

Universidade Santo Amaro

Dissertação de Mestrado

Detecção de SARS-CoV-2 em cães e gatos contactantes de tutores positivos no RT-PCR na Cidade de São Paulo.

São Paulo

2023

Universidade Santo Amaro

Dissertação de Mestrado

Detecção de SARS-CoV-2 em cães e gatos contactantes de tutores positivos no RT-PCR na Cidade de São Paulo.

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação *Stricto Sensu* como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Única da Universidade Santo Amaro.

Mestranda: Suellen Cristina Guedes da Luz

Orientador: Prof^o. Dr. Rafael Garabet Agopian

São Paulo

2023

L994d Luz, Suellen Cristina Guedes da.

Detecção de SARS-CoV-2 em cães e gatos contactantes de tutores positivos no RT-PCR na Cidade de São Paulo / Suellen Cristina Guedes da Luz. — São Paulo, 2023.

36 p.: il., color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Veterinária) — Universidade Santo Amaro, 2023.

Orientador: Prof. Me. Dr. Rafael Garabet Agopian.

1. SARS-CoV-2. 2. Covid-19. 3. Animais. I. Agopian, Rafael Garabet, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

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

Ao vigésimo terceiro dia do mês de janeiro do ano de dois mil e vinte e três, via Web conferencia, conforme Regimento Geral e Regulamento de Pós-graduação da UNISA teve início às 15h00min, o exame de defesa intitulada: **“detecção de SARS-Cov-2 em cães e gatos conectantes de tutores positivos no rt-PCR na cidade de São Paulo”.** ” Do(a) mestrando(a) **Suellen Cristina Guedes da Luz**, 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 da Prof. Doutor Rafael Garabet Agopian, Coordenador do Programa. Os trabalhos foram instalados pelo presidente da banca examinadora e orientador Prof. Doutor Rafael Garabet Agopian, Doutor pela USP, Prof. Doutor Alexandre Welker Biondo, Doutor pela Illinois (EUA) e Profa. Doutora Andrea Pires dos Santos, Doutora UFRGS. 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:

Prof. Doutor Rafael Garabet Agopian

Parecer: Aprovada Assinatura: 

Alexandre Welker Biondo

Parecer: Aprovada Assinatura: 
Prof. Alexandre Welker Biondo
Unisa - Medicina Veterinária
Mat. 14426 - UFPA
CRMV - 19.623

Profa. Doutora Andrea Pires dos Santos

Parecer: Aprovada Assinatura: 

Agradeço à minha família pelo apoio durante toda a minha jornada de formação e pelo incentivo a nunca desistir e sempre buscar ser uma profissional melhor.

Agradeço ao meu marido por sempre acreditar e se orgulhar de mim, segurando a minha mão e me apoiando nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao meu orientador, por ter acreditado na minha capacidade para desenvolver um trabalho tão importante e de grande relevância para o momento em que foi desenvolvido e pelo imenso aprendizado proporcionado a mim durante esta jornada.

Agradeço aos idealizadores e participantes do projeto PetCOVID-19 study, pois sem eles este trabalho não seria possível.

Agradeço aos alunos do programa de iniciação científica da Universidade Santo Amaro que faziam parte da equipe de coletas, a participação deles foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

E, agradeço a Deus, que sempre nos protegeu durante um período crítico da pandemia de COVID-19, em que este trabalho foi desenvolvido.

Resumo

Em dezembro de 2019 foi identificado em Wuhan na China um novo coronavírus, denominado como síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), capaz de causar a doença *corona virus disease* 2019 (COVID-19), que se tornou pandêmica em março de 2020. De acordo com a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), em fevereiro de 2020 na China, houve o primeiro relato de um cão infectado com SARS-CoV-2, frente esta situação, viu-se a necessidade de mais estudos para investigar a relação do vírus com cães e gatos. Neste trabalho foram realizadas na cidade de São Paulo as coletas de amostras de swabs nasal e orofaríngeo, assim como amostras sanguíneas (submetidas a análise através de Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa em Tempo Real (RT-qPCR)) de 49 animais, entre eles cães e gatos, de tutores que foram diagnosticados com COVID-19 em até sete dias e, após 15 dias, foi realizada uma segunda coleta de cada animal, totalizando 98 coletas. Dentre os animais participantes da pesquisa, quatro estavam infectados com o SARS-CoV-2, sendo um cão e três gatos. Foram realizadas também anamnese com o tutor, exame físico do animal e acompanhamento após o resultado positivo. Apenas um animal apresentou sinais clínicos, porém não foi possível associá-los à infecção pelo vírus.

Palavras chave: SARS-CoV-2; Covid-19; cães; gatos; animais.

Abstract

In December 2019, a new coronavirus was identified in Wuhan, China, called acute acute syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), capable of causing corona virus disease 2019 (COVID-19), which became a pandemic in March. 2020. According to the World Organization for Animal Health (OIE), in February 2020 in China, there was the first report of a dog infected with SARS-CoV-2, in view of this situation, there was a need for further studies to investigate the relationship of the virus with dogs and cats. In this project, nasal and oropharyngeal swab samples were collected in the city of São Paulo, as well as blood samples (submitted to analysis through Real Time Reverse Translation Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)) from 49 animals, including dogs, up to seven cats carried out with COVID-19, after 15 collections carried out, totaling 98 collections. Among the animals participating in the research, four were infected with SARS-CoV-2, one dog and three cats. Anamnesis with the tutor, physical examination of the animal and follow-up after the positive result were also presented. Only one clinical signs, however, it was not possible to associate them with the virus infection.

Keywords: SARS-CoV-2; Covid-19; dogs, cats; animals.

