

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO

Mestrado em Medicina Veterinária

Raphaela do Nascimento Araújo

**Monitoramento de SARS-CoV-2 em amostra de sangue de cães e
gatos em ano pandêmico.**

São Paulo

2023

Raphaela do Nascimento Araujo

Monitoramento de SARS-CoV-2 em amostra de sangue de cães e gatos em ano pandêmico.

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador(a): Prof.^a Dra. Adriana Cortez.

São Paulo

2023

A691m Araujo, Raphaela do Nascimento.

Monitoramento de SARS-CoV-2 em amostra de sangue de cães e gatos em ano pandêmico / Raphaela do Nascimento Araujo. — São Paulo, 2023.

40 p.: il., color.

Dissertação (Mestrado em Veterinária) —
Universidade Santo Amaro, 2023.

Orientadora: Prof.^a Me. Dr.^a Adriana Cortez.

1. SARS-CoV-2. 2. Gato. 3. Cão. I. Cortez, Adriana, orient. II.
Universidade Santo Amaro. III. Título.

Programa de Pós-graduação Stricto Sensu
Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal - Mestrado
Ata de Defesa

Ao décimo oitavo dia do mês de janeiro do ano de dois mil e vinte e três, via Webconferência, conforme Regimento Geral e Regulamento de Pós-graduação da UNISA teve início às 14h00min, o exame de defesa intitulada: **“Monitoramento de SARS-CoV-2 em amostra de sangue de cães e gatos em ano pandêmico”** do (a) mestrando(a) Raphaela do Nascimento Araujo, regularmente matriculado(a) no programa de Mestrado em Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal. Os requisitos exigidos foram cumpridos conforme registros constantes nos arquivos da Secretaria de Pós-graduação segundo encaminhamento do Prof. Doutor Rafael Garabet Agopian, Coordenador do Programa. Os trabalhos foram instalados pelo presidente da banca examinadora e orientadora Profa. Doutora Adriana Cortez, Doutora pela USP, que foi constituída pelos seguintes professores: Profa. Doutora Marina Tiemi Shio, Doutora pela USP e Prof. Doutor Antonio Francisco de Souza Filho, Doutor pela USP. A banca examinadora, tendo decidido aceitar a pesquisa, passou à arguição do(a) aluno(a). Encerrados os trabalhos, deram o parecer final conforme consta a seguir:

Profa. Doutora Adriana Cortez

Parecer: APROVADA

Assinatura: 

Profa. Doutora Marina Tiemi Shio

Parecer: APROVADA

Assinatura: 

Prof. Doutor Antonio Francisco de Souza Filho

Parecer: APROVADA

Assinatura: 

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de crescer e me desenvolver como profissional, que sempre está presente em todos os momentos da minha vida. Também tenho imensa gratidão à Prof. Adriana Cortez e Jonas Moraes Filho por me ensinar com paciência e respeito durante essa trajetória. Além disso, esse trabalho não seria possível ser executado sem a ajuda do Dr. Marcos Bruan Heinemman, Carla Gasparoto Chande Vascondelos, Ellen Nathalie de Souza, Gisele Oliveira de Souza e Larissa Gomes.

Obrigada também a toda equipe da Clínica Patas Urbanas, minha amiga e irmã de faculdade Giovana Barros Nunes, meu pais e irmão que sempre me acolherem em todos os momentos, me ajudaram, aconselharam e encorajaram a realização e finalização desse projeto.

RESUMO

A rápida disseminação do novo coronavírus intitulado de Síndrome Respiratória Aguda Grave por Coronavírus tipo 2 (SARS-CoV-2) instaurou de estado de pandemia declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em março de 2020. Desde seu surgimento muitos questionamentos foram levantados à respeito da origem viral, cadeia epidemiológica e potencial zoonótico.

Nos últimos, anos casos de cães e gatos com teste moleculares positivos a partir de amostras coletadas de swabs nasais, retais e faríngeos foram descritos, assim como a presença de altos níveis de anticorpos específicos para SARS-CoV-2 em plasma sanguíneo. Entretanto, as pesquisas de RNA viral em amostras de sangue são pouco aprofundadas e a necessidade de sua investigação é de grande importância, uma vez que a presença em pacientes humanos demonstrou aumentar significativamente as chances de óbito dos doentes e interfere também na gravidade da doença.

O presente trabalho realiza a investigação do vírus em sangue total de cães e gatos domésticos através do teste de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Foram coletadas um total de 938 amostras no ano de 2021 no estado de São Paulo de cães e gatos e feitos 486 testes todos de resultados negativos. A ausência da detecção do RNA em sangue desses animais poderia indicar a baixa capacidade de infectividade e curtos períodos de viremia no organismo desses animais.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, cães, gatos, pandemia, viremia, zoonose.

ABSTRACT

The rapid spread of the new coronavirus entitled Severe Acute Respiratory Syndrome by Coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) established a state of pandemic declared by the World Health Organization (WHO) in March 2020. Since its emergence, many questions have been raised to the regarding the viral origin, epidemiological chain and zoonotic potential.

In recent years, cases of dogs and cats with positive molecular tests from samples collected from nasal, rectal and pharyngeal swabs have been described, as well as the presence of high levels of specific antibodies for SARS-CoV-2 in blood plasma. However, research on viral RNA in blood samples is not very thorough and the need for its investigation is of great importance, since the presence of viremia in human patients has been shown to significantly increase the chances of death of patients and also interferes with the severity of the disease.

The present work investigates the virus in whole blood of domestic dogs and cats using the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) test. A total of 938 samples were collected in the year 2021 in the state of São Paulo from dogs and cats and 486 tests were carried out, all with negative results. The absence of detection of RNA in the blood of these animals could indicate the low infectivity capacity and short periods of viremia in the organism of these animals.

Keywords: SARS-CoV-2, dogs, cats, pandemic, viremia, zoonosis.

Lista de Figuras

Figura 1: Possível origem do Sar-Cov-2 e infecções relacionadas.....	9
Figura 2. Representação do SARS-Cov-2 e as proteínas estruturais que o compõe.....	10
Figura 3. Ciclo de replicação do SARS Cov-2 dentro da célula hospedeira.....	12

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
1.2 SARS.CoV-2.....	10
1.3 Patogênese.....	14
1.4 COVID-19 em humanos.....	14
1.4.1 Diagnóstico Laboratorial.....	16
1.5 SARS-CoV-2em outras espécies animais.....	18
 2. OBJETIVO	
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivo Específico	22
 3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Comissão de Ética de Uso em Animais.....	22
3.2 Amostras Clínicas.....	22
3.3 Extração de RNA e Síntese de cDNA.....	22
3.4 Resultados	23
3.5 Discussão.....	23
3.6 Conclusão.....	26
 5. REFERÊNCIA	26

1. Introdução

Em 2019, o aparecimento de um novo coronavírus denominado Síndrome Respiratória Aguda Grave por Coronavírus tipo 2 (SARS CoV-2) e agente etiológico da doença do Coronavírus 2019 (COVID 19) mudou a dinâmica da política, economia, saúde e relações interpessoais até então estabelecidas (Holmes et al., 2021; Kirtipal et al. 2020).

Os coronavirus pertencem à ordem *Nidovirales* família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronaviridae*. Existem quatro gêneros descritos nessa subfamília, os *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus* e *Deltacoronavirus*, que possuem diferentes características filogenéticas e estruturas genômicas entre eles. Dentro do gênero *Betacoronavirus* temos 4 subgêneros, o vírus da SARS-CoV-2 está contido no subgênero *Sarbecovirus* (ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses, https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202101868).

As espécies dos gêneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* infectam apenas mamíferos, enquanto *Gamacoronavirus* e *Deltacoronavirus* além de mamíferos também acometem algumas espécies de aves (Cui et al. 2019). O vírus da bronquite infecciosa (IBV), em 1937, foi o primeiro coronavirus descrito. Na década de 1940, foi relatado o vírus da hepatite do camundongo (MHV), seguido de outros coronavirus em mamíferos (Woo et al. 2009).

O primeiro relato do gênero, em humanos, ocorreu em 1965, proveniente de um isolado de um estudante com quadro respiratório. Após seu isolamento recebeu o nome de B814 e apresentava semelhanças morfológicas com o IBV. Um outro agente viral, no mesmo período, denominado de 229 E, foi isolado de alunos de medicina na Universidade de Chicago com quadro respiratório. Concomitantemente, a esses episódios, houve a identificação de outros agentes em traqueia de humanos e essas estirpes foram classificadas como “OC” (Hasoksuz et al. 2020). Ao final da década, virologistas que trabalhavam com essas estirpes e também as isoladas de animais, observaram que esses vírus possuíam semelhança morfológica na microscopia eletrônica. Esse novo grupo de vírus foi denominado de coronavírus

devido a projeções que possuíam em sua superfície e que lembravam uma coroa, sendo posteriormente classificado com um novo gênero (Kahn et al. 2005).

