out 2020.
- RAUKTIS, M. E.; HOY-GERLACH, J. Animal (non-human) companionship for adults aging in place during COVID-19: a critical support, a source of concern and potential for social work responses, *J. Gerontol. Soc. Work.* (2020), <https://doi.org/10.1080/01634372.2020.1766631>.
- RICHARD, M.; KOK, A.; DE MEULDER, D.; BESTEBROER, T. M.; LAMERS, M. M.; OKBA, N. M. A. et al. (2020). SARSCoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nat Commun* 11, 3496.

- RODRIGUEZ, M. A. J.; BONILLA, A. D. K.; BALBIN, R. G. J.; RABAAN, A. A.; SAH, R.; PANIZ, M. A. et al. History is repeating itself: a probable zoonotic spillover as a cause of an epidemic: the case of 2019 novel coronavirus. *Infez Med.* 2020;28(1):3-5.
- RUIZ-ARRONDO I, PORTILLO A, PALOMAR AM, SANTIBÁÑEZ S, SANTIBÁÑEZ P, CERVERA C, OTEO JA. Detection of SARS-CoV-2 in pets living with COVID-19 owners diagnosed during the COVID-19 lockdown in Spain: A case of an asymptomatic cat with SARS-CoV-2 in Europe. *Transbound Emerg Dis.* 2021 Mar;68(2):973-976. doi: 10.1111/tbed.13803. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32810370; PMCID: PMC7461521.
- SAILLEAU, C.; DUMAREST, M.; VANHOMWEGEN, J. et al. First detection and genome sequencing of SARS-CoV-2 in an infected cat in France. *Transbound Emerg Dis.* 2020;67:2324–2328. <https://doi.org/10.1111/tbed.13659>
- SHI, J.; WEN, Z.; ZHONG, G.; YANG, H.; WANG, C.; LIU, R. et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and different domestic animals to SARS-coronavirus-2. *Science.* 2020 Abr; pii: eabb7015. doi: 10.1126/science.abb7015.
- TONG, S. et al. Detection of novel SARS- like and other coronaviruses in bats from Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 482–485 (2009).
- TRILLA, A. One world, one health: the novel coronavirus COVID-19 epidemic. *MedClin (Barc).*2020;154(5):175-7. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2020.02.001>
- VanAart, 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., Munnink, B. B.O., de Rond, J., Sikkema, R. S., van der Spek, A. N., Spienburg, M., Wolters, W. J., . . . Smit, L. A.M. (2021). SARS-CoV-2 infection in cats and dogs in infected mink farms. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1–7. <https://doi.org/10.1111/tbed.14173>
- VINCENT, A.; MAMZER, H.; NG, Z.; FARKAS, K. J. People and their pets in the times of the covid-19 pandemic. *Society Register*, v. 4, n. 3, p. 111-128, 14 Apr. 2020.
- WHO. World Health Organization. Report of the WHO-China joint mission on coronavirus disease 2019 (COVID-19) [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2020 [cited 2020 Apr 8]. 40 p. Disponível em: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>. Acesso em 30 out 2020.
- WHO. World Health Organization. Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-SARS-CoV-2-implications-for-infection-prevention-precautions>.
- Acesso em: 10 fev 2022.
- WHO. World Health Organization. WHO-convened Global Study of Origins of SARS-CoV-2: China Part Joint WHO-China Study (2021c). Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>. Acesso em: 15 jan 2022.
- WHO. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Overview. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 10 fev 2022.

- WHO. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV; COVID-19). Situation Report – 22 [Internet]. Geneva: WHO; 2020 Feb 11 [acesso 2021 ago 2]. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf?sfvrsn=fb6d49b1_2WONG, M. C.; CREGEEN, S. J. J.; AJAMI, N. J.; PETROSINO, J. F. Evidence of recombination in coronaviruses implicating pangolin origins of nCoV-2019. *BioRxiv*. 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.939207>.
- WHO. World Health Organization (2020d). Cleaning and disinfection of environmental surfaces in the context of COVID-19. Interim Guidance of 15 May 2020. WHO/2019-nCoV/Disinfection/2020.1
- WU, F.; ZHAO, S.; YU, B.; CHEN, Y. M.; WANG, W.; SONG, Z. G. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020; 579: 265-269.
- YANG, L. et al. MERS- related betacoronavirus in *Vespertilio superans* bats. China. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1260–1262 (2014).
- ZAKI, A. M.; VAN BOHEEMEN, S.; BESTEBROER, T. M.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* 367, 1814–1820 (2012).
- ZHANG, Q.; ZHANG, H.; HUANG, K.; YANG, Y.; HUI, X.; GAO, J. et al. SARS-Cov-2 neutralizing serum antibodies in cats: a serological investigation. *BioRxiv*. 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.01.021196>. Preprint.
- ZHANG, W. Manual de Prevenção e Controle da COVID-19 segundo o Doutor Wenhong Zhang. São Paulo: PoloBooks; 2020. 68p.
- ZHONG, N. S. et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet* 362, 1353–1358 (2003).

CAPÍTULO I

First report of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection in two asymptomatic cats in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil.

(Artigo científico publicado no periódico Veterinary World, 14(10): 2839-2842.

Doi: www.doi.org/10.14202/vetworld.2021.2839-2842)

31 de outubro de 2021

ABSTRACT

Background and Aim: Despite worldwide case reports, including Brazilian cases, no frequency study on infection of pets by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has been conducted to date in Brazil. Accordingly, the present study was aimed to assess dogs and cats belonging to positive owners in Recife, Northeastern Brazil.