Sumário

1	introdução e justificativa.....	7
2	Objetivos.....	9
2.1	Objetivos gerais.....	9
2.2	Objetivos específicos.....	9
3	Materiais e métodos.....	10
3.1	Amostragem.....	10
3.2	Contato com tutores.....	11
3.3	Coletas.....	11
3.4	Coleta de amostra de sangue.....	13
3.5	Coleta de amostras de swab.....	14
4	Resultados.....	16
4.1	Animais positivos.....	16
4.2	Histórico dos animais positivos para SARS-CoV-2.....	16
4.2.1	SP-12 F.....	16
4.2.2	SP-25 F.....	17
4.2.3	SP-17 C.....	18
4.2.4	SP-28 F.....	18
4.3	Resultados positivos por espécie.....	19
4.4	Resultados por tipo de amostras.....	21
4.5	Geolocalização.....	21
5	Discussão.....	22
	Conclusão.....	24
	Anexos.....	25
	Referencias.....	36

1. Introdução e Justificativa

Em dezembro de 2019 foi identificado em Wuhan na China um novo coronavírus, denominado como síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), capaz de causar a doença *corona virus disease* 2019 (COVID-19), que se tornou pandêmica em março de 2020 (ZHOU, P et al., 2020. ZHU, N. et al., 2021), podendo levar a um quadro de pneumonia e falência respiratória grave, com maior complicação em pessoas imunocomprometidas (ZHU, N. et al., 2019). Cui et al., (2019) descreveu o SARS-CoV-2 como um *Betacoronavirus*, o qual duas outras espécies capazes de causar doença respiratória em humanos também pertencem, o Vírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e o Vírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV). ZHOU, P et al., (2020) acredita que o vírus teve sua propagação a partir do coronavírus presente em morcegos, o BaTCoV-RaTG13 já que a similaridade genômica entre ele e o SARS-CoV-2 é de 96,2%, tornando o animal o possível reservatório natural do vírus. O pangolim (*Manis javanica*) também foi apontado como um dos animais que poderiam hospedar o vírus, isso por conta da similaridade genômica de 85 a 92% com o SARS-CoV-2, sugerindo a necessidade de uma terceira espécie silvestre na sua transmissão (HUANG et al., 2020; LAM et al., 2020). Já o coronavírus presente em cães e gatos pertencem ao gênero *Alphacoronavirus*, sendo o CCoV capaz de causar uma gastroenterite em cães e o FCoV capaz de causar a peritonite infecciosa felina em gatos, doença que é altamente debilitante e que não tem cura (ADDIE; JARRET, 2006), não tendo relação alguma com o surgimento do SARS-CoV-2 (WANG, L.; ZHANG, Y., 2016).

Em 2002, *Martina et al.* (2003) observou em seus estudos que gatos e furões são suscetíveis a infecções experimentais de SARS-CoV. Este utiliza o mesmo receptor para entrada em células humanas que o SARS-CoV-2, que é a enzima conversora de angiotensina II (ACE2), encontrada em outras espécies como macacos, furões, gatos, suínos e ratos (WAN et al., 2020). Li et al., 2020 não descarta a infecção interespecies, mesmo que observada algumas diferenças nos aminoácidos dos sítios de ligação de humanos e outros mamíferos, o autor ainda apontou que macacos possuem esta região idêntica à de humanos.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), em fevereiro de 2020 na China, houve o primeiro relato de um cão infectado com SARS-CoV-2, o animal de 17 anos de idade, teve amostras de swab nasal, oral e retal coletadas, analisadas por RT-PCR (Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase), com resultados positivos nas amostras nasal e oral, o animal estava assintomático, porém veio a óbito dias depois de liberado da quarentena, sua morte foi de causa indeterminada e não teve relação com o vírus. Em março, houve o relato de outro cão de 2 anos de idade também na China, o animal teve suas amostras de swab nasal, oral e retal com resultados positivos para SARS-CoV-2 e permaneceu assintomático (OIE, 2020). Ainda de acordo com a OIE, após estes casos, diversos outros animais tiveram resultado positivo para o vírus em vários países, geralmente associados a tutores que foram diagnosticados com COVID-19.

Shi et al. 2020 observou que gatos possuem maior suscetibilidade que cães, e infectados experimentalmente podem transmitir o vírus via aérea para outros gatos suscetíveis. Ainda de acordo com o autor, outras infecções experimentais foram possíveis em hamsters, ferrets e macacos (*Macaca mulata* e *Macaca fascicularis*). Ainda no ano de 2020, em Nova Iorque tigres-malaio, tigres-siberiano e leões-africano foram diagnosticados com SARS-CoV-2 após apresentarem sinais respiratórios durante alguns dias e ainda terem dois de seus tratadores diagnosticados com COVID-19, por este motivo acredita-se que ocorreu uma infecção humano-animal (LAU, E., 2020. MCLOOSE, et al., 2020. WCS, 2020).

Estudos sobre a dinâmica do vírus são necessários para elucidar a real interação entre o vírus, os animais domésticos e humanos, visto que no momento da realização deste trabalho pouco se sabia sobre o papel de cães e gatos na dinâmica do SARS-CoV-2. Por conta da proximidade entre humanos e seus animais de estimação, este trabalho se fez necessário para esclarecer a participação dos mesmos na interação do vírus com as pessoas contactantes, detectando a infecção de cães e gatos de tutores infectados e diagnosticados com Covid-19 na cidade de São Paulo.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais.

Detectar o vírus SARS-CoV-2 em cães e gatos que tiveram contato com seus tutores positivos para o vírus no exame de RT-PCR, residentes na cidade de São Paulo – SP, Brasil.

2.2 Objetivos específicos.

- Detectar por RT-PCR o SARS-CoV-2 em cães e gatos domiciliados e com contato direto com tutores diagnosticados com COVID-19 através de RT-PCR em até sete dias na cidade de São Paulo.
- Determinar a geolocalização das coletas e casos de animais positivos na cidade de São Paulo.
- Correlacionar dados clínicos com a infecção do vírus dos animais detectados com SARS-CoV-2.