No decorrer da história da medicina humana, esse gênero era correlacionado a enfermidades, de pouca gravidade, que acometiam o trato respiratório superior, sendo relatadas complicações apenas em bebês, idosos e imunossuprimidos, porém, o sequenciamento em 7 de janeiro de 2020 do coronavírus como agente causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SDRA) mudaria essa realidade (Hasoksuz et al. 2020).

O primeiro surto de coronavírus como um agente patogênico potencialmente perigoso à vida humana ocorreu em novembro de 2002 na cidade de Foshan, China. Conhecido como SARS-CoV, afetou 28 países com 8.096 casos e 774 mortes. Os morcegos do Gênero *Rhinolophus* foram implicados como reservatórios e foram descritas infecções em civetas de palmeiras mascaradas (*Paguma larvata*), cão-guaxinim (*Nyctereutes procyonoides*) e furões chineses (*Melogale moschata*), considerados hospedeiros acidentais (Hu et al. 2021).

Em junho de 2012, houve o surgimento do vírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), em Jeddah, Arábia Saudita. Essa enfermidade apresentou, em humanos, taxa de mortalidade de 35% e foi descrita em 27 países. Os dromedários (*Camelus dromedarius*) foram implicados como um reservatório viral devido à alta soroprevalência nos animais da região (Kirtipal et al. 2020).

Em dezembro de 2019, na China, cidade de Wuhan, foi relatado um quadro respiratório atípico em pacientes imunocompetentes, que constituía de febre, mal-estar, tosse seca, dispneia de intensidade leve a grave, sendo inicialmente nominada de Pneumonia de Wuhan (Liu et al. 2020). De dezembro de 2019 a janeiro de 2020 o número de pacientes com pneumonia atípica de causa desconhecida foi de 44 (Hasoksuz et al. 2020).

Em 7 de janeiro de 2020, pesquisadores chineses conseguiram isolar o patógeno viral, até então desconhecido e, em 12 de janeiro, na China, o sequenciamento genético do novo vírus foi realizado e associado à nova enfermidade (Hasoksuz et al. 2020), esse agente foi classificado, dentro do gênero *Betacoronavirus*, subgênero *Sarbecovirus* (Malik 2020). Devido à rápida disseminação da doença para outras cidades chinesas e países, a Organização

Mundial da Saúde (OMS) declarou emergência de saúde global em 30 de janeiro de 2020 e, em 11 de março de 2020 a OMS alterou o *status* de emergência global para pandemia que estende até os dias atuais (Halaji et al. 2020).

Todos os coronavírus conhecidos até hoje, têm animais como hospedeiros naturais. Os morcegos são importantes reservatórios de alfa-coronavírus e beta-coronavírus. O SARS-CoV-2 tem semelhança genômica de 96,2% com o vírus Bat-CoV RatG13, detectado em morcego carnívoro da espécie *Rhinolophus affinis*, na província de Yunnan, próxima da cidade de Wuhan. Similaridade gênica acima de 90% também foi encontrada com outro vírus relatado na espécie de morcego *Rhinolophus malayanus* indicando que esses animais podem ser os prováveis reservatórios SARS-CoV-2, mas não é possível afirmar se ocorreu transmissão direta para humanos ou se existiram hospedeiros intermediários que facilitaram a transmissão entre animais e humanos (Liu et al. 2020; Hu et al. 2021).

Outros animais da vida selvagem investigados como possíveis integrantes da cadeia epidemiológica do SARS-Cov-2 foram os pangolins (*Manis* spp.), mamíferos que habitam a região sul da Ásia e África que carregam um coronarivus com similaridade de 94,2% com o SARS-CoV-2, dependendo da região gênica estudada. Ao contrário dos morcegos, que não apresentam doença pelos coronavírus, os pangolins infectados apresentam sinais clínicos e alterações histopatológicas como pneumonia intersticial e infiltração de células inflamatórias em múltiplos órgãos, no entanto, até o momento, apesar das semelhanças genéticas, não há evidência de que esses animais estão envolvidos no surgimento do SARS-CoV -2 (Hu et al. 2021).

Não se pode afirmar até o momento a verdadeira origem viral, muito se especula sobre a existência de um hospedeiro intermediário que possibilitou à ligação entre o reservatório animal e o ser humano (Fig.1). A preocupação com a possível participação de animais surgiu desde os primeiros pacientes chineses com a enfermidade, pois eram pessoas que tiveram passagem pelo mercado de peixes e animais da região de Wuhan (Holmes et al. 2021). Após o fechamento desses mercados, o vírus foi detectado em amostras ambientais coletadas, com maior expressividade, na seção que vendia animais selvagens e insumos para animais domésticos, mas não foi possível a detecção do vírus nas carcaças dos animais

comercializados, entretanto, nem todos os animais suscetíveis foram incluídos, como o cão guaxinim (*Nyctereutes procyonoides*) (Holmes et al. 2021).

Os mercados de animais vivos propiciam um ambiente favorável à emergência de doenças zoonóticas, uma vez que há a aglomeração de diferentes espécies domésticas e selvagens que em ambiente natural não teriam contato por habitar distintos ecossistemas. Com isso há a criação de condições para que um patógeno encontre novas possibilidades de indivíduos suscetíveis à infecção. Hoje, pode se considerar que um coronavírus ancestral se disseminou em diferentes espécies até que uma linhagem viral evoluiu para o SARS-CoV-2, porém até o momento não foi identificado quando isso ocorreu, nem os animais envolvidos nesse processo (Galindo-González 2022). Embora o reservatório animal do SARS-CoV-2 não tenha sido estabelecido, há muitas evidências que suportam sua origem zoonótica (Holmes et al. 2021) e a necessidade de implementação da vigilância do coronavírus na vida selvagem para tentar evitar futuras pandemias e elucidação da sua real origem são necessárias (Holmes et al. 2021; Frutos et al. 2021).

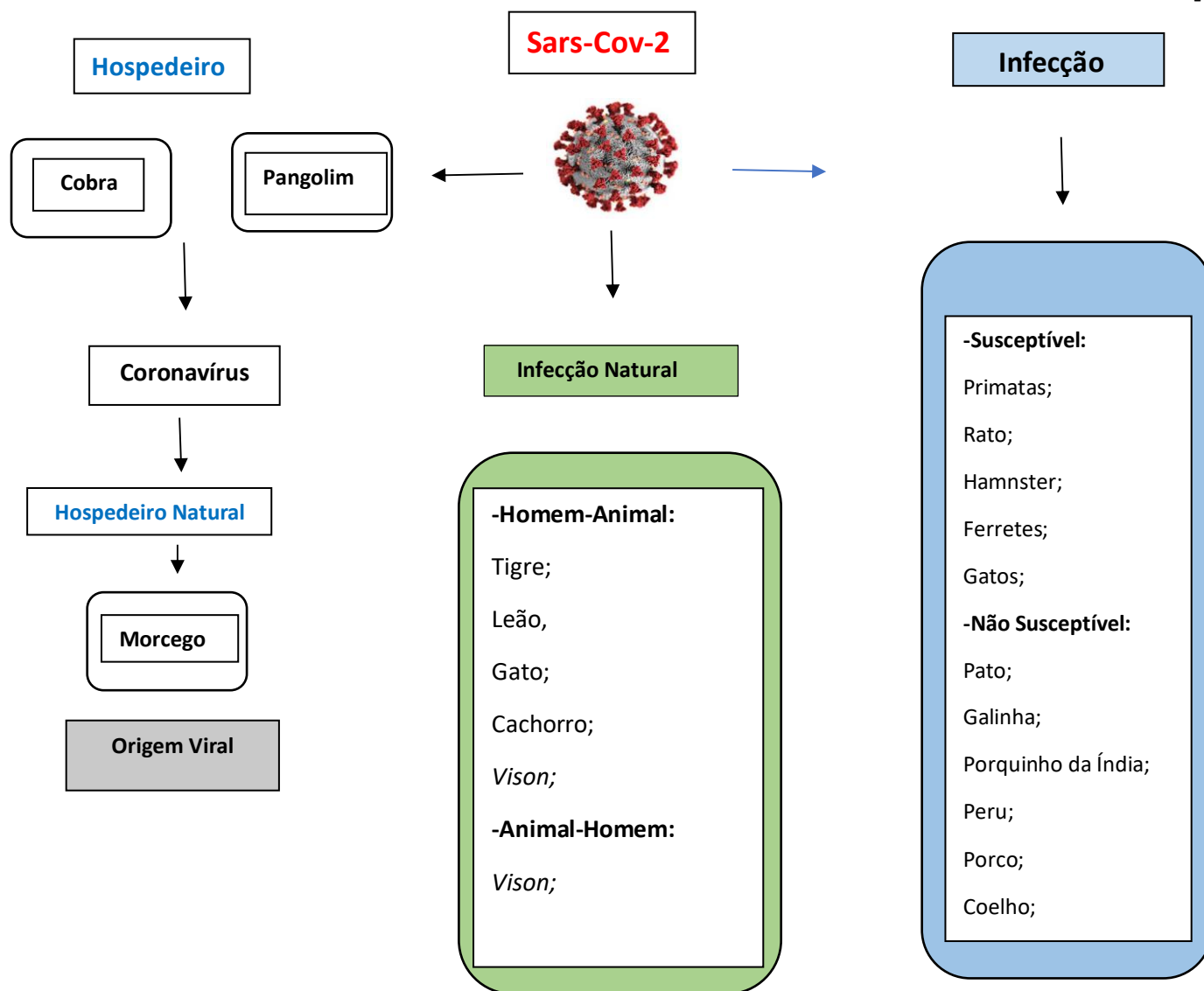


Figura 1. Possível origem do Sar-Cov-2 e infecções relacionadas.