Materials and Methods: This was a longitudinal prospective study on dogs and cats in the city of Recife whose owners were in isolation at home due to a confirmed laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 through reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR). Oral and rectal swabs from the pets were tested for the presence of SARS-CoV-2-specific RNA by means of RT-qPCR.

Results: Among the pets tested, 0/16 dogs and 2/15 cats were positive for SARS-CoV-2. Interestingly, the two positive cats were owned by two unrelated asymptomatic veterinary students, which, therefore, post a warning to veterinarians worldwide.

Conclusion: The findings herein indicate that cats may act as sentinels for human cases, particularly sharing households with asymptomatic human cases. Although with small sampling and convenient recruiting, the presence of infected cats by SARS-CoV-2 was most likely due to close cat-human contact with positive owners, posing a human-animal health threat when pets share the same bed and interact with owners without protection, particularly during owner self-isolation. Thus, infected owners should follow the same human preventive guidelines with their pets to avoid spreading infection.

Keywords: Brazil, coronavirus, domestic animals, pandemic.

INTRODUCTION

The novel coronavirus (severe acute respiratory syndrome coronavirus or severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [SARS-CoV-2]), which has been recognized as an animal-borne pathogen, was first detected in humans in China in December 2019 [1]. In March 2020, the first cat with SARS-CoV-2 infection, which was clinically healthy and screened only due to its owner's hospitalization, was reported in Hong Kong [2]. Since then, 115 cases have been identified in cats with or without clinical signs, and these cases have mostly arisen in cats living in close contact with infected humans [2]. Although death has reportedly been rare, it has been confirmed that two cats died due to SARS-CoV-2 infection: A 4-month-old female Ragdoll kitten (out of 387 cats tested) belonging to a clinically ill but untested owner in March 2020 [3], and one cat (out of a total of 3,625 animals tested, among which 94 were positive) with no pre-existing conditions, which was subsequently euthanized due to several clinical conditions. Regarding this last case, it was concluded that, in rare circumstances, SARS-CoV-2 might contribute to or cause death among cats with comorbid conditions [4]. Nonetheless, transmission from cats to human beings has not been reported anywhere around the world to date.

In cats, SARS-CoV-2 penetrates cells by binding a viral spike protein, which has high homology between cat and human receptors, to the angiotensin-converting enzyme 2 receptor [5]. Experimentally inoculated cats have not shown any clinical signs but have shown viral RNA shedding of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal and fecal secretions, along with immunoglobulin G antibodies, 24 days after intranasal inoculation [6]. These inoculated cats have also successfully infected cohoused cats, causing severe tracheal and pulmonary lesions in susceptible youngsters [6]. Despite these cases described worldwide, the role of cats in SARS-CoV-2 infection remains to be fully established. Accordingly, as part of an ongoing project to evaluate the impact of SARS-CoV-2 in pets exposed to infected owners in Brazil, the aim of this study was to describe SARS-CoV-2 infection in two asymptomatic cats in Recife, the capital of the state of Pernambuco, in Northeastern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Ethical approval

The present study was approved by the Ethics Committee for Animal Use (protocol number 4879280420) and the Ethics Committee for Research on Human Beings (protocol number 4.054.208) of the Federal Rural University of Pernambuco.

Study period and location

The study was conducted in December 2020. This was a longitudinal prospective study on dogs and cats conducted in the city of Recife, whose owners were in isolation at home due to a confirmed laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 through reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR). Recife (08°04'03" S; 34°55'00" W) is an Atlantic coastal city that is the capital and largest city of the state of Pernambuco, and it is currently the fifth largest urban area in Brazil. The city is ranked 9th in population with 4,054,866 inhabitants; 210th in human development index, with 0.772; and 13th in gross domestic product, out of 5568 cities in Brazil. Recife has a tropical monsoon climate (Am) bordering on a tropical wet and dry climate (As) under the Köppen climate classification, with average temperatures of 22°C-30°C in the summer and 21°C-27°C in the winter, and high relative humidity throughout the year.

Sampling

Visits were made to these households after receiving voluntary agreement from the owners. Samples were taken from their pets by means of oral, nasal, and rectal swabs, placed in transportation media and immediately sent for RT-qPCR testing.

The swab samples were evaluated for the presence of SARS-CoV-2-specific RNA at the TECSA Laboratories (Belo Horizonte, Brazil). Briefly, collection tubes containing swab samples and viral transportation medium were vortexed for 30 s, and 500 µL were used for RNA isolation using a magnetic bead-based nucleic acid

extraction kit. Total RNA from the swab samples was extracted using a commercially available kit (Maxwell® RSC simplyRNA Tissue Kit, Promega Co., Madison, WI, USA) and an automated platform (Maxwell® RSC 48, Promega Co., Madison, WI, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. SARS-CoV-2 RT-qPCR tests were performed using a commercially available (GoTaq® 1-Step RT- Promega Co., Madison, WI, USA) and a commercial kit (2019-nCoV, Integrated DNA Technologies – IDT, Coralville, IA, USA) targeting two regions: 2019 nCoV_N1 (F: GACCCCAAATCAGCGAAAT, R: TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG and P: ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC) and 2019 nCoV_N2 (F: TTACAAACATTGGCCGCAAA, R: GCGCGACATTCCGAAGAA and P: ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG) as previously described for the detection of SARS-CoV-2 [7]. RT-qPCR was carried out in a commercial thermocycler (QuantStudio™ 1 – 96-Well 0.2 mL Block, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).