3. Materiais e métodos

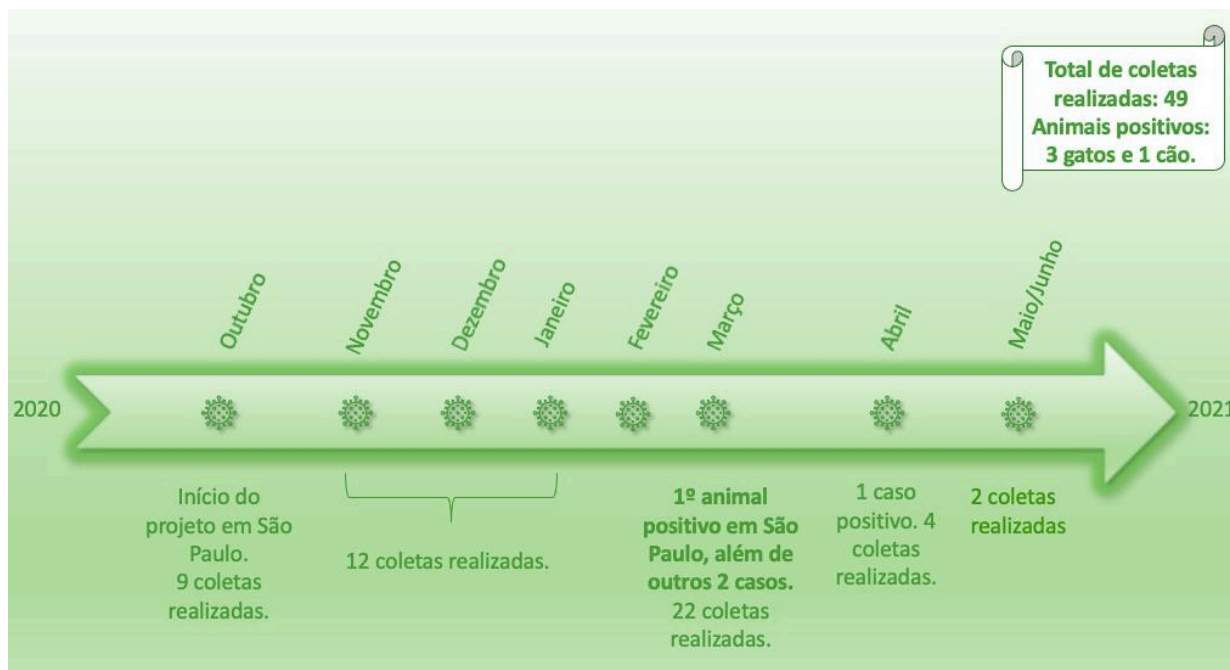
Este trabalho faz parte do “Estudo multicêntrico para a vigilância de SARS-CoV-2 em animais de companhia com interface à Saúde Única (PetCOVID-19 Study): coorte prospectiva de mamíferos domiciliados para avaliação de risco de transmissão zoonótica no Brasil”, (processo número 402341/2020-1 no CNPq, parecer número 4.054.208 do Comitê de Ética e Pesquisa, segundo registrado na Plataforma Brasil, e 4879280420 no Comitê de Ética no Uso de Animais) realizado desde 2020 em seis capitais brasileiras- Belo Horizonte (MG), Campo Grande (MS), Cuiabá (MT), Curitiba (PR), Recife (PE), São Paulo (SP) que tem como objetivo principal promover a vigilância de SARS-CoV-2 em animais de companhia do Brasil com interface à Saúde Única, além de realizar o diagnóstico laboratorial e monitorar, longitudinalmente, a infecção em cães e gatos de tutores positivos para a COVID-19, com diagnóstico laboratorial confirmado.

Passou pela avaliação e dispensa pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Santo Amaro com parecer número 66/2021.

3.1 Amostragem

Foram realizadas coletas em 49 animais participantes da pesquisa, entre eles 19 gatos e 20 cães de tutores que foram diagnosticados com COVID-19 através de RT-PCR em até 7 dias e, após esta primeira etapa, foi realizada uma segunda coleta em até 15 dias depois da primeira. Na figura 1, podemos observar o fluxograma das coletas realizadas na cidade de São Paulo durante o desenvolvimento do trabalho.

Figura 1: Fluxograma das coletas realizadas na cidade de São Paulo



Fonte: O autor. Legenda: A figura acima ilustra o fluxograma das coletas realizadas na cidade de São Paulo durante o desenvolvimento do trabalho.

3.2 Contato com tutores

Todos os tutores ou familiares voluntários receberam, por e-mail ou aplicativo de comunicação, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1) e, ao consentirem com a participação na pesquisa, responderam ao questionário de televigilância (Anexo 2), para a avaliação do quadro clínico apresentado pelo animal, dos hábitos dos moradores de casa, condições de moradia, hábitos de vida dos animais, características da relação tutor-animal de companhia, rotina durante a pandemia, sintomas, óbitos e características socioeconômicas.

3.3 Coletas

Para análise da transmissão de SARS-CoV-2 entre humanos e seus animais, foram coletadas amostras biológicas de 49 animais que tiveram seus tutores diagnosticados com COVID-19 através de RT-PCR em até 7 dias e, após 15 dias, foram coletadas a segunda amostra biológica desses animais. A cada visita foi realizada a anamnese e aplicado o questionário *in loco* para avaliação

do quadro clínico do animal e avaliação ambiental (Anexo 3), em seguida foi realizado um exame físico no animal, onde foram aferidos parâmetros como frequência cardíaca, respiratória, temperatura retal, ausculta pulmonar e inspeção geral do animal.

De cada animal foram coletados swabs nasal, orofaríngeo e retal (para RT-qPCR), além de sangue total para diagnóstico diferencial de animais que tiveram resultado positivo para o vírus como FIV/FELV, herpes vírus felino I, *Bordetella bronchiseptica*, *Chlamydophila felis*, *Mycoplasma felis* e *Calicivírus felino* em gatos, totalizando quatro amostras por animal por visita. Os animais que tiverem ao menos um swab positivo à RT-qPCR foram considerados positivos para SARS-CoV-2.

Todas as pessoas envolvidas na coleta, contenção e manipulação do material coletado receberam treinamento para que a coleta ocorresse de maneira segura e rápida. O treinamento incluiu simulação da coleta em peças anatômicas no laboratório de anatomia veterinária da Universidade Santo Amaro, demonstração de uso correto dos EPI's como avental, luvas, propés, touca e máscara descartáveis e face shield, assim como correta higienização dos materiais utilizados. Os EPI's utilizados podem ser observados na figura 2 e pessoas da equipe durante a coleta podem ser observados na figura 3.

Figura 2: EPI's utilizados durante a coleta.



Fonte: PECOVID-19 Study. Legenda: EPI's utilizados durante as coletas.

Figura 3: Equipe utilizando EPI's adequadamente para realizar coletas.



Fonte: PECOVID-19 Study. **Legenda:** equipe utilizando EPI's adequadamente durante as coletas.

3.4 Coleta de amostra de sangue

Após contenção física, era realizada a assepsia no local com álcool 70%, seguido de garrote, e da punção venosa em jugular de ao menos 10 mL de sangue (Figura 2). Era inserido 4 mL de sangue em um tubo com EDTA, homogeneizando-o e 6 mL de sangue em tubo com gel separador. No laboratório, o tubo de sangue com gel separador foi centrifugado por 10 minutos à 3.000 rpm. Após a completa separação de sangue e soro, em capela de exaustão, com o auxílio de Pipeta de Pasteur, o conteúdo de soro foi dividido em 4 tubos tipo “ependorf” (mínimo 500 μ L e máximo 1,5 mL por alíquota). Em capela de exaustão, com o auxílio de Pipeta de Pasteur, após homogeneizar o tubo com EDTA, foi dividido o conteúdo de sangue em 4 tubos tipo “ependorf” (mínimo 500 μ L e máximo 1,5 mL por alíquota). Os tubos tipo “ependorf” foram

armazenados em freezer -20°C (sem descongelamento automático) até completo congelamento, e logo após os tubos eram armazenados em freezer -80°C até o envio para processamento da amostra.