Desde seu surgimento, muitas mutações foram encontradas no genoma no SARS-CoV-2. Foi estimado uma taxa de $1,1 \times 10^3$ substituições de nucleotídeos por sítio por ano, e as regiões S, N, ORF1ab e ORF8 possuem maior taxa (To et al., [s.d.]). Essas variações podem mudar a capacidade de transmissão, patogenicidade e levar a diminuição da eficácia vacinal. Foram identificadas em torno de 351 variantes em mais de 40 países pelo mundo (Singh, Parveen, Yadav 2021). Um exemplo dessa foi o aparecimento da variante Omicron, que apresentam mutações nas proteínas Spike, nsp12 e nsp14 e a variante Delta SARS-CoV-2 que surgiu na Europa (Gusev et al. 2022). Em relação aos animais, a variante Delta esteve presente em todas as espécies portadoras que foram sequenciadas. Nos gatos,

além dessa variante foi descrita infecção por Alpha, Delta, Gamma, Lambda e Omicron, enquanto nos cães apenas Alpha, Delta e Omicron foram encontradas (Cui et al. 2022).

1.2. SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado, de fita RNA simples de sentido positivo, com comprimento que varia de 26,0 kb a 21 kb (Arya et al. 2020). O genoma do SARS-CoV-2 apresenta 82% e 90% de identidade com SARS-CoV e MERS-CoV, respectivamente (NAQKI 2020). O vírus possui 14 fases abertas de leitura (ORFs) (Wang et al. 2020), dois terços são responsáveis por traduzir proteínas não estruturais (Nsps) que desempenham papel na replicação e montagem do vírus. O restante das ORFS codifica proteínas estruturais virais, Espículas (S), Membrana (M), Envelope (E), Nucleocapsídeo (N) e proteínas acessórias (ORF3a, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF14 e ORF10) (Fig. 2) (Arya et al. 2020).

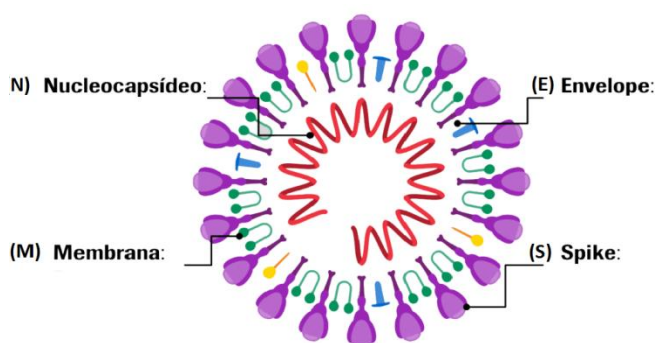


Figura 2. Representação do SARS-Cov-2 e as proteínas estruturais que o compõe. (Arya et al. 2020)

A proteína S determina a capacidade do vírus se ligar a célula hospedeira. Ela é formada pelas subunidades, a) S1, responsável pela ligação do vírus à célula do hospedeiro e b) S2, responsável pela fusão do vírion na membrana celular, portanto,

possíveis mutações nessas estruturas afetam a capacidade de ligação do patógeno ao hospedeiro interferindo na sua infectividade. A proteína M é a mais abundante das proteínas estruturais, ela facilita a montagem molecular das partículas virais. A proteína E é a menor de todas as proteínas estruturais e desempenha um papel importante na patogênese, montagem e liberação do vírus nas células infectadas. Já a proteína N participa do empacotamento do RNA viral (Naqvi et al. 2020).

A fixação do vírus na célula hospedeira ocorre por meio da ligação subunidade S1 do domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína S no receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE 2) presente na superfície da membrana das células do hospedeiro. A clivagem da “proteína S” ocorre pela ação de proteases do hospedeiro, entre elas a serinoprotease transmembrana 2 (TMPRSS2), catepsina L e furina (Hu et al. 2021). Após essa ligação e clivagem, há a liberação do RNA viral no citoplasma e tradução pelos ribossomos do hospedeiro formando as proteínas pp1a e pp1ab. Essas proteínas sofrem ação das proteases virais PLpro e Mpro resultando em proteínas não estruturais Nsp1-16. Os Nsps e outros fatores se agrupam e formam o complexo do retículo endoplasmático dentro da célula infectada (Arya et al. 2020).

Dentro do complexo do retículo endoplasmático formado, o Nsp12-16 desempenham funções enzimáticas para que ocorra a replicação e transformação do genoma viral. Inicialmente, ocorre a replicação da fita de RNA (+) na fita RNA (-), posteriormente a fita negativa será utilizada para a replicação em cadeia de RNA (+) para montagem de um novo vírion ou transcrição de mRNAs sub-genômicos. Os mRNA sub-genômicos são traduzidos nas proteínas estruturais S, M, E, N e acessórias. As proteínas S, M, e E penetram o retículo endoplasmático e as proteínas N se ligam à fita de RNA genômico (+) para produzir um complexo de nucleoproteínas que junto com as proteínas estruturais migram para o compartimento do retículo endoplasmático intermediário de Golgi (ERGIC) onde os vírions se reúnem, amadurecem e saem de ERGIC em forma de vesículas. As vesículas são liberadas para o meio extracelular por exocitose permitindo que novos vírions infectem novas células e ocorra a disseminação da infecção (Fig.3) (Arya et al. 2020).

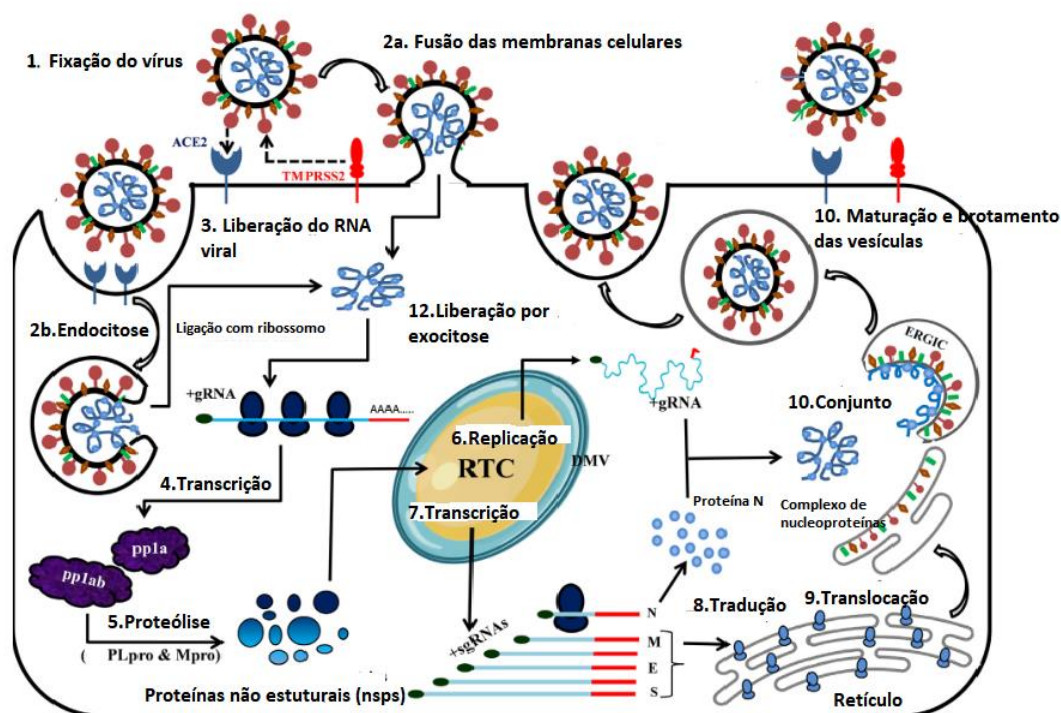


Figura 3. Ciclo de replicação do SARS Cov-2 dentro da célula hospedeira (Arya et al. 2020).