The cycling consisted of a holding stage of 50°C for 15 min and 95°C for 2 min, followed by 45 cycles of 95°C for 3 s and 55°C for 30 s. A cycle threshold value (CT-value) of less than 40 was defined as a positive test result. All samples were tested in duplicate and were only considered positive for SARS-CoV-2 when at least two genes were amplified. Samples with only one target amplified were considered inconclusive. Quantification of SARS-CoV-2 RNA was performed using the same reaction. A commercial control (2019-nCoV Positive Control, Integrated DNA Technologies – IDT, Coralville, IA, USA) was used to provide a standard curve (5-dilution points), and the feline β -actin (ACTB) gene was used as an internal control gene.

RESULTS

Among the pets from positive owners that were tested, 0/16 dogs and 2/15 cats (RE-02F and RE-04F) tested positive for SARS-CoV-2 RT-qPCR. Both of these cats had positive oropharyngeal swabs, but RE-04F also had one positive target from the rectal swab (target N2: CT 36.7, 2.41 RNA copy number/ μ L). The oropharyngeal swab from RE-04F had a higher viral load (target N1: CT 31.65, 11.362 RNA copy number/ μ L; target N2: CT 33.46, 19.2 RNA copy number/ μ L) than the oropharyngeal swab from RE-02F (target N1: CT 34.49, 1.87 RNA copy number/ μ L; target N2: CT

34.38, 10.65 RNA copy number/ μ L). ACTB-specific amplification was successfully implemented in all assays.

Interestingly, these two cats were owned by two unrelated asymptomatic veterinary students, with close animal-human contact and cats sleeping on the same bed. Neither of these animals had any related clinical signs at the time of sampling. RE-02F was a 1-year-old female mixed-breed cat, and RE-04F was a 1-year-old male mixed-breed cat. No viral genome was successfully sequenced due to $CT \geq 30.0$.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first report showing cats positive for SARS-CoV-2 infection, detected by means of oropharyngeal and rectal swab samples in Northeastern Brazil [8]. The owned cats described here most likely became infected with SARS-CoV-2 due to close contact with infected owners, including through sharing the same bed and interacting without protection during self-isolation. Despite several attempts, no viral genome or sub-genomic fragments were successfully sequenced, probably due to low viral load of all cat samples, which varied from Ct 36.7, 34.49, 34.38, and 33.46 to 31.65, still higher than recommended by most commercial protocols of Ct 30.0 or lower. Unsuccessful sequencing herein has corroborated to human clinical samples in a recent study using a newly capture sequencing methodology to generate SARS-CoV-2 genomic and transcriptome sequences, of which complete genomes were generated only from samples with higher viral loads, with CT-value under 33, based on the CDC qPCR assay [9].

In a previous study in France, all nine cats and 12 dogs owned by 18 veterinary students tested negative for SARS-CoV-2 RNA and neutralizing antibodies, including 2/18 diagnosed with SARS-CoV-2 infection [10]. In a recent study in southeastern Brazil, all 49 cats (40 owned and nine stray) and 47 dogs (42 owned and 5 stray) were found to be negative for SARS-CoV-2 infection, but one stray cat and one dog presented neutralizing antibodies for the new coronavirus [11]. In another study, also in southeastern Brazil, 2/10 cats and 6/29 dogs were considered positive for molecular presence of SARS-CoV-2 [12].

Although the sample for this study was small and recruited according to convenience, the presence of infected cats demonstrated here corroborates the

findings from other SARS-CoV-2 studies conducted worldwide, which have found that cats show higher susceptibility to infection than dogs [13,14]. Moreover, in those other studies, SARS-CoV-2 was also molecularly detected from rectal swab samples. Taken together, such findings may indicate that cats can act as sentinel animals for human cases of this disease, particularly with regard to households with asymptomatic human cases. Moreover, companion animals have so far not been implicated in human transmission, which may indicate that there is a lower risk of spillover back to humans [15].

The two positive cats were asymptomatic according to the sampling. They were unrelated, restricted to indoor life only, and lived as single cats in their respective households. Both cats were owned by veterinarians, who had the habits of hugging and kissing their cats, and sharing the same bed with them. Even after receiving their diagnoses of SARS-CoV-2, these owners continued to have regular close contact with their cats. Such contact with one or more SARS-CoV-2 infected persons have been reported to increase the risk of pet infection [16].

CONCLUSION

This study provides the first report of SARS-CoV-2 infected cats, detected through oropharyngeal and rectal swab samples in Northeastern Brazil. Although this sample was small and recruited according to convenience sampling, the presence of cats infected by SARS-CoV-2 was most likely due to close cat-human contact with positive owners, including sharing the same bed and interacting without protection during self-isolation. Infected people should take the same precautions with their pets to avoid spreading infection during self-isolation.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

ISE, RCCM, CPB, LBK, RGA, VD, HAM, APS, AWB, and DFB: Conceptualization, conducted the study, and analyzed the samples. ISE, DSR, LBL, MAAN, LRMPF, BFA, CKSF, OVC, RCCM, LER, DSB, JAG, OVC, LER and DFB: Data collection and data

analysis. All authors: writing of the original draft. All authors read, revised and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to David George Elliff for editing and improving the manuscript. The study was funded by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Grant no. 402341/2020-1).