Figura 4: Coleta de sangue da jugular de um cão.



Fonte: PETCOVID-19 Study. **Legenda:** Realização de coleta sanguínea em um cão, com a utilização do material adequado e contenção do animal de maneira segura.

3.5 Coleta de amostra de swab

Após certificar-se do correto posicionamento do animal um integrante da equipe higienizava a luva com álcool 70% e, em seguida, abria a embalagem para retirada do swab, este era introduzido pela cavidade oral até a orofaringe, onde foram realizados movimentos rotatórios para captação de células e absorção de secreção (Figura 3). Este swab era inserido em tubo em tubo contendo o meio de transporte, a equipe se certificava do correto fechamento da tampa de rosquear e durante a coleta, o tubo era mantido refrigerado, em caixa de isopor contendo gelo reciclável. Caso possível, era realizada a coleta

introduzindo o swab pela narina do animal, até a nasofaringe e retal realizando o mesmo procedimento já descrito anteriormente.

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 foram processadas através do método de RT-qPCR.

Figura 5: Coleta através de swab em narina de cão.



Fonte: PETCOVID-19 Study. **Legenda:** Animal sendo contido por membros da equipe para realização de coleta através de swab em narina.

4 Resultados

4.1 Animais positivos

Foram identificados em São Paulo casos de animais domésticos diagnosticados com SARS-CoV-2 através de RT-qPCR de amostras de swab orofaríngeo e retal. Esses animais tiveram seus tutores diagnosticados com COVID-19 até 7 dias antes de terem suas amostras coletadas, foram positivos 3/19 gatos (SP-12F, SP-25F e SP-28F) e 1/20 (SP-17C) cães, de idade e sexo variados, totalizando 49 animais testados. Em todos os casos, mais de uma pessoa da casa havia sido diagnosticada com COVID-19 em períodos próximos. Os animais em questão tinham contato direto com seus tutores e não possuíam acesso à rua. Os três gatos foram positivos nas amostras de swab orofaríngeo, onde SP-28F apresentou maior carga viral (Alvo N1: CT25,15; quantificação (cópias RNA/ μ L) 1640,31. Alvo N2: CT26,25; quantificação (cópias RNA/ μ L) 1063,52), quando comparado aos outros felinos, SP-25F (Alvo N1: CT28,17; quantificação (cópias RNA/ μ L) 460,25. Alvo N2: CT26,94; quantificação (cópias RNA/ μ L) 1006,30) e SP-12F (Alvo N1: CT28,99; quantificação (cópias RNA/ μ L) 313,77. Alvo N2: CT29,15; quantificação (cópias RNA/ μ L) 423,27). Já o cão (SP-17C) teve resultados positivos nos swabs orofaríngeo e retal, porém a carga viral encontrada na amostra colhida da orofaringe (Alvo N1: CT33,25; quantificação (cópias RNA/ μ L) 6,14. Alvo N2: CT30,78; quantificação (cópias RNA/ μ L) 23,35) foi maior que na amostra retal (Alvo N1: CT35,90; quantificação (cópias RNA/ μ L) 1,09. Alvo N2: CT35,45; quantificação (cópias RNA/ μ L) 1,93). Apenas SP-12F apresentou sinais clínicos como espirro, secreção e prurido nasal alguns dias antes da coleta, porém trata-se de sinais inespecíficos. Todos os animais positivos foram acompanhados pela equipe até 15 dias após o resultado e, nenhum deles apresentou qualquer alteração em seu estado de saúde.

4.2 Histórico dos animais positivos para SARS-CoV-2

4.2.1 SP-12 F

Espécie felina; fêmea; 6 anos de idade; castrada.

Tutora diagnosticada dia 16/12/20. início dos sintomas dia 13/12/20.

Histórico: tutora adotou o animal com dois meses de idade aproximadamente. Foi realizada a vacina e controle de endoparasitas na mesma época, desde então animal não teve tratamento para endo ou ectoparasitas e não foi vacinada. Entre o final de novembro a início de dezembro de 2020, tutora observou presença de verme nas fezes e diarreia, utilizou como tratamento o Revolution gatos.

A coleta foi realizada no dia 22/12/2020. A tutora relatou que dois dias antes o animal apresentou espirros, secreção nasal serosa bilateral, prurido intenso na região nasal e secreção ocular em um dos olhos além de ficar um dia sem defecar e urinar. Animal apresentou-se levemente apático. Durante a coleta, a equipe percebeu que o animal reagia ao toque, apresentando sinais de dor muscular.

Foi orientado a tutora observar o animal, e foi relatado que após aproximadamente 7 dias, os sinais tiveram remissão sem intervenção medicamentosa. Animal segue saudável. Tutora orientada a entrar em contato com a equipe caso observasse qualquer alteração.

4.2.2 SP-25 F

Espécie felina, fêmea, 3 anos, castrada.

Tutora foi diagnosticada dia 12/03/21. Primeiros sintomas dia 03/03/21.

Histórico: Tutora tem o animal desde filhote, foi castrada e nunca apresentou sinais de doenças durante a permanência dela na residência. Duas semanas antes da coleta, animal teve contato com outro gato, onde contraiu ectoparasitas (pulgas), foi administrado tratamento com pipeta anti-pulgas (tutora não recorda a marca) e após o período de uma semana aproximadamente foi observado uma intensa queda de pelos na região lombar e membros pélvicos

do animal, deixando regiões com alopecia, animal foi levada ao veterinário, onde foi diagnosticada com dermatite.

Tutora não percebeu outras alterações ou sinais clínicos. Durante a coleta, a equipe observou um episódio de espirro e nariz com discreta secreção serosa, indicando ser algo pontual, provavelmente não relacionado ao diagnóstico de SARS-Cov-2 do animal. Animal segue saudável. Tutora orientada a entrar em contato com a equipe caso observasse qualquer alteração.

4.2.3 SP-17 C

Espécie canina, macho, 6 anos, animal inteiro.

Histórico: Animal vacinado, nunca teve qualquer problema de saúde. Tutora leva ao veterinário para realização das vacinas.

Animal não apresentou qualquer sinal clínico no período em que a tutora estava doente, comportamento normal. Durante a coleta animal estava agitado e a temperatura estava 39°.

Animal segue saudável. Tutora orientada a entrar em contato com a equipe caso observasse qualquer alteração.

4.2.4 SP-28 F

Espécie felina, fêmea, 1 ano de idade, castrada.

Histórico: Animal adotado quando filhote, vacinado e vermifugado. Foi ao veterinário para ovariectomia.