Na maioria dos patógenos virais, a replicação no organismo é inibida após seu reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro, através dos padrões de reconhecimento (PRRs). Os PRRs têm a função de induzir a produção de Interferon tipo I (IFN-I) estimulando, desse modo, a ação do fator de transcrição fator nuclear- κ B (NF- κ B), que possui a capacidade de incitar a ação de citocinas pró inflamatórias e produzir de proteínas anti-virais com capacidade restringir a multiplicação dos vírus. Entretanto, os coronavírus (COVs) têm a capacidade de inibir a detecção dos mecanismos de reconhecimento do hospedeiro causando uma menor produção de (IFN-I) e como consequência altas taxas de replicação são geradas levando a disseminação o viral (Kirtipal et al. 2020). Entre as funções de escape, pode-se citar o armazenamento do RNA viral dentro de vesículas de membrana dupla que impede na sua exposição aos PRRs e o sequestro e destruição ativa de reguladores do sistema imunológico ou alterar outras etapas de produção e efetividade da ação do IFN (Kindler et al. 2016).

1.3. Patogênese

Após o reconhecimento do agente, ocorre o início da imunidade humoral pelas células T (CD4+ e CD8+) para combater diretamente o vírus pela ativação de uma complexa cadeia de citocinas pró-inflamatórias e ação de macrófagos, principalmente. Concomitantemente há a produção de anticorpos por células B na tentativa de eliminar o vírus, porém, já foi relatado que pacientes infectados por SARS-CoV-2 podem apresentar menor número de células T CD4+ e CD8+ no sangue periférico levando desse modo a diminuição da capacidade de defesa do organismo à doença (Kirtipal et al. 2020).

A capacidade do vírus infectar a célula está relacionada à presença do receptor ACE2 na superfície celular do hospedeiro e a ação das proteases que clivam a proteína S permitindo a penetração viral. No organismo humano, observa-se maior número de receptores ACE2 nos pneumócitos tipo II presentes no epitélio alveolar pulmonar, no tecido do trato respiratório superior e em menor número nos enterócitos intestinais (Harrison et al. 2020).

Os pneumócitos tipo II são responsáveis pela produção do fator surfactante, uma lipoproteína presente na superfície dos alvéolos. Essa proteína reduz a tensão superficial alveolar, relaxa as vias aéreas formadas pelo músculo liso, facilitando assim as trocas gasosas. O fator surfactante também forma uma barreira protetora junto com as células epiteliais e endoteliais do pulmão contra agentes bacterianos, virais e fúngicos. Quando o SARS-CoV-2 se liga aos pneumócitos tipo II, há um déficit da produção do fator surfactante levando ao aumento da superfície de tensão pulmonar, edema alveolar e atelectasia. Desse modo, a homeostasia e a capacidade de trocas gasosas se tornam ineficazes levando a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) (Calkovska et al. 2021).

Apesar da patogênese não ser totalmente compreendida após a infecção, a ativação dos macrófagos acarreta o início da transcrição viral e da síntese de proteínas virais dentro dessas células infectadas. O RNA de fita dupla é um potente indutor de IFN- β , dando assim início às vias de sinalização celular (Cheung et al. 2005). Com isso há o início uma reação imunológica grave com excessiva liberação de citocinas pró-inflamatórias, entre elas, IFN- α , IFN- γ , IL -1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-33, TNF- α , TGF β , além de quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9,

CXCL10. Esse evento, onde os mediadores inflamatórios ficam desregulados, é denominado “tempestade de citocinas” e danificam ainda mais o revestimento das células epiteliais, quando chegam à circulação sanguínea, causam danos a outros órgãos (Samudrala et al. 2020).

1.4. COVID-19 em humanos

A transmissão do vírus entre seres humanos ocorre, principalmente, pela forma direta, através de gotículas e aerossóis respiratórios de pessoas infectadas sintomáticas, pré-sintomáticos ou assintomáticas para a doença COVID-19. A transmissão indireta que ocorre por fômites é relatada, porém experimentos recentes apontam que os valores de carga viral para contaminar o ambiente e objetos por tempo significativo são muito altos, sendo possível reproduzir esse evento apenas experimentalmente (Goldman 2020). Atualmente, a via oral-fecal está sendo sugerida, uma vez que pacientes apresentaram PCR positivo para SARS-COV-2 em material coletado por swab retal (Harrison et al, 2020). O período de incubação médio é de 5 a 6 dias, mas podendo chegar, em alguns casos, a 14 dias (Lauer et al. 2020).

Os sintomas clínicos, mais frequentes, são febre, tosse, fadiga, falta de ar, dor de garganta, congestão nasal, anosmia, ageusia (Chams et al. 2020), sendo descritos também dor abdominal, vômito e diarreia (Parasher 2021). Em torno de 80% dos indivíduos doentes apresentam doença de grau leve, 15% desenvolvem doença grave com dispneia, hipóxia, alteração nos exames de imagem dos pulmões, 5% desenvolvem a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) e 5% dos pacientes em estado grave apresentam choque e/ou disfunção de múltiplos órgãos (Rahman et al. 2020).

As complicações clínicas são mais observadas em pessoas na faixa etária de 49 a 56 anos, com aumento significativo de letalidade a partir dos 80 anos e/ou na presença de comorbidades como hipertensão, diabetes, doença cardíaca coronária (Rahman et al. 2021). Em um acompanhamento de 52 pacientes com doença grave foi observado que a maioria apresentou lesões sistêmicas importantes, sendo que 67% desenvolveram SDRA, 29% lesão renal aguda, 23% lesão cardíaca, 29%

disfunção hepática e 2% pneumotórax. Desse grupo, 71% necessitaram de ventilação mecânica (Yang et al. 2020).

Apesar das possíveis complicações, a taxa de mortalidade da COVID-19 foi estimada, até o ano de 2021, em torno de 2,13% nos pacientes sintomáticos e seu alto número absoluto de mortes é decorrente do tamanho da população humana e sua fácil disseminação na espécie (Frutos et al. 2021).

Os pacientes podem apresentar leucograma normal, leucocitose ou linfopenia, nos casos de pior prognóstico. Aumento dos níveis de lactato desidrogenase, proteína C reativa, creatinina quinase, ureia, aspartato aminotransferase, dímero D e a relação da razão neutrófilo-linfócito pode estar elevada. Os casos graves podem apresentar distúrbios de coagulação com aumento de protrombina, diminuição de fibrinogênio e antitrombina, levando o indivíduo ao quadro de coagulação intravascular disseminada (CID) (Chams et al. 2020).

A presença de viremia, em pacientes humanos, está correlacionada a gravidade da enfermidade e prognóstico reservado (Chen et al. 2020; Hogan et al. 2020; Xu et al. 2020, Jacob et al. 2022). Em um estudo realizado em 121 adultos com viremia, a média de tempo para a depuração viral foi de 15 dias após o início dos sintomas. Foi correlacionado que para cada dia adicional de viremia, as chances de mortalidade aumentavam em 40% (Hagman et al. 2021). Essa hipótese também foi sugerida por Tan et al. (2020) que relatou diferença na evolução do quadro clínico entre pacientes com e sem detecção viral. Pacientes sem presença de RNA viral no sangue após 3 dias do primeiro teste, tiveram cura clínica, o mesmo não ocorreu em pacientes que apresentaram reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) positiva durante 10 dias e evoluíram para disfunção múltipla de órgãos seguida de óbito.

Ao investigar a presença de RNA viral em sangue de doentes, foi observada sua presença em 100% dos 23 pacientes tratados na Unidade de Tratamento Intensa (UTI), nos de enfermaria e ambulatório os resultados foram de 52,6% (10/19) e 11,1% (1/9) respectivamente, indicando que os níveis de RNA viral de SARS-CoV-2 correlacionam-se fortemente com a gravidade da doença. Foi observado também que nos pacientes internados na UTI foi constatado valores mais elevados das interleucinas (IL) 6, IL-8, IL-10, procalcitonina, supressão de tumorigenicidade (ST)-2

e pentraxina-3 e maiores valores de cópias de RNA viral em comparação aos outros pacientes de curso mais brando da COVID-19 (Jacobs et al. 2022).

Discordando dos estudos anteriores, Jarhult et al. (2021) afirmaram que não ocorreu associação da viremia com a gravidade da enfermidade após observar que pacientes instalados em UTI com quadro virêmico não tinham alterações significativas nos parâmetros de hemograma, proteína C reativa plasmática, procalcitonina, IL-6, dímero d de fibrina, troponina e pró-peptídeo natriurético cerebral-NT, creatinina plasmática e cistatina C, bilirrubina plasmática, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP).

Até o momento, existem poucos estudos sobre a viremia do SARS-CoV-2 no sangue de doentes, a maioria das pesquisas aborda o teste RT-PCR no trato respiratório ou gastrointestinal (Tan et al. 2020). Para melhor compreensão, trabalhos que utilizem cultura do vírus no sangue, pesquisa sobre sua infectividade e presença de replicação viral em células infectadas são necessários (Hagman et al. 2021).