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

PUBLISHER'S NOTE

Veterinary World remains neutral with regard to jurisdictional claims in published institutional affiliation.

REFERENCES

1. Lai, C.C., Shih, T.P., Ko, W.C., Tang, H.J. and Hsueh, P.R. (2020) Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 55(3): 105924.
2. World Organisation for Animal Health. (2021) COVID-19 OIE World Organisation for Animal Health. Available from: <https://www.oie.int/en/what-we-offer/emergency-and-resilience/covid-19> Retrieved on 22-05-2021.
3. Hosie, M.J., Epifano, I., Herder, V., Orton, R.J., Stevenson, A., Johnson, N., MacDonald, E., Dunbar, D., McDonald, M., Howie, F., Tennant, B., Herrity, D., Filipe, A.D.S., Streicker, D.G., COVID-19 Genomics UK (COG-UK) consortium; Willett, B.J., Murcia, P.R., Jarrett, R.F., Robertson, D.L. and Weir, W. (2021) Detection of SARS-CoV-2 in respiratory samples from cats in the UK associated with human-to-cat transmission. *Vet. Rec.*, 188(8): e247.

4. Carpenter, A., Ghai, R., Gary, J., Ritter, J., Carvallo, F., Diel, D., Martins, M., Murphy, J., Schroeder, B., Brightbill, K., Tewari, D., Boger, L., Gabel, J., Cobb, R., Hennebelle, J., Stanton, J.B., McCullough, K. and Mosley, Y.Y.C. (2021) Determining the Role of Natural SARS-CoV-2 Infection in the Death of Ten Domestic Pets. Research Square. Available from: <http://europepmc.org/abstract/PPR/PPR313634> . Retrieved on 15-10-2021.
5. Guo, H., Guo, A., Wang, C., Yan, B., Lu, H. and Chen, H. (2008) Expression of feline angiotensin converting enzyme 2 and its interaction with SARS-CoV S1 protein. *Res. Vet. Sci.*, 84(3): 494-496.
6. 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. and Bu, Z. (2020) Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*, 368(6494): 1016-1020.
7. Centers for Disease Control and Prevention. (2021) Information for Laboratories about Coronavirus (COVID-19). Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/index.html> Retrieved on 14-09-2021.
8. OIE-WAHIS. (2021) Available from: <https://wahis.oie.int/#/report-info?reportId=31367> Retrieved on 22-05-2021.
9. Doddapaneni, H., Cregeen, S.J., Sucgang, R., Meng, Q., Qin, X., Avadhanula, V., Chao, H., Menon, V., Nicholson, E., Henke, D., Piedra, F.A., Rajan, A., Momin, Z., Kottapalli, K., Hoffman, K.L., Sedlazeck, F.J., Metcalf, G., Piedra, P.A., Muzny, D.M., Petrosino, J.F. and Gibbs, R.A. (2020) Oligonucleotide Capture Sequencing of the SARS-CoV-2 Genome and Subgenomic Fragments from COVID-19 Individuals. *bioRxiv*, 2020 : 421057.
10. Temmam, S., Barbarino, A., Maso, D., Behillil, S., Enouf, V., Huon, C., Jarraud, A., Chevallier, L., Backovic, M., Pérot, P., Verwaerde, P., Tiret, L., van der Werf, S. and Eloit, M. (2020) Absence of SARS-CoV-2 infection in cats and dogs in close contact with a cluster of COVID-19 patients in a veterinary campus. *One Health*, 10 : 100164.
11. Dias, H.G., Resck, M.E.B., Caldas, G.C., Resck, A.F., da Silva, N.V., Dos Santos, A.M.V., das Chagas Sousa, T., Ogrzewalska, M.H., Siqueira, M.M., Pauvolid-Corrêa, A. and Dos Santos, F.B. (2021) Neutralizing antibodies for SARS-CoV-2 in stray animals from Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*, 16(3): e0248578.
12. Calvet, G.A., Pereira, S.A., Ogrzewalska, M., Pauvolid- Corrêa, A., Resende, P.C., de Tassinari, W.S, de Pina Costa, A., Keidel, L.O., da Rocha, A.S.B., da Silva, M.F.B., Dos Santos, S.A., Lima, A.B.M., Vargas de Moraes, I.C., Mendes A.A. J., das Chagas Souza, T., Martins, R.B., Ornellas, R.O., Corrêa, M.L., da Silva Antonio, I.M., Guaraldo, L., do Couto Motta, F., Brasil, P., Siqueira, M.M., Gremião, I.D.F. and Menezes, R.C. (2021) Investigation of SARS-CoV-2 infection in dogs and cats of

humans diagnosed with COVID-19 in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*, 16(4): e0250853.

13. Patterson, E.I., Elia, G., Grassi, A., Giordano, A., Desario, C., Medardo, M., Smith, S.L., Anderson, E.R., Prince, T., Patterson, G.T., Lorusso, E., Lucente, M.S., Lanave, G., Lauzi, S., Bonfanti, U., Stranieri, A., Martella, V., Basano, F.S., Barrs, V.R., Radford, A.D., Agrimi, U., Hughes, G.L., Paltrinieri, S. and Decaro, N. (2020) Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy. *Nat. Commun.*, 11(1): 6231.