Não apresentou sinais clínicos durante o período que a tutora estava doente. Animal segue saudável. Tutora orientada a entrar em contato com a equipe caso observasse qualquer alteração.

4.3 Resultados positivos por espécie

No quadro (Quadro 1) a seguir, podemos observar o número de cães e gatos obtiveram resultados positivos e negativos. Sendo 3 felinos e um cão

Quadro 1: Resultados do RT-PCR dos cães e gatos que tiveram amostras coletadas, São Paulo 2021.

	Felinos	Caninos
Positivo	3	1
Negativo	16	19

Fonte: O autor. Legenda: na tabela acima podemos observar os resultados dos testes de RT-PCR dos cães e gatos que tiveram amostras coletadas, onde 3 gatos e 1 cão obtiveram resultados positivos, o restante foi negativo para SARS-CoV-2.

4.4 Resultados por tipo de amostras

Referente as amostras onde foram identificados os resultados positivos, houve maior pré-disposição de encontrar o vírus no material coletado da orofaringe, apenas em um cão foi encontrado material viral do material coletado através do swab retal e nenhum material foi encontrado nas amostras obtidas através de swab nasal, lembrando que a coleta através do swab nasal não foi possível ser realizada em todos os animais participantes do projeto, ou por dificuldade durante a contenção, ou por conta do tamanho do focinho do mesmo, não possibilitando a introdução do swab na narina. Podemos observar no quadro (quadro 2) abaixo, dos animais positivos, quais foram os locais em que o vírus foi detectado. Podemos elucidar melhor através do anexo 4, onde estão os laudos dos animais que tiveram resultados positivos.

Quadro 2: Material que apresentou resultado positivo para SARS-CoV-2, São Paulo 2021.

	Swab orofaríngeo	Swab retal	Swab nasal	Total de animais positivos
Felinos positivos	+	X	X	3
Caninos positivos	+	+	X	1

Fonte: o autor. Legenda: Na tabela podemos observar o material coletados dos animais que foi encontrado material viral, sendo positivos representados por + e negativos por X.

4.5 Geolocalização

Neste trabalho, foi realizada a geolocalização das coletas com o objetivo de demonstrar quais regiões de São Paulo apresentaria maior aderência a participação da pesquisa. Podemos observar na figura 6 abaixo que, a região onde tivemos o maior número de voluntários participantes foi na zona Sul da cidade de São Paulo, com 10 endereços visitados, relacionando este dado ao fato de a Universidade Santo Amaro ser nesta região, onde a divulgação pode ter ocorrido de maneira mais efetiva e a maior parte dos participantes serem universitários ou familiares de estudantes, sendo um público com maior acesso as informações com relação ao projeto desenvolvido. Na zona Leste e Oeste a quantidade de endereços visitados foram iguais, com 4 endereços participantes em cada região. Apenas duas visitas na zona Norte, duas no município de Cotia e 1 no município de Diadema. Devemos nos atentar ao fato que o número de endereços não condiz com o número de coletas, já que em alguns endereços foram realizadas coletas em mais de um animal.

Figura 6: Geolocalização das coletas realizadas.

5 Discussão

Neste trabalho, realizado na cidade de São Paulo, podemos perceber que os animais infectados com o SARS-CoV-2 tiveram anteriormente seus tutores diagnosticados com COVID-19, corroborando com Sit. et al, (2020), que sugere que a infecção humano-animal realmente ocorra, porém não podemos dizer que o mesmo aconteça no sentido inverso, assim como Parry (2020) que afirma que não há comprovação de que animais domésticos sejam o foco de transmissão do vírus e sim a espécie humana. Diante disso, é de extrema importância o isolamento e cuidados com a higiene também com os animais contactantes com pessoas infectadas.

Perisé-barrios et al (2021) observou em seus estudos que, mesmo que ocorram infecções em cães, os gatos possuem maior suscetibilidade, pois os relatos na espécie são mais frequentes, assim como observamos nos relatos ocorridos na capital paulista, onde dos quatro animais diagnosticados, três eram felinos. Ainda de acordo com SHI, J., *et al*, (2020), em seus estudos, gatos infectados experimentalmente não apresentaram sinais clínicos que pudessem ser atribuídos ao vírus, diferente de LUAN, J. *et al*, (2020), que acredita que gatos podem apresentar sinais clínicos por conta da alta homologia de seus receptores ACE-2 com os receptores de humanos. Em sua maioria, os animais positivos para SARS-CoV-2 permanecem assintomáticos, em nosso relato apenas um animal da espécie felina apresentou alterações respiratórias, que tiveram remissão espontânea após alguns dias, o mesmo, foi observado por Lopes et al (2020), que relatou manifestações como dispnéia, diarreia e vômito em um gato que teve seu teste positivo para SARS-CoV-2, porém não é possível associá-los à infecção pelo vírus.

De acordo com Kreutz, L. C., *et al*, (2021), a quantidade viral maior foi no trato respiratório dos cães e gatos, o que também foi observado no presente estudo, o autor ainda descreve que a maioria dos animais expelia material viral pelas fezes, diferente dos dados coletados neste estudo, em que apenas um animal apresentou resultado positivo para amostras retais, ficando evidente o fato de que o vírus é encontrado com maior frequência no trato respiratório, assim como observado também em humanos, relacionando este fato a uma característica do vírus.

Barroso, L.V., *et al*, (2020) destaca a disparidade socioespacial das cidades paulistas relacionando a disseminação da COVID-19 a elementos como, a diferença socioeconômica e a periferização que são responsáveis por recortes de classes, marcando o espaço nacional, fazendo com que cidades como São Paulo, que possui regiões sem redes de esgoto adequada, com uma densidade populacional grande tenham maior risco do vírus se espalhar. Porém, neste trabalho, não conseguimos correlacionar as áreas com maior número de coletas aos fatores citados pelo autor, já que tivemos maior número de voluntários na zona Sul de São Paulo, em áreas com saneamento básico adequado e com pessoas de diferentes classes sociais, portanto, neste caso, relacionamos o maior número de coletas nesta região ao fato de ser onde o campus da Universidade Santo Amaro está situado, assim, pessoas que residem próximo ao local e até os próprios estudantes tinham acesso mais fácil as informações e divulgações referente ao projeto, facilitando as coletas. Foi possível perceber que, neste estudo, não houve interferência de diferença socioeconômicas ou número de familiares que residem no mesmo local para definir o maior número de participantes infectados por região, como analisado por Barroso, L.V, *et al* (2020), que percebeu que tais fatores eram cruciais para disseminação do vírus, bem como a alta taxa de mortalidade.