1.4.1. Diagnóstico laboratorial em humanos

Entre os exames complementares para o diagnóstico de COVID-19 a radiografia de tórax, em casos iniciais, não apresenta alteração, mas conforme a progressão da doença, observa-se opacificação alveolar multifocal e, em alguns casos, associação com derrame pleural. Já a tomografia computadorizada, do tórax, apresenta alterações nos estágios iniciais, quando há pneumonia por COVID-19. A lesão geralmente observada é de áreas unilaterais ou bilaterais em “vidro fosco” ou também o “sinal de halo invertido”, que se trata de uma opacificação focal irregular delimitada por um anel periférico com consolidação (Boger et al. 2021). Outros achados também incluem derrame pleural, cavitação, calcificação e linfadenopatia (Parasher 2021). Por um período, a tomografia foi considerada um método adequado para diagnóstico da COVID-19, entretanto, pneumonias causadas por outros agentes virais como MERS-CoV, SARS-CoV e influenza podem gerar imagens semelhantes ao SARS CoV-2 resultando em um diagnóstico falso-positivo (Boger et al. 2022; Yuce et al. 2020).

A Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é o teste laboratorial considerado o padrão ouro para diagnóstico da COVID-19. Essa técnica é capaz identificar regiões gênicas do vírus em amostras de escarro, lavado broncoalveolar e suabe naso-faríngeo. Nesse método, inicialmente ocorre a conversão do RNA viral em DNA complementar seguido de sua amplificação de regiões específicas do SARS CoV-2. A sensibilidade analítica varia de acordo com a concentração de RNA da amostra e pacientes podem apresentar falso negativo nos primeiros dias de infecção (Yuce et al. 2020).

A RT-PCR é importante para o diagnóstico dos casos suspeitos, entretanto, exige mão de obra qualificada, materiais e infraestrutura de alto valor, além de um intervalo de tempo de 4 a 6 horas para ser concluído, dificultando, desse modo, seu uso para vigilância e notificação em grande escala de novos casos da doença (Rai et al. 2020). Além disso, a sua confiabilidade e sensibilidade analítica e diagnóstica vai depender da qualidade do material de RNA de cada amostra necessitando em alguns casos realizar a sua repetição para confirmação do diagnóstico (Yuce et al. 2020).

Outros métodos diagnósticos direto que podem ser utilizados são os testes “*point of care*” denominados de Imunoensaio de Fluxo Lateral (POC), que são dispositivos onde o resultado é obtido entre 5 a 15 minutos após reação de antígeno-anticorpo. Esses testes podem apresentar variação de sensibilidade entre 87,2% a 100% e a especificidade de 99,5% a 100% de acordo com fabricante utilizado (Yuce et al. 2020). Eles estão sendo amplamente utilizados e podem ser realizados fora de laboratórios de análises clínicas, sendo outra ferramenta importante para a vigilância epidemiológica. Há diferentes tipos de exames que podem ser usados como auxiliar no diagnóstico na enfermidade com diferentes sensibilidades, especificidades diagnósticas e indicações, entretanto, isso não exclui a necessidade da junção dos sintomas apresentados pelo paciente, epidemiologia do local, alterações laboratoriais e exames de imagem para o diagnóstico adequado da COVID-19 (Rai et al. 2020).

Os exames sorológicos são capazes de detectar anticorpos específicos para SARS-CoV-2. O teste mais comum é teste imunoenzimático (ELISA), capaz de detectar imunoglobulinas IgM quando há infecção recente ou IgG quando houve

contato prévio, ou seja, informa a ocorrência de doença ativa ou exposição passada, respectivamente. A duração média para a detecção de anticorpos IgM é de 5 dias e IgG, 14 dias, apresentando menor sensibilidade analítica em comparação com a RT-PCR (Rai et al. 2020). Em um estudo comparativo entre as duas técnicas observou-se que a sensibilidade do teste sorológico aumentou conforme passavam os dias após o início dos sintomas ao contrário da PCR, cuja sensibilidade é maior no início dos sintomas (Miller et al. 2020), ou seja, a PCR é importante por ser capaz de diagnosticar infecções virais precoce permitindo rápido isolamento e tratamento do paciente. Os exames sorológicos são importantes ferramentas de vigilância epidemiológica por possibilitarem diagnóstico de grandes populações, informação sobre exposição ao agente viral e indicar possíveis doadores de imunoglobulinas para o tratamento da doença ao indicar os indivíduos que apresentam concentrações significativas de IgG no plasma sanguíneo (Rai et al. 2020; Yuce et al. 2020).

1.5. SARs-CoV-2 em outras espécies animais

O SARs-CoV-2 se disseminou rapidamente entre a população humana e existem relatos de grande variedade de espécies susceptíveis a infecção. A ausência de uma cadeia epidemiológica definida gera preocupação sobre o papel dos animais selvagens e domésticos na propagação viral. A presença do receptor ACE2 no hospedeiro é um fator determinante para entrada do patógeno na célula e estudos sugerem que esse receptor está presente em peixes, anfíbios, pássaros e mamíferos indicando que a infecção celular pelo SARS-CoV-2, teoricamente, pode ocorrer (Mahdy et al. 2020). Foi proposto que a família *Felidae* tem maior suscetibilidade à infecção devido a semelhança genética com o receptor ACE2 dos humanos. O ACE2 dos humanos difere apenas 14,2% do ACE2 do gato doméstico e 13,8% dos ACE2 do tigre. Já os cães, aparentemente, apresentam menor risco à infecção devido à baixa concentração do receptor nas células do trato respiratório com divergência em 5 aminoácidos que formam o ACE2 humano (Giraldo-Ramirez et al. 2021; Helio et al. 2020).

O vírus já foi detectado em 30 espécies de animais, incluindo de estimação (cão, gato, furão e hamster), de cativeiro (tigre, leão, leopardo da neve, puma, lince,

gato pescador, hiena, lontra hipopótamo, gorila, urso, gato asiático, quati), de criação (*Neovison vison*) e selvagem (veado, lontra, felinos e martas) (SARS-ANI VIS 2022), incluindo sequência gênica do SARS-CoV-2 disponíveis para os animais mencionados acima, exceto para o quati, lince e puma (Cui et al. 2019).

Os furões são utilizados como modelo de estudo para infecções não apenas do coronavírus, mas também de outras infecções respiratórias virais (Shi et al. 2020). O hamster demonstrou ser sensível a infecção após testes de inoculação intranasal. Nesses animais, o vírus foi capaz de se replicar e desenvolver doença pulmonar grave semelhante ao que ocorre no humano, permitindo assim que ele também desempenhe papel de modelo para o estudo dos efeitos do vírus no organismo (Imai et al. 2020).

Um dos primeiros casos de transmissão homem-animal foi confirmado no Zoológico do Bronx, localizado na cidade de Nova York, após investigação epidemiológica e genômica. Nessa ocasião, quatro tigres e três leões que apresentaram sinais respiratórios de grau leve a intenso foram investigados para SARS-CoV-2, uma vez que alguns tratadores ficaram doentes. Todas as amostras fecais coletadas dos animais foram positivas no método RT-PCR assim como as amostras nasal, orofaríngea e lavado traqueal de um dos tigres (Mcaloose et al. 2020). Ao analisar essas amostras relatou-se que a sequência genômica viral dos tigres eram iguais de um tratador e de outras estirpes detectadas na cidade de Nova York, enquanto os leões tinham sequências de SARS-CoV-2 mais divergentes das sequências provenientes dos tratadores dos tigres. Apesar disso, as associações genômicas encontradas, a proximidade dos funcionários com os animais, a ausência de equipamentos de proteção no mesmo período indicam a transmissão homem animal dentro do zoológico.

O SARS-CoV-2 também foi relatado em uma fazenda de vison (*Neovison vison*) na Holanda e, posteriormente, se expandiu para outras criações na Dinamarca, EUA, França, Grécia, Itália Espanha, Suécia, Polônia e Canadá. Os animais da criação possuíam a capacidade de disseminação não apenas interespecie, mas também a aptidão de transmitir para humanos. O SARS-CoV-2 do vison possuía mutações na principal estrutura responsável pela suscetibilidade a infecção na célula, a proteína Spike o que levou as autoridades da Dinamarca a realizar o abate desses animais de todas as fazendas do país, já que essa mutação

poderia gerar um potencial impacto sobre a contagiosidade, patogenicidade e a possibilidade de reinfecção com diferentes mutantes gerados, o que a longo prazo poderia influenciar na eficácia vacinal e de outras imunoterapias (Fonollar et al. 2021).