14. Ruiz-Arrondo, I, Portillo A, Palomar AM, Santibáñez S, Santibáñez P, Cervera C. and Oteo, J.A. (2021) Detection of SARS-CoV-2 in pets living with COVID-19 owners diagnosed during the COVID-19 lockdown in Spain: A case of an asymptomatic cat with SARS-CoV-2 in Europe. *Transbound. Emerg. Dis.*, 68(2): 973-976.

15. Mallapaty, S. (2021) The search for animals harbouring coronavirus and why it matters. *Nature*, 591(7848): 26-28.

16. Colitti, B., Bertolotti, L., Mannelli, A., Ferrara, G., Vercelli, A., Grassi, A., Trentin, C., Paltrinieri, S., Nogarol, C., Decaro, N., Brocchi, E. and Rosati, S. (2021) Cross-sectional serosurvey of companion animals housed with SARS-CoV-2-infected owners, Italy. *Emerg. Infect. Dis. J.*, 27(7): 1919-1922.

ANEXO I: Questionário da ficha de anamnese

1. Nome / identificação: _____ Amostra: _____
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: _____ Escora corporal: _____ Temperatura: Mucosas: _____
- Ausculta: _____ 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
 - Residência em condomínio fechado
 - Única casa no terreno
 - Apartamento com sacada
 - 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: _____
 - Quintal com gramado / terra
 - Quintal parcialmente calçado
 - Quintal totalmente calçado
 - Presença de animais soltos nos arredores

First report of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection in two asymptomatic cats in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil

Ivyson da Silva Epifanio¹, Davi dos Santos Rodrigues¹, Leonardo Borges de Lima¹, Maria Aurea de Azevedo Nogueira¹, Laelia Reginae do Monte Pessoa Felix¹, Barbara Ferreira de Almeida¹, Claudia Kathariny da Silva Farias¹, Otavio Valerio de Carvalho², Rita de Cassia Carvalho Maia¹, Luiz Eduardo Ristow², David Soeiro Barbosa³, Juliana Arena Galhardo⁴, Christina Pettan-Brewer⁵, Louise Bach Kmetiuk⁶, Rafael Garabet Agopian⁷, Valeria Dutra⁸, Helio Autran de Morais⁹, Andrea Pires dos Santos¹⁰, Alexander Welker Biondo⁶ and Daniel Friguglietti Brandespim¹

1. Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; 2. TECSA Animal Reference Laboratory, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; 3. Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; 4. Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil; 5. Department of Comparative Medicine, School of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, USA; 6. Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paran, Curitiba, Paran, Brazil; 7. Department of Veterinary Medicine, University of Santo Amaro, São Paulo, Brazil; 8. Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Federal University of Mato Grosso, Cuiab, Mato Grosso, Brazil; 9. Department of Clinical Sciences, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA; 10. Department of Comparative Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA.

Corresponding author: Alexander Welker Biondo, e-mail: abiondo@ufpr.br

Co-authors: ISE: Ivyson_7@hotmail.com, DSR: davidossantosr@gmail.com, LBL: borgesmedvet@hotmail.com, MAAN: aureaazevedovet@gmail.com, LRMPF: laeliapessoa@gmail.com, BFA: barbaraferreiradealmeida@gmail.com, CKSF: claudiakfarias@hotmail.com, OVC: otaviovalerio@tecsa.com.br, RCCM: r.carvalhomaia@gmail.com, LER: ristow@tecsa.com.br, DSB: davidsoeiro@gmail.com, JAG: juliana.galhardo@ufms.br, CP: kcpb@uw.edu, LBK: louisebachk@gmail.com, RGA: rafael.agopian@gmail.com, VD: valeriadutra.dutra@gmail.com, HAM: heliodemorais@gmail.com, APS: santos1@purdue.edu, DFB: danielbrandespim@gmail.com

Received: 08-06-2021, **Accepted:** 24-09-2021, **Published online:** 31-10-2021

doi: www.doi.org/10.14202/vetworld.2021.2839-2842 **How to cite this article:** da Silva Epifanio I, dos Santos Rodrigues D, de Lima LB, de Azevedo Nogueira MA, do Monte Pessoa Felix LR, de Almeida BF, da Silva Farias CK, de Carvalho OV, de Cassia Carvalho Maia R, Ristow LE, Barbosa DS, Galhardo JA, Pettan-Brewer C, Kmetiuk LB, Agopian RG, Dutra V, de Morais HA, dos Santos AP, Biondo AW, Brandespim DF (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.

Abstract

Background and Aim: Despite worldwide case reports, including Brazilian cases, no frequency study on infection of pets by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has been conducted to date in Brazil. Accordingly, the present study was aimed to assess dogs and cats belonging to positive owners in Recife, Northeastern Brazil.

Materials and Methods: This was a longitudinal prospective study on dogs and cats in the city of Recife whose owners were in isolation at home due to a confirmed laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 through reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR). Oral and rectal swabs from the pets were tested for the presence of SARS-CoV-2-specific RNA by means of RT-qPCR.

Results: Among the pets tested, 0/16 dogs and 2/15 cats were positive for SARS-CoV-2. Interestingly, the two positive cats were owned by two unrelated asymptomatic veterinary students, which, therefore, post a warning to veterinarians worldwide.

Conclusion: The findings herein indicate that cats may act as sentinels for human cases, particularly sharing households with asymptomatic human cases. Although with small sampling and convenient recruiting, the presence of infected cats by SARS-CoV-2 was most likely due to close cat-human contact with positive owners, posing a human-animal health threat when pets share the same bed and interact with owners without protection, particularly during owner self-isolation. Thus, infected owners should follow the same human preventive guidelines with their pets to avoid spreading infection.