Apesar de não terem estudos que comprovem que animais domésticos possam transmitir o vírus a humanos e que sinais clínicos em cães e gatos sejam raros, é de grande importância que tutores e pessoas próximas que forem diagnosticados com COVID-19 sigam as recomendações de isolamento e higienização também para seus animais, pois nos casos relatados acima, sabe-se que os tutores e seus familiares não mantiveram o isolamento de seus animais, o que acarretou a infecção deles.

Por se tratar de um vírus novo, pouco se sabe sobre o SARS-CoV-2 e de sua interação tanto com humanos quanto com animais, mais estudos se tornam necessários para melhor elucidar seus mecanismos e como impedir que continue a se propagar.

Conclusão

Podemos concluir com este trabalho que cães e gatos podem ser infectados com SARS-CoV-2, desde que tenham contato íntimo com pessoas que tenham sido diagnosticadas com COVID-19 até sete dias. As amostras de swab orofaringe foi o material em que havia em todos os casos presença do material viral e gatos apresentaram maior predisposição a infecção. Em sua maioria, os animais infectados eram assintomáticos, apenas um felino apresentou sinais respiratórios leves, não sendo relacionados a infecção pelo SARS-CoV-2. A zona Sul da cidade de São Paulo foi a que mais teve voluntários com tutores infectados pelo vírus, podendo ser relacionado apenas ao fato de ser próximo a Universidade Santo Amaro, facilitando o acesso à informação sobre o projeto aumentando o número de participantes.

Anexos

ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

I. DADOS SOBRE A PESQUISA

Título do Protocolo de Pesquisa:

Pesquisador:

Cargo/Função:

Duração da Pesquisa:

Justificativa

O SARS-CoV-2, coronavírus de origem zoonótica, foi detectado em humanos na China no final de 2019. Uma vez estabelecida a transmissão entre humanos, a doença COVID-19 se tornou pandêmica e até o momento não foi completamente esclarecido o papel dos animais domésticos e selvagens na cadeia de transmissão e manutenção do vírus. Considerando os recentes relatos sobre a detecção de SARS-CoV-2 em animais de Hong Kong, Bélgica e Estados Unidos, e a grande proximidade entre pessoas e seus animais de estimação, principalmente cães e gatos, inclusive observada no Brasil, torna-se importante elucidar aspectos da história natural da doença, como o possível ciclo zoonotrófico em um estudo multicêntrico para a vigilância de SARS-CoV-2 em pets, em consonância com os preceitos do Sistema Único de Saúde e da Saúde Única (indissociabilidade entre saúde humana, animal e ambiental). Esta é uma proposta inédita pois, até o momento, não se conhece uma rede de colaboração de enfrentamento à SARS-CoV-2 cujo enfoque seja em Saúde Única e na promoção da articulação de ações voltadas aos animais de companhia entre as diversas regiões, envolvendo diferentes instituições de ensino e pesquisa nacionais e internacionais.

Objetivos

Objetivo geral

Promover a vigilância de SARS-CoV-2 em animais de companhia do Brasil com interface à Saúde Única.

Objetivos específicos

- Realizar o diagnóstico laboratorial e monitorar, longitudinalmente, a infecção em animais (cães e gatos) de tutores positivos para a COVID-19, com diagnóstico laboratorial confirmado pelo Sistema Único de Saúde.
- Comparar e determinar as características ambientais e outros fatores associados à infecção nos animais positivos, em diferentes regiões do país.
- Propor um fluxograma padrão e proposta de ações para o controle da COVID-19 em animais de estimação em parceria com órgãos de vigilância em saúde, em especial vigilância ambiental e zoonoses, e atenção primária, nas diferentes regiões do país.

Metodologia

Será realizado um estudo longitudinal prospectivo, com dois momentos de avaliação, sendo incluídos animais de companhia cujo tutor esteja em isolamento domiciliar, com diagnóstico laboratorial confirmado para SARS-CoV-2 através de RT-qPCR ou resposta imunológica apenas por IgM (caracterizando doença ativa), até sete dias da data do diagnóstico, residente em uma das capitais Belo Horizonte (MG), Campo Grande (MS), Curitiba (PR), Recife (PE), São Paulo (SP).

Para análise da transmissão de SARS-CoV-2 entre humanos e seus animais, serão coletadas amostras biológicas com intervalo médio de sete dias, de pelo menos um animal de companhia da residência. A cada visita será realizada a anamnese e será aplicado o questionário in loco para avaliação do quadro clínico do animal e avaliação ambiental (Anexo 3). De cada animal serão coletados swabs nasal, orofaríngeo e retal (para RT-qPCR), além de sangue total (para diagnósticos diferenciais) e sangue para obtenção de soro (para soroneutralização), totalizando cinco amostras por animal por visita. Para fins de análise, os animais que tenham ao

menos um swab positivo à RT-qPCR e/ou sorologia positiva serão considerados positivos para COVID-19. As amostras obtidas através de swab serão conservadas em tubos estéreis contendo meio de transporte (estabilizante para vírus e RNA) sob refrigeração (2-8°C) por até 72h, congeladas em -20°C por até 30 dias ou em -80°C por tempo indeterminado e serão processadas através do método de RT-qPCR. Será estabelecido controle de qualidade interlaboratorial para amostras positivas e mesmo número de amostras negativas (aleatório).

Amostras positivas à RT-qPCR serão submetidas ao cultivo celular para isolamento viral e posterior sequenciamento genético para análises filogenéticas. Amostras de sangue total serão conservadas a -80oC e processadas, caso necessário, para o diagnóstico de outras doenças nestes animais. Amostras de soro serão conservadas a -80oC e processadas através de soroneutralização, a fim de avaliar a conversão sorológica e a titulação de anticorpos anti-SARS-CoV-2 nos animais de companhia.

Os dados obtidos aos questionários, à anamnese e os resultados laboratoriais serão tabulados em um banco de dados colaborativo em nuvem e posteriormente analisados para obtenção de risco relativo e análise das variáveis com estatística descritiva e regressão logística, utilizando os softwares R, OpenEpi e SAS. Serão incluídas no banco de dados as informações sobre as metas e indicadores referentes ao item “h”, para os relatórios gerenciais desta pesquisa.

Os resultados dos testes serão o mais brevemente possível informados aos tutores / familiares através de contato telefônico e pela emissão de laudo (resultado de exame) eletrônico, que será enviado por e-mail ou aplicativo de comunicação. Em caso de resultado positivo, os demais animais da residência também serão testados em pool por espécie animal e os familiares serão orientados a estabelecer o acompanhamento veterinário por 14 dias e intensificação das medidas de higiene e proteção individual e coletiva.