Em gatos domésticos, avaliou-se a titulação de IgG de 3 felinos saudáveis inoculados via nasal e 3 felinos contactantes, sem doença prévia, nos dias seguintes ao contato. Amostras coletadas ao longo de 5 dias indicaram soroconversão, apesar de não serem detectados vírus nos contactantes (Halfmann et al. 2020).

Em outro estudo, as alterações histopatológicas, hematológicas, titulação e testes moleculares também foram investigados em gatos inoculados experimentalmente. Durante o acompanhamento, os animais não apresentaram sinais clínicos de doença, nem alterações hematológicas significativas, entretanto, RNA viral foi detectado em suabes nasais, orofaríngeos e retais nos dois grupos. Nos tecidos coletados, após a morte, houve detecção do material genético nos tecidos nasais, traqueia brônquios e lobos pulmonares. Presença de anticorpos neutralizantes foi detectado em todos os animais 7, 14 e 21 dias após inoculação com títulos variando entre 20 e 320. Na análise, o trato respiratório apresentou diferentes graus e distribuição de edema, congestão e atelectasia, enquanto histologicamente, as alterações foram limitadas às vias aéreas superiores e inferiores. Após 21 dias de inoculação, os animais estudados apresentaram alterações histológicas significativas no trato respiratório (Gaudreau et al. 2020).

Em outra ocasião a produção de anticorpos específicos para SARS-CoV-2 também foi encontrada em 2 gatos, cujo tutor faleceu de COVID-19. Um dos animais também apresentou positividade em RT-qPCR em suabes nasais e linfonodo mesentérico. Nesse relato de caso, apesar desse animal apresentar sinais clínicos de dispneia, sibilos respiratórios e necessitar ser eutanasiado, a etiologia dos sintomas foi atribuída a cardiopatia hipertrófica, diagnóstica no atendimento veterinário (Segalés et al. 2020).

A infecção natural por SARS-CoV-2 também foi relatada em 2 cães domésticos cujo tutor foi diagnosticado com COVID-19. Foi possível a detecção de material genético em material colhido através de suabe nasal e oral e os animais apresentaram títulos de anticorpos altos, porém nenhum dos animais desenvolveu

sinais clínicos da doença no período de observação, apesar de um cão morrer 16 dias pós exposição devido a doenças preexistentes (Sit et al. 2020).

A fim de verificar a exposição de maior número de animais, estudos que foquem na realização dos inquéritos sorológicos são necessários. Nos Estados Unidos, um total de 1336 cães e 956 gatos de 48 estados foram testados para de SARS-CoV-2 no ano de 2020 por ELISA, desses animais, 11 felinos foram classificados como soropositivos e 2 inconclusivos, enquanto 5 cães foram positivos e 5 suspeitos (Barua et al. 2021).

No Brasil, já houve descrição de infecção por SARS-CoV-2 em sagui-do-cerrado em Cuiabá (Pereira et al., 2022) e, em gatos, no Pernambuco (Epifânio et al. 2021). Os gatos descritos eram assintomáticos e estavam em contato muito próximo com pessoas infectadas, dividindo os mesmos espaços e interagindo sem nenhuma proteção. O autor sugere, a possibilidade desses animais desempenharem o papel de sentinelas, em casos em que há o convívio com humanos portadores, pois apresentam pouco risco de transmissão para humanos, uma vez que não foi demonstrado o contágio das pessoas saudáveis pelos felinos (Epifânio et al. 2021). Em outro estudo, o risco de transmissão zoonótica do gato doméstico foi classificado como insignificante ou muito baixo, de acordo com a intensidade do contato entre eles apesar do felino apresentar aerossóis e fezes potencialmente infecciosas. Entre as explicações possíveis para esse baixo risco se deve ao fato do volume respiratório por minuto do felino ser apenas 10% ser humano (Allendorf et al. 2022).

O Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) dos EUA afirma não haver evidências de que os animais de companhia desempenhem um papel significativo na disseminação do SARS-CoV-2 para a população humana e recomenda que os animais suspeitos sejam testados e os infectados isolados, em casa, quando não necessitarem de tratamento veterinário. Além disso, aponta a importância da notificação aos órgãos governamentais e a necessidade de investigações epidemiológicas (CDC 2020).

2. Objetivo

2.1. Objetivo Geral:

Monitorar o SARS-Cov-2 em amostras de sangue de cães e gatos enviados para hemograma por diversas causas durante um ano pandêmico.

2.2. Objetivos específicos:

Pesquisar a presença de SARS Cov-2 em cães e gatos em amostras de sangue enviadas para hemograma através da RT-PCR.

3. Materiais e Método

3.1. Comissão de Ética de Uso em Animais (CEUA)

O projeto foi submetido ao CEUA e recebeu o parecer de DISPENSA (65/2021).

3.2. Amostras Clínicas.

Amostras de sangue total congeladas de cães e gatos enviadas para hemograma, durante o ano de 2021, foram doadas por um laboratório privado do estado de São Paulo. Os animais tinham diversas idades, raças e suspeitas clínicas. Foi realizada uma amostragem de conveniência.

3.3. Extração de RNA e síntese de cDNA:

A extração de RNA das amostras foi realizada através do reagente TRIzol® (Termofisher). Duzentos e cinquenta microlitros da amostra foram adicionadas a 750 µL de Trizol® e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Foram, então,

adicionados 200 µL de clorofórmio, homogeneizados e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado a 12.000xg/5 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro microtubo e adicionado volume igual de isopropanol gelado, permanecendo a -20°C por 10 minutos, então, centrifugou-se a 12000xg/10 min a 4°C para precipitação do RNA. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol a 75%, secado e diluído em 20 µL de água DEPC.

3.4. Detecção de SARS-COV-2

Foi realizada a triagem das amostras com kit comercial 2019 -nCov assay (Allplex™) num termociclador 7500 Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific).

O Kit tem como mecanismo a detecção dos genes RdRP e N. E as amostras são consideradas positivas quando um desses elementos são detectados com limite de 20 (TCID₅₀/mL). E no kit comercial há um controlo negativo e positivo endógeno.

4. Resultados

Do material coletado, um total de 937 amostras de sangue total de cães e gatos foi separado. Foram realizados 486 testes de Real-Time PCR que foram negativas para a presença do RNA viral.

5. Discussão

O nosso estudo permitiu monitorar a presença do vírus em sangue de cães e gatos em um ano pandêmico, no qual haviam muitos casos humanos registrados da doença COVID-19. No Brasil, a vigilância do SARS-CoV-2 por meio de RT-PCR de sangue de 69 cães e 56 gatos de diferentes regiões do país foi realizada, e assim como em nosso trabalho os animais selecionados tinham diferentes idades e sintomas clínicos e obtiveram também resultados negativos em seus testes, inclusive gatos diagnosticados com Coronavírus Felino (Carvalho et al. 2021).

A ausência de cães e gatos positivos no teste molecular pode ser explicada por diferentes razões, entre elas, a diferença genética existente entre os receptores ACE2 do humano e animais, uma vez que é o principal responsável pela ligação do vírus à célula do hospedeiro (Giraldo-Ramirez et al. 2021; Helio et al. 2020) dificultando, portanto, a infecção das células do hospedeiro. Além disso, o teste molecular utilizado poderia não ser o indicado para a detecção do RNA viral no momento da coleta de material, uma vez que esses animais foram selecionados aleatoriamente em relação a sinais clínicos e estado de saúde. Assim, o acréscimo da sorologia seria uma ferramenta importante para melhor vigilância do grupo abordado, nesse período, em que possivelmente foram expostos ao vírus.

Nos Estados Unidos, ao avaliar 119 cães e 57 gatos Meisner et al. (2022) observou a soroprevalência significativa de 81 cães e 57 gatos, e 4 cães e 3 gatos positivos no PCR coletado por suabe nasal e retal. Foi observado que a soropositividade no ELISA indireto estava associada a doença uma vez que esses animais apresentavam sinais clínicos da doença e a baixa recuperação pelo teste direto foi devido, provavelmente, ao intervalo entre o contato com a família e a coleta do material, entretanto, apesar desses resultados o risco de transmissão do vírus em ambiente doméstico ficou incerto, sendo necessário um estudo com maior amostragem (Meisner et al., 2022). No nosso trabalho, não foi realizado o contato prévio dos tutores dos animais para saber se havia familiares positivos para COVID, o inquérito foi realizado independentemente da suspeita clínica do animal quanto da situação epidemiológica dos familiares frente a COVID, o que pode explicar os resultados negativos encontrados.