Keywords: Brazil, coronavirus, domestic animals, pandemic.

Copyright: da Silva Epifanio, et al. Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Introduction

The novel coronavirus (severe acute respiratory syndrome coronavirus or severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [SARS-CoV-2]), which has been recognized as an animal-borne pathogen, was first detected in humans in China in December 2019 [1]. In March 2020, the first cat with SARS-CoV-2 infection,

which was clinically healthy and screened only due to its owner's hospitalization, was reported in Hong Kong [2]. Since then, 115 cases have been identified in cats with or without clinical signs, and these cases have mostly arisen in cats living in close contact with infected humans [2]. Although death has reportedly been rare, it has been confirmed that two cats died due to SARS-CoV-2 infection: A 4-month-old female Ragdoll kitten (out of 387 cats tested) belonging to a clinically ill but untested owner in March 2020 [3], and one cat (out of a total of 3,625 animals tested, among which 94 were positive) with no pre-existing conditions, which was subsequently euthanized due to several clinical conditions. Regarding this last case, it was concluded that, in rare circumstances, SARS-CoV-2 might contribute to or cause death among cats with comorbid conditions [4]. Nonetheless, transmission from cats to human beings has not been reported anywhere around the world to date.

In cats, SARS-CoV-2 penetrates cells by binding a viral spike protein, which has high homology between cat and human receptors, to the angiotensin-converting enzyme 2 receptor [5]. Experimentally inoculated cats have not shown any clinical signs but have shown viral RNA shedding of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal and fecal secretions, along with immunoglobulin G antibodies, 24 days after intranasal inoculation [6]. These inoculated cats have also successfully infected cohoused cats, causing severe tracheal and pulmonary lesions in susceptible youngsters [6].

Despite these cases described worldwide, the role of cats in SARS-CoV-2 infection remains to be fully established. Accordingly, as part of an ongoing project to evaluate the impact of SARS-CoV-2 in pets exposed to infected owners in Brazil, the aim of this study was to describe SARS-CoV-2 infection in two asymptomatic cats in Recife, the capital of the state of Pernambuco, in Northeastern Brazil.

Materials and Methods

Ethical approval

The present study was approved by the Ethics Committee for Animal Use (protocol number 4879280420) and the Ethics Committee for Research on Human Beings (protocol number 4.054.208) of the Federal Rural University of Pernambuco.

Study period and location

The study was conducted in December 2020. This was a longitudinal prospective study on dogs and cats conducted in the city of Recife, whose owners were in isolation at home due to a confirmed laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 through reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR). Recife (08°04'03" S; 34°55'00" W) is an Atlantic coastal city that is the capital and largest city of the state of Pernambuco, and it is currently the fifth largest urban area in Brazil. The city is ranked 9th in population with 4,054,866 inhabitants; 210th in human development

index, with 0.772; and 13th in gross domestic product, out of 5568 cities in Brazil. Recife has a tropical monsoon climate (Am) bordering on a tropical wet and dry climate (As) under the Köppen climate classification, with average temperatures of 22°C-30°C in the summer and 21°C-27°C in the winter, and high relative humidity throughout the year.

Sampling

Visits were made to these households after receiving voluntary agreement from the owners. Samples were taken from their pets by means of oral, nasal, and rectal swabs, placed in transportation media and immediately sent for RT-qPCR testing.

The swab samples were evaluated for the presence of SARS-CoV-2-specific RNA at the TECSA Laboratories (Belo Horizonte, Brazil). Briefly, collection tubes containing swab samples and viral transportation medium were vortexed for 30 s, and 500 µL were used for RNA isolation using a magnetic bead-based nucleic acid extraction kit. Total RNA from the swab samples was extracted using a commercially available kit (Maxwell[®] RSC simplyRNA Tissue Kit, Promega Co., Madison, WI, USA) and an automated platform (Maxwell[®] RSC 48, Promega Co., Madison, WI, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. SARS-CoV-2 RT-qPCR tests were performed using a commercially available (GoTaq[®] 1-Step RT- Promega Co., Madison, WI, USA) and a commercial kit (2019-nCoV, Integrated DNA Technologies – IDT, Coralville, IA, USA) targeting two regions: 2019 nCoV_N1 (F: GACCCCAAATCAGCGAAAT, R: TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG and P: ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC) and 2019 nCoV_N2 (F: TTACAAACATTGGCCGCAA, R: GCGCGACATTCCGAAGAA and P: ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG) as previously described for the detection of SARS-CoV-2 [7]. RT-qPCR was carried out in a commercial thermocycler (QuantStudio[™] 1 – 96-Well 0.2 mL Block, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). The cycling consisted of a holding stage of 50°C for 15 min and 95°C for 2 min, followed by 45 cycles of 95°C for 3 s and 55°C for 30 s. A cycle threshold value (CT-value) of less than 40 was defined as a positive test result. All samples were tested in duplicate and were only considered positive for SARS-CoV-2 when at least two genes were amplified. Samples with only one target amplified were considered inconclusive. Quantification of SARS-CoV-2 RNA was performed using the same reaction. A commercial control (2019-nCoV Positive Control, Integrated DNA Technologies – IDT, Coralville, IA, USA) was used to provide a standard curve (5-dilution points), and the feline β-actin (ACTB) gene was used as an internal control gene.