Esclarecimentos aos participantes da pesquisa.

A participação é voluntária, as informações fornecidas serão confidenciais e mantidas no anonimato e a pessoa poderá retirar o seu consentimento a qualquer tempo sem prejuízo algum. As informações serão apresentadas apenas numericamente em divulgações científicas.

Portanto, convido o(a) Sr.(a) para colaborar com a pesquisa.

_____, _____ de _____ de 20_____.

ASSINATURA
PESQUISADOR:
RG/UF:

II. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

_____, _____ de _____ de 20_____.

ASSINATURA
SUJEITO DE PESQUISA OU REPRESENTANTE LEGAL:
RG/UF:

ANEXO 2 - QUESTIONÁRIO DE TELEVIGILÂNCIA

Tutor: _____
Endereço: _____ Município: _____
Telefone: _____ E-mail: _____

SOBRE A RESIDÊNCIA / AMBIENTE:

1. Tipo de residência: () Casa (única no terreno) () Casa em condomínio () Apartamento () Outro: _____
2. Área interna: n. cômodos: _____ n. banheiros: _____
3. Área interna: sol entra plenamente em todos os cômodos? () S () N
4. Possui área externa? () N () S SE SIM: Tipo de área externa: () Sacada () Quintal totalmente calçado () Quintal semi-calçado () Quintal totalmente com matéria orgânica / gramado / terra Sol entra plenamente na área externa? () S () N
5. Possui abrigo para animais? () S () N SE SIM: Tipo de abrigo: () Casa de madeira () Canil / gatil () Outro abrigo: _____
6. Destinação do lixo: () Coleta pública () Outra: _____
7. Água: () Empresa de abastecimento () Outra: _____
8. Esgoto: () Rede coletora () Outra: _____
9. Frequência de limpeza da área interna e externa antes de quarentena / isolamento (intervalo de dias): _____ Como realizava? (descrever produtos e técnica) (SE houve mudança, responder:)
10. Frequência de limpeza da área interna depois de quarentena / isolamento intervalo de dias): _____ Como realiza? (descrever produtos e técnica)

SOBRE O ANIMAL:

11. Nº animais na residência: _____ Cães: _____
Gatos: _____ Outros: _____
12. Idade dos Animais (responder para cada animal): _____
13. Adotou novos animais após diagnóstico de COVID-19? () N () S SE SIM:
De onde? () Abrigo () Comprado () Não sabe () Outros: _____
14. Onde o animal passa a maior parte do tempo? () Solto no quintal () Solto dentro de casa () Solto igualmente quintal e dentro de casa () Preso em canil / gatil / gaiola () Preso no quintal - Como? _____ () Na rua
15. Existem barreiras físicas na casa (telas nas janelas, muros) para impedir que o animal vá para a rua sozinho?
() S () N () Não de aplica SE NÃO: Costuma ir sozinho para a rua? () N () S
16. Onde o animal dorme? () No quintal () Dentro de casa () Igualmente quintal e dentro de casa () Em canil / gatil / gaiola () Na rua
17. O animal tem acesso a mesa, cama, sofá, poltrona? () N () S
18. Tem o hábito de alisar o animal, acariciar ou beijar? () N () S 19.
Após o contato com o animal, costuma lavar as mãos? () S () N
20. Pessoas dormem com o animal? () N () S
21. Percebeu algum sinal de resfriado, tosse ou diarreia no animal? () N () S SE SIM:
Quando? _____ Por quanto tempo (dias)? _____ Levou ao veterinário? () N () S
SE SIM: Qual foi o diagnóstico ou conduta? _____
22. Costuma levar a banho e tosa? () N () S SE SIM: Qual a frequência? _____
Como? () Tutor leva e traz () Serviço de transporte () Outro: _____
23. Costuma levar o animal para passeios com coleira e guia? () N () S SE SIM, RESPONDER:
24. Quanto tempo, em média, duram os passeios (hora/minuto): _____
25. Outras pessoas alisam ou acariciam o animal durante o passeio na rua? () N () S

26. O animal tem contato com outros animais na rua, durante os passeios? () Não sabe () N () S
27. Quando retorna do passeio, lava as patas do animal ou utiliza algum produto antes de entrar em casa? () S () N
28. Costuma levar ao veterinário? () S () N SE SIM: Frequência? _____

SOBRE A PESSOA:

29. Quantas pessoas residem na mesma casa? _____
30. Qual a renda média da família? _____
31. Quantos casos confirmados de COVID-19 na residência?

Da(s) pessoa(s) positiva(s) para COVID-19 (responder para cada pessoa):

32. Está doente no momento da entrevista? () S () N
33. Sexo: () M () F () Outro: _____
34. Idade: _____
35. Ocupação (inclusive aposentado, profissional de saúde...): _____
36. Escolaridade máxima: () Pós-graduação () Superior () Ensino médio () Fundamental () Sem acesso à escola
37. Data do diagnóstico: _____
38. Estado civil: () Solteiro(a) () Casado(a) () União estável () Divorciado(a) () Viúvo(a)
39. Teve contato com casos de COVID-19 fora de casa? () Não sabe () N () S SE SIM: () Parentes / amigos () Trabalho () Outro: _____
40. Fez quarentena antes do diagnóstico? () S () N SE SIM: Quanto tempo (dias) _____
41. Fez isolamento após o diagnóstico? () S () N () Não e aplica SE SIM: Quanto tempo (dias) _____
42. Tem histórico de viagem antes do diagnóstico de COVID-19? () N () S Se sim, Para onde? _____ Quando (data de chegada no destino)? _____ Permaneceu por quanto tempo (dias)? _____
43. Tem histórico de preexistente de outras condições de saúde? () Não () Doença cardiovascular () Asma () Doença pulmonar obstrutiva crônica () Insuficiência renal () Imunossupressão () Câncer () Obesidade () Diabetes () Fumante () Drogas () Álcool () Outro: _____
44. Apresentou sintomas? () N () S SE SIM: Considera os sintomas: () Leves () Moderados () Graves
45. Desfecho: () Isolamento em casa = tempo (dias): ____ () Internação ambulatorial = tempo (dias): ____ () Internação em UTI = tempo (dias): ____ Óbito? () N () S = data: _____