Como limitação desse trabalho, não foi realizado testes indiretos nas amostras trabalhadas, então não foi possível verificar a soropositividade do grupo amostral. Trabalhos que desenvolvem inquéritos sorológicos em cães e gatos já foram realizados. Nos EUA um total de 1336 cães e 956 gatos e no Reino Unido 456 cães e 234 gatos realizaram testes sorológico como uma ferramenta de vigilância epidemiológica, e apesar de alguns resultados detectarem anticorpos, a pequena porcentagem desse número pode indicar a baixa probabilidade dessa população desempenhar papel de reservatórios do vírus (Smith et al. 2021; Sit et al. 2021). Segundo Allendorf et al. (2022) o risco de transmissão zoonótica é baixo ao observar a ausência de infecção em um felino em contato próximo a um humano doente, por

outro lado, Meisner et al. (2022) demonstrou a ocorrência de transmissão entre humanos para cães e gatos através do sorodiagnóstico e, em menor quantidade pela PCR, em famílias em que pelo menos um indivíduo foi positivo para SARS-CoV-2 e que tinham contato íntimo com seu animal de estimação.

A partir dos primeiros casos relatados de animais infectados com o SARS-CoV-2, como ocorreu no Zoológico de Nova York (Mcaloose et al. 2020) e em animais descritos por Segalés et al. (2020) e Sit et al. (2020), fez com que houvesse maior preocupação da importância dessas populações na transmissão do vírus para a população humana ou como reservatórios virais. Até o momento, a maioria dos trabalhos que descreveram maior taxa de transmissão do SARS-CoV-2 de animais portadores para saudáveis foi realizado através de infecções experimentais, pela inoculação viral com altas cargas virais em animais saudáveis e, posteriormente, acompanhados com sorodiagnóstico e teste moleculares periódicos após a introdução dos inoculados em grupos controles, porém essas concentrações não são encontradas naturalmente em aerossóis de indivíduos doentes (Gaudreau et al. 2020, Segalés et al. 2020).

Até o momento, suspeita-se que o risco dos animais se infectarem por pessoas doentes é mais provável no início da infecção devido às maiores cargas viral que os enfermos têm nesse período. Mesmo assim, o que vem sendo observado é a baixa taxa de transmissão do vírus entre humanos para cães e gatos, uma vez que eles apresentam pouca soroconversão ou positividade em diagnósticos moleculares, entretanto, ainda não há estudos epidemiológicos com amostragens significativas para concluir o verdadeiro risco do contato entre esses animais (Morais et al. 2020).

Em nosso trabalho não foi possível detectar animais positivos, porém a necessidade de vigilância desses indivíduos e outros animais foi apontada por Holmes et al. (2021) e Frutos et al. (2021) e as orientações sobre as medidas necessárias, quando um animal de companhia for infectado por SARS-CoV-2 estão disponíveis no site do *Centers for Disease Control and Prevention*.

O centro de pesquisa *Complexity Science Hub* disponibiliza um banco de dados de todos os casos de infecção, as variantes e os sinais clínicos em animais relatados ou notificados ao redor do mundo e apesar dos números aumentarem a

cada dia por meio da confirmação de testes diagnósticos de sorologia, PCR e histopatológico (Barua et al. 2021; Epifanio et al. 2021; Allendorf et al. 2022; Segalés et al. 2020; Sit et al. 2020; Fonollar et al. 2021; Kinoshita, et al. 2020; Mcaloose et al. 2020), em na sua maioria, os animais são assintomáticos ou apresentam sintomas leves.

A ausência de sinais clínico nos faz suspeitar que esses animais naturalmente infectados possuem quadros virêmicos de curtos períodos e de pouca expressividade semelhante aos humanos em que a viremia é diretamente proporcional à gravidade da doença Chen et al. (2020); Hogan et al. (2020); Xu et al. (2020); Jacob et al. (2022) .

Segundo Hasokususz et al. (2020), os coronavírus eram agentes patogênicos de pouca importância para a saúde pública por ocasionarem doenças respiratórias de curso brando. Quando o MERS-CoV e SARS-CoV foram identificados como responsáveis por surtos com quadros mais graves da doença e maior taxa de óbito, essa família ganhou maior destaque. Após o surgimento do SARS-CoV-2, muitas comparações entre esses vírus foram realizadas na tentativa de encontrar uma possível origem viral. Holmes et al. (2021) e Cui et al. (2019) defendem sua origem zoonótica e teorizam que o vírus é resultado de um longo processo evolutivo, envolvendo alterações gênicas, com a participação de um hospedeiro intermediário como também é defendido por Galindo-González (2022), gerando, desse modo, preocupação sobre a interação viral com animais domésticos e selvagens. Devido a maior proximidade dos cães e gatos com o ser humano, principalmente nas chamadas famílias multiespécies, onde o mesmo ambiente e objetos são compartilhados, o receio que essa interação possa alterar a dinâmica de transmissão ganhou importância e vem sendo estudada.

6. Conclusão

Não houve detecção do RNA do SARS-CoV-2 nas amostras de sangue de cães e gatos no ano de 2021, indicando que esses animais não estavam em viremia.

7. Referências

ALLENDORF, V. et al. Does having a cat in your house increase your risk of catching COVID-19? **One Health**, v. 14, p. 100381, 2022.

ARYA, R.; KUMARI, S.; PADEY, B.; MISTRY, H.; BIHANI, S. C.; DAS, A.; PRASHAR, V.; GUPTA, G. D.; HUMAR, M. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 2, p.1-25, 2021.

BARUA, S. et al. Antibodies to SARS-CoV-2 in dogs and cats, USA. **Emerging Microbes & Infections**, v. 10, n. 1, p. 1669–1674, 2021.

BÖGER, B. et al. Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. **American Journal of Infection Control**, v. 49, n. 1, 2020.

CARVALHO, O. V. et al. Retrospective surveillance of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in pets from Brazil. **Veterinary World**, p. 2803–2808, 2021.

CALKOVSKA, A.; KOLOMAZNIK, M.; CALKOVSKY, V. Alveolar Type II Cells and Pulmonary Surfactant in COVID-19 Era. **Physiological Research**, p. S195–S208, 2021.

CDC. **Health Departments**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/animals/toolkit.html#When4a>>. Acesso em: 26 jul. 2022.

CHAMS, N.; CHAMS, S.; BADRAN, R.; SHANS, A.; ARAJI, A.; RAAD.; MUKHOPADHYAY, S.; STROBERG, E.; DUVAK, E. L.; BARTON, L. M.; HUSSEIN, I. H. COVID-19: A Multidisciplinary Review. **Front Public Health**. v.29, p.1-20, 2020.

CHEN X, ZHAO B, QU Y, et al. Detectable serum severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral load (RNAemia) is closely correlated with drastically elevated

interleukin 6 level in critically ill patients with coronavirus disease 2019. **Clin Infect Dis**, v.71, p. 1937-1943, 2020.

CHEUNG, C. Y. et al. Cytokine Responses in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Infected Macrophages In Vitro: Possible Relevance to Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 79, n. 12, p. 7819–7826, 2005.

CUI, S. et al. An Updated Review on SARS-CoV-2 Infection in Animals. **Viruses**, v. 14, n. 7, p. 1527, 2022.

CUI, J.; LI, F.; SHIH, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Microbiology**, v.17, p. 182-192, 2019.

EPIFANIO, I. et al. First report of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection in two asymptomatic cats in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Veterinary World**, p. 2839–2842, 2021.

FONOLLAR, F. et al. Mink, SARS-CoV-2, and the HumanAnimal Interface. **Frontiers in Veterináry Science**, v.12, p. 1-12, 2021.

FRUTOS, R.; PLIEZ, O.; GAVOTTE, L.; DEVAUX, C. A. There is no “origin” to SARS-CoV-2. **Environmental Research**, p. 112-173, 2021.

GAUDREAULT, N. N. et al. SARS-CoV-2 infection, disease and transmission in domestic cats. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 2322–2332, 2020.

GALINDO-GONZÁLEZ, J. Live animal markets: Identifying the origins of emerging infectious diseases. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 25, p. 100310, 2022.

GIRALDO-RAMIREZ, S. et al.. SARS-CoV-2 Clinical Outcome in Domestic and Wild Cats: A Systematic Review. **Animals**, v. 11, n. 7, p. 2056, 2021.

GOLDMAN, E. Exaggerated risk of transmission of COVID-19 by fomites. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 8, jul. 2020.

GUSEV, E. et al.. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1716, 2022.

HALAJI, M.; FARAHANI, A. RANJBAR, R.; HEIA, M.; DEHKORDI, F. S. Emerging coronaviruses: first SARS, second MERS and third SARS-CoV-2. **Le Infezioni in Medicina, Suppl**, v. 1, p. 6-17, 2020.

HALFMANN, P. J.; HARRA, M.; CHIBA, S.; MAEMURA, T.; FAN, S.; KINOSHITA, M.; HATTORI.; TAGAWA, Y. S.; HORIMORO, K. I.; IMAI, M.; KAWAOKA, Y. Transmission of SARS-CoV-2. **Domestic Cats. New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 6, p. 592–594, 2020

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends in Immunology**, v.21, n.12, p. 1100-1115, 2020.

HASÖKSÜZ, M.; KILI, S.; SARA. Coronaviruses and SARS-COV-2. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 50, p. 550-554, 2020.