Results

Among the pets from positive owners that were tested, 0/16 dogs and 2/15 cats (RE-02F and RE-04F) tested positive for SARS-CoV-2 RT-qPCR. Both of these cats had positive oropharyngeal swabs,

but RE-04F also had one positive target from the rectal swab (target N2: CT 36.7, 2.41 RNA copy number/ μ L). The oropharyngeal swab from RE-04F had a higher viral load (target N1: CT 31.65, 11.362 RNA copy number/ μ L; target N2: CT 33.46, 19.2 RNA copy number/ μ L) than the oropharyngeal swab from RE-02F (target N1: CT 34.49, 1.87 RNA copy number/ μ L; target N2: CT 34.38, 10.65 RNA copy number/ μ L). ACTB-specific amplification was successfully implemented in all assays.

Interestingly, these two cats were owned by two unrelated asymptomatic veterinary students, with close animal-human contact and cats sleeping on the same bed. Neither of these animals had any related clinical signs at the time of sampling. RE-02F was a 1-year-old female mixed-breed cat, and RE-04F was a 1-year-old male mixed-breed cat. No viral genome was successfully sequenced due to CT \geq 30.0.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first report showing cats positive for SARS-CoV-2 infection, detected by means of oropharyngeal and rectal swab samples in Northeastern Brazil [8]. The owned cats described here most likely became infected with SARS-CoV-2 due to close contact with infected owners, including through sharing the same bed and interacting without protection during self-isolation. Despite several attempts, no viral genome or sub-genomic fragments were successfully sequenced, probably due to low viral load of all cat samples, which varied from Ct 36.7, 34.49, 34.38, and 33.46 to 31.65, still higher than recommended by most commercial protocols of Ct 30.0 or lower. Unsuccessful sequencing herein has corroborated to human clinical samples in a recent study using a newly capture sequencing methodology to generate SARS-CoV-2 genomic and transcriptome sequences, of which complete genomes were generated only from samples with higher viral loads, with CT-value under 33, based on the CDC qPCR assay [9].

In a previous study in France, all nine cats and 12 dogs owned by 18 veterinary students tested negative for SARS-CoV-2 RNA and neutralizing antibodies, including 2/18 diagnosed with SARS-CoV-2 infection [10]. In a recent study in southeastern Brazil, all 49 cats (40 owned and nine stray) and 47 dogs (42 owned and 5 stray) were found to be negative for SARS-CoV-2 infection, but one stray cat and one dog presented neutralizing antibodies for the new coronavirus [11]. In another study, also in southeastern Brazil, 2/10 cats and 6/29 dogs were considered positive for molecular presence of SARS-CoV-2 [12].

Although the sample for this study was small and recruited according to convenience, the presence of infected cats demonstrated here corroborates the findings from other SARS-CoV-2 studies conducted worldwide, which have found that cats show higher susceptibility to infection than dogs [13,14]. Moreover, in those other studies, SARS-CoV-2 was

also molecularly detected from rectal swab samples. Taken together, such findings may indicate that cats can act as sentinel animals for human cases of this disease, particularly with regard to households with asymptomatic human cases. Moreover, companion animals have so far not been implicated in human transmission, which may indicate that there is a lower risk of spillover back to humans [15].

The two positive cats were asymptomatic according to the sampling. They were unrelated, restricted to indoor life only, and lived as single cats in their respective households. Both cats were owned by veterinarians, who had the habits of hugging and kissing their cats, and sharing the same bed with them. Even after receiving their diagnoses of SARS-CoV-2, these owners continued to have regular close contact with their cats. Such contact with one or more SARS-CoV-2 infected persons have been reported to increase the risk of pet infection [16].

Conclusion

This study provides the first report of SARS-CoV-2 infected cats, detected through oropharyngeal and rectal swab samples in Northeastern Brazil. Although this sample was small and recruited according to convenience sampling, the presence of cats infected by SARS-CoV-2 was most likely due to close cat-human contact with positive owners, including sharing the same bed and interacting without protection during self-isolation. Infected people should take the same precautions with their pets to avoid spreading infection during self-isolation.

Authors' Contributions

ISE, RCCM, CPB, LBK, RGA, VD, HAM, APS, AWB, and DFB: Conceptualization, conducted the study, and analyzed the samples. ISE, DSR, LBL, MAAN, LRMPF, BFA, CKSF, OVC, RCCM, LER, DSB, JAG, OVC, LER and DFB: Data collection and data analysis. All authors: writing of the original draft. All authors read, revised and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors are thankful to David George Elliff for editing and improving the manuscript. The study was funded by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Grant no. 402341/2020-1).

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Veterinary World remains neutral with regard to jurisdictional claims in published institutional affiliation.