ANEXO 3 - FICHA DE ANAMNESE E QUESTIONÁRIO LOCAL

1. Nome / identificação:
2. Raça:
3. Sexo:
4. Idade:
5. Castrado: () S () N
6. Vacinas (últimos 12 meses): () N () Polivalente () Antirrábica () Leishmaniose ()
Outras: _____
7. Vermífugo (últimos 12 meses): () S () N
8. Repelentes: () S () N SE SIM: Quais? () Coleira - marca: _____ () Topspot -
marca: _____ () Outros: _____
9. Frequenta veterinário () S () N SE SIM: Data da última visita ao veterinário:
_____ Procedimentos / diagnóstico realizados (descrever): _____
10. Alimentação: () Ração: Qual? _____ () Comida caseira () Ração e
comida caseira () Outros: _____
11. Apetite: () Normorexia () Polifagia () Hiporexia
12. Ingestão hídrica: () Normodipsia () Polidipsia
13. Urina: () Normúria () Poliúria
14. Fezes: () Normais () Ressecadas () Amolecidas () Diarreicas:
Aspecto _____
15. Vômito: () N () S: Aspecto _____
16. Portador de outras condições de saúde? () N () S SE SIM: Quais? () Doenças
infecciosas (descrever) () Não infecciosas / crônicas (descrever) 17. Uso de
medicamento: () N () S: Quais (descrever): _____

EXAME FÍSICO

- | | |
|------------------|---|
| Peso: | FC: |
| Escore corporal: | Inspeção de boca: |
| Temperatura: | Inspeção de pele: |
| Mucosas: | Reflexo de tosse: |
| Ausculta: | 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

Coronavírus SARS-CoV-2

Real Time PCR Quantitativo

Nome do animal	SP17C (Pupi)		
Espécie	Canina	Sexo	Não informado.
Tutor	Não informado.		
Solicitante	Rafael Garabet Agropian - UNISA (PetCOVID-19)		
Material utilizado	Swab orofaríngeo		
Data de coleta	10/03/2021	Data de entrada	18/03/2021
Informes clínicos	Não informado.		
Método	RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa em Tempo Real)		

RESULTADO	SARS-CoV-2 - Alvo N1		
	Detectável	CT	Quantificação (cópias RNA/μL)
		33,25	6,14
	SARS-CoV-2 - Alvo N2		
	Detectável	CT	Quantificação (cópias RNA/μL)
		30,78	23,35

Controles de Validação de Ensaio	Positivo	Válido/Conforme
	Negativo	Válido/Conforme
	Interno	Válido/Conforme

CT: Cycle Threshold. Valor auxiliar utilizado na interpretação do resultado detectável.

Interpretação dos Resultados:


- Detectável: presença de material genético de SARS-CoV-2 na amostra avaliada.
- Não detectável: ausência de material genético de SARS-CoV-2 na amostra avaliada.

Comentário técnico:

O método utilizado foi desenvolvido somente para detecção de RNA viral de SARS-CoV-2. Os primers e probes são direcionados para dois alvos genéticos de SARS-CoV-2 (N1 e N2) e fazem parte do kit 2019-nCoV CDC EUA (IDT), baseado no protocolo recomendado pelo CDC (Center for Disease Control and Prevention). O controle interno é direcionado para alvo do gene de referência endógeno β-actina.

Data de emissão do resultado: 23/03/2021

Responsabilidade técnica


Dr. Otávio Valério de Carvalho
Médico Veterinário - CRMV-MG 8201
Diretor técnico - TECSA Laboratórios



Coronavírus SARS-CoV-2

Real Time PCR Quantitativo

Nome do animal	SP17C (Pupi)		
Espécie	Canina	Sexo	Não informado.
Tutor	Não informado.		
Solicitante	Rafael Garabet Agropian - UNISA (PetCOVID-19)		
Material utilizado	Swab retal		
Data de coleta	10/03/2021	Data de entrada	18/03/2021
Informes clínicos	Não informado.		
Método	RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa em Tempo Real)		

RESULTADO	SARS-CoV-2 - Alvo N1		
	Detectável	CT	Quantificação (cópias RNA/ μ L)
		35,90	1,09
	SARS-CoV-2 - Alvo N2		
Detectável	CT	Quantificação (cópias RNA/ μ L)	
	35,45	1,93	

Controles de Validação de Ensaio	Positivo	Válido/Conforme
	Negativo	Válido/Conforme
	Interno	Válido/Conforme

CT: Cycle Threshold. Valor auxiliar utilizado na interpretação do resultado detectável.

Interpretação dos Resultados:

- **Detectável:** presença de material genético de SARS-CoV-2 na amostra avaliada.
- **Não detectável:** ausência de material genético de SARS-CoV-2 na amostra avaliada.

Comentário técnico:

O método utilizado foi desenvolvido somente para detecção de RNA viral de SARS-CoV-2. Os primers e probes são direcionados para dois alvos genéticos de SARS-CoV-2 (N1 e N2) e fazem parte do kit 2019-nCoV CDC EUA (IDT), baseado no protocolo recomendado pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention). O controle interno é direcionado para alvo do gene de referência endógeno β -actina.

Data de emissão do resultado: 23/03/2021

Responsabilidade técnica

Dr. Otávio Valério de Carvalho
Médico Veterinário - CRMV-MG 8201
Diretor técnico - TECSA Laboratórios



Coronavírus SARS-CoV-2

Real Time PCR Quantitativo

Nome do animal	SP25F (Ravena)		
Espécie	Felina	Sexo	Não informado.
Tutor	Não informado.		
Solicitante	Rafael Garabet Agropian - UNISA (PetCOVID-19)		
Material utilizado	Swab orofaríngeo		
Data de coleta	16/03/2021	Data de entrada	18/03/2021
Informes clínicos	Não informado.		
Método	RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa em Tempo Real)		

RESULTADO	SARS-CoV-2 - Alvo N1		
	Detectável	CT	Quantificação (cópias RNA/μL)
		28,17	460,25
	SARS-CoV-2 - Alvo N2		
	Detectável	CT	Quantificação (cópias RNA/μL)
		26,94	1.006,30

Controles de Validação de Ensaio	Positivo	Válido/Conforme
	Negativo	Válido/Conforme
	Interno	Válido/Conforme

CT: Cycle Threshold, valor auxiliar utilizado na interpretação do resultado detectável.

Interpretação dos Resultados:


- **Detectável:** presença de material genético de SARS-CoV-2 na amostra avaliada.
- **Não detectável:** ausência de material genético de SARS-CoV-2 na amostra avaliada.

Comentário técnico:

O método utilizado foi desenvolvido somente para detecção de RNA viral de SARS-CoV-2. Os primers e probes são direcionados para dois alvos genéticos de SARS-CoV-2 (N1 e N2) e fazem parte do kit 2019-nCoV CDC EUA (IDT), baseado no protocolo recomendado pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention). O controle interno é direcionado para alvo do gene de referência endógeno β-actina.

Data de emissão do resultado