HAGMAN, K.; HEDENSTIERNA, M.; RUDLING, J.; JHONSON, P. G.; HAMMA, B.; GRABBE, M.; JAKOBSSON, J.; DILNER, J.; URSING, J. Duration of SARS-CoV-2

viremia and its correlation to mortality and inflammatory parameters in patients hospitalized for COVID-19: a cohort study. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 102, n. 3, p. 115595, 2022.

HOGAN, C. A, Stevens BA, Sahoo MK, et al.. High frequency of SARS-CoV-2 RNAemia and association with severe disease. **Clin Infect Dis**, v. 72, p.291205, 2020.

HOLMES, E.; GOLDSTEIN, S. A.; RASNUSSEN, A. L.; ROBERTSON, D. L.; CHRISTOPH, A. C.; WERTHEIM, J. O.; ANTHONY, S.J.; BARCLAY, W. S.; BONI, M. F.; DOHERTY, P. C.; FARRAR, J.; GEOGHEGAN, J. L.; JIANG, X.; LEIBOWITZ, J. L.; NEIL, S. J. F.; SKERN, T.; WEISS, S. R.; WOROBEY, M.; ANDERSEN, K. G.; GARRY, R. F.; RAMBAUT, A. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. **Cell**, v. 184, n. 19, p. 4848–4856, 2021.

HU, B.; GUO, H.; ZHOU, P.; SHI, Z. L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature**, v. 19, p. 836-848, 2021.

IMAI, M. et al.. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 28, p. 16587–16595, 2020.

JACOBS, J. L.; BAIN, W.; NAQVI, A.; STAINES, B.; CASTANHA, P. M. S.; YANG, H.; BOLTZ, V. F.; BOYES, S. B.; MARQUES, E. T. A.; MITCHELL, S. L.; MATHE, B.; OLONISAKIN, T. F.; HAIDAR, G.; BURKE, W. T.; PETZOLDM E.; DENNY, T.; WOODS, C. W.; MCVERRY, B. J.; LEE, J. S.; WATKINS, S. C.; CRIX, C. M. S.; MORRIS, A.; KEARNEY, M. F.; LADINSKY, M. S.; BJORKAMN, P. J.; KITSOPS, G. D.; MELORS, J. W.. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viremia Is Associated With Coronavirus Disease 2019 Severity and Predicts Clinical Outcomes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 74, n. 9, p. 1525–1533, 2022

JARRAH, S. A. et al.. Persistent SARS-CoV-2 antigen presence in multiple organs of a naturally infected cat from Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 28,2022.

JÄRHULT, J. D.; HULTSTROM, M.; BERGGVIST, A.; FRITHIOF, R.; LIPCSEY, M. The impact of viremia on organ failure, biomarkers and mortality in a Swedish cohort of critically ill COVID-19 patients. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.

KAHN, J. S.; MCLINTOSH, K. History and Recent Advances in Coronavirus Discovery. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 24, p. 223-227, 2005.

KINOSHITA, N. et al.. Transmission of SARS-CoV-2 in Domestic Cats. **The new england journal of medicine**, v. 383, 2020.

KINDLER, E.; THIEL, V.; WEBER, F. Interaction of SARS and MERS Coronaviruses with the Antiviral Interferon Response. **Advances in Virus Research**,v.96, p. 219–243, 2016.

LAUER, S. A. et al.. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. **Annals of Internal Medicine**, v. 172, n. 9, 2020.

KIRTIPAL, N.; BHARADWAJ, S.; KANG, S. G. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, 2020.

LIU, Y. C.; KUO, R. L.; SHIN, S.R. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. **Biomedical Journal**, v. 43, p. 328-333, 2020.

MAHDY, M. A. A.; YOUNIS, W.; EWAIDA, Z. An Overview of SARS-CoV-2 and Animal Infection. **Frontiers in Veterináry Science**, v.7, p. 1-12, 2020.

MALIK, Y. A. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. **The Malaysian Journal of Pathology**. v. 42, p. 3-11, 2020.

MEISNER J, et al. Household Transmission of SARS-CoV-2 from Humans to Pets, Washington and Idaho, USA. **Emerg Infect Dis**. 2022 Dec;28(12):2425-2434 2022.

MILLER, T. E. et al.. Clinical sensitivity and interpretation of PCR and serological COVID-19 diagnostics for patients presenting to the hospital. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 10, p. 13877–13884, 2020.

MCALOOSE, D. et al.. From People to Panthera: Natural SARS-CoV-2 Infection in Tigers and Lions at the Bronx Zoo. **mBio**, v. 11, n. 5, 2020.

MORAIS, H. A. et al.. Natural Infection by SARS-CoV-2 in Companion Animals: A Review of Case Reports and Current Evidence of Their Role in the Epidemiology of COVID-19. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 591216, 2020

NAQVI, A. A. T.; FATIMA, K.; MOHAMMAD, TAJ.; FATIMA, U.; SINGH, I, K.; ATIG, S, M.; HARIPRASAD, G.; HASAN, G.; HASSAN, I. SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. **Molecular Basis of Disease**, v.1866, p. 1- 16, 2020.

NERPEL, A. et al.. SARS-ANI: a global open access dataset of reported SARS-CoV-2 events in animals. **Scientific Data**, v. 9, n. 1, p. 438, 23 jul. 2022.

PARASHER, A. COVID-19: Current understanding of its pathophysiology, clinical presentation and treatment. **Postgraduate Medical Journal**. v. 97, p.312-320, 2021.

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

RAHMAN, S.; MONTERO, M. T. V.; BOWE, K.; KIRTON, R.; JR, F. K. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. **Expert Review of Clinical Pharmacology**. v .p. 1-20, 2021.

RAI, P.; KUMAR, B. K.; DEEKSHIT, V. K.; KARUANASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. . Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 2, p. 441–455, 2021.

SARS-ANI VIS (A Global Open Access Dataset of Reported SARS-CoV-2 Events in Animals). Disponível em: <<https://vis.csh.ac.at/sars-ani/#variants>>. Acesso em: 5 out. 2022.

SAMUDRALA, K.; KUMAR, P.; CHOUDHARY, K.; THAKUR, N.; WADEKAR, G. S.; DAYARAMANU, R.; AGRAWAI, M.; ALEXANDER, A. Virology, Pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. **Elsevier**, v.883, 2020.

SEGALÉS, J. et al.. Detection of SARS-CoV-2 in a cat owned by a COVID-19-affected patient in Spain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 40, p. 24790–24793, 6 out. 2020.

SHI, J. et al.. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. **Science**, v. 368, n. 6494, 8 abr. 2020.

SINGH, D. D.; PARVEEN, A.; YADAV, D. K. SARS-CoV-2: Emergence of New Variants and Effectiveness of Vaccines. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 14 dez. 2021.

SIT, T. H. C. et al.. Infection of dogs with SARS-CoV-2. **Nature**, v. 586, n. 7831, p. 776–778, 1 out. 2020.

SMITH, S. L. et al.. SARS-CoV-2 neutralising antibodies in dogs and cats in the United Kingdom. **Current Research in Virological Science**, v. 2, p. 100011, 2021.

TAN, C.; LI, S.; LIANG, Y, CHEN, M.; LIU, J. SARS-CoV-2 viremia may predict rapid deterioration of COVID-19 patients. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 6, p. 565–569, 2020.

TO, K. K.-W. et al.. Lessons learned 1 year after SARS-CoV-2 emergence leading to COVID-19 pandemic. **Emerging Microbes & Infections**, v. 10, n. 1, p. 507–535, [s.d.]

XU D, ZHOU F, SUN W, et al.. Relationship between serum SARS-CoV-2 nucleic acid (RNAemia) and organ damage in COVID-19 patients: a cohort study. **Clin Infect Dis**; 73:68-75, 2020.

YANG, X.; YU, Y.; XU, J.; SHU, H.; XIA, J.; LIU, H.; WU, Y.; ZHANG, L.; YU, Z.; FANG, M.; YU, T.; WANG, Y.; PAN, S.; ZOU, X.; Y, S.; S, Y. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, p. 485-481, 2020.

YÜCE, M.; FILIZTEKIN, E.; ÖZKAYA, K. G. COVID-19 diagnosis —A review of current methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 172, p. 112752, jan. 2021.

WANG, Q.; ZHANG, Y.; WU, L.; NIU, S.; SONG, C.; ZHANG, Z.; LU, G.; QIAO, C.; HU, Y.; YUEN, K. Y.; WANG, Q.; ZHOU, H.; YAN, J.; QI, J. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. **Cell**, v. 181, n. 4, abr. 2020.

WOO, P. C. L.; LAU, S. K. P.; HUANG, Y.; YUEN, K. Y. Coronavirus Diversity, Phylogeny and Interspecies Jumping. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, p. 1117-1127, 2009.