References

- Lai, C.C., Shih, T.P., Ko, W.C., Tang, H.J. and Hsueh, P.R. (2020) Severe acute respiratory syndrome

- coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 55(3): 105924.
2. World Organisation for Animal Health. (2021) COVID-19 OIE World Organisation for Animal Health. Available from: <https://www.oie.int/en/what-we-offer/emergency-and-resilience/covid-19> Retrieved on 22-05-2021.
 3. Hosie, M.J., Epifano, I., Herder, V., Orton, R.J., Stevenson, A., Johnson, N., MacDonald, E., Dunbar, D., McDonald, M., Howie, F., Tennant, B., Herrity, D., Filipe, A.D.S., Streicker, D.G., COVID-19 Genomics UK (COG-UK) consortium; Willett, B.J., Murcia, P.R., Jarrett, R.F., Robertson, D.L. and Weir, W. (2021) Detection of SARS-CoV-2 in respiratory samples from cats in the UK associated with human-to-cat transmission. *Vet. Rec.*, 188(8): e247.
 4. Carpenter, A., Ghai, R., Gary, J., Ritter, J., Carvallo, F., Diel, D., Martins, M., Murphy, J., Schroeder, B., Brightbill, K., Tewari, D., Boger, L., Gabel, J., Cobb, R., Hennebelle, J., Stanton, J.B., McCullough, K. and Mosley, Y.Y.C. (2021) Determining the Role of Natural SARS-CoV-2 Infection in the Death of Ten Domestic Pets. Research Square. Available from: <http://europepmc.org/abstract/PPR/PPR313634>. Retrieved on 15-10-2021.
 5. Guo, H., Guo, A., Wang, C., Yan, B., Lu, H. and Chen, H. (2008) Expression of feline angiotensin converting enzyme 2 and its interaction with SARS-CoV S1 protein. *Res. Vet. Sci.*, 84(3): 494-496.
 6. 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. and Bu, Z. (2020) Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*, 368(6494): 1016-1020.
 7. Centers for Disease Control and Prevention. (2021) Information for Laboratories about Coronavirus (COVID-19). Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/index.html> Retrieved on 14-09-2021.
 8. OIE-WAHIS. (2021) Available from: <https://wahis.oie.int/#/report-info?reportId=31367> Retrieved on 22-05-2021.
 9. Doddapaneni, H., Cregeen, S.J., Sugang, R., Meng, Q., Qin, X., Avadhanula, V., Chao, H., Menon, V., Nicholson, E., Henke, D., Piedra, F.A., Rajan, A., Momin, Z., Kottapalli, K., Hoffman, K.L., Sedlazeck, F.J., Metcalf, G., Piedra, P.A., Muzny, D.M., Petrosino, J.F. and Gibbs, R.A. (2020) Oligonucleotide Capture Sequencing of the SARS-CoV-2 Genome and Subgenomic Fragments from COVID-19 Individuals. *bioRxiv*, 2020: 421057.
 10. Temmam, S., Barbarino, A., Maso, D., Behillil, S., Enouf, V., Huon, C., Jarraud, A., Chevallier, L., Backovic, M., Pérot, P., Verwaerde, P., Tiret, L., van der Werf, S. and Eloit, M. (2020) Absence of SARS-CoV-2 infection in cats and dogs in close contact with a cluster of COVID-19 patients in a veterinary campus. *One Health*, 10: 100164.
 11. Dias, H.G., Resck, M.E.B., Caldas, G.C., Resck, A.F., da Silva, N.V., Dos Santos, A.M.V., das Chagas Sousa, T., Ogrzewalska, M.H., Siqueira, M.M., Pauvolid-Corrêa, A. and Dos Santos, F.B. (2021) Neutralizing antibodies for SARS-CoV-2 in stray animals from Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*, 16(3): e0248578.
 12. Calvet, G.A., Pereira, S.A., Ogrzewalska, M., Pauvolid-Corrêa, A., Resende, P.C., de Tassinari, W.S., de Pina Costa, A., Keidel, L.O., da Rocha, A.S.B., da Silva, M.F.B., Dos Santos, S.A., Lima, A.B.M., Vargas de Moraes, I.C., Mendes A.A. J., das Chagas Souza, T., Martins, R.B., Ornellas, R.O., Corrêa, M.L., da Silva Antonio, I.M., Guaraldo, L., do Couto Motta, F., Brasil, P., Siqueira, M.M., Gremião, I.D.F. and Menezes, R.C. (2021) Investigation of SARS-CoV-2 infection in dogs and cats of humans diagnosed with COVID-19 in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*, 16(4): e0250853.
 13. Patterson, E.I., Elia, G., Grassi, A., Giordano, A., Desario, C., Medardo, M., Smith, S.L., Anderson, E.R., Prince, T., Patterson, G.T., Lorusso, E., Lucente, M.S., Lanave, G., Lauzi, S., Bonfanti, U., Stranieri, A., Martella, V., Basano, F.S., Barrs, V.R., Radford, A.D., Agrimi, U., Hughes, G.L., Paltrinieri, S. and Decaro, N. (2020) Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy. *Nat. Commun.*, 11(1): 6231.
 14. Ruiz-Arrondo, I., Portillo A, Palomar AM, Santibáñez S, Santibáñez P, Cervera C. and Oteo, J.A. (2021) Detection of SARS-CoV-2 in pets living with COVID-19 owners diagnosed during the COVID-19 lockdown in Spain: A case of an asymptomatic cat with SARS-CoV-2 in Europe. *Transbound. Emerg. Dis.*, 68(2): 973-976.
 15. Mallapaty, S. (2021) The search for animals harbouring coronavirus and why it matters. *Nature*, 591(7848): 26-28.
 16. Colitti, B., Bertolotti, L., Mannelli, A., Ferrara, G., Vercelli, A., Grassi, A., Trentin, C., Paltrinieri, S., Nogarol, C., Decaro, N., Brocchi, E. and Rosati, S. (2021) Cross-sectional serosurvey of companion animals housed with SARS-CoV-2-infected owners, Italy. *Emerg. Infect. Dis. J.*, 27(7): 1919-1922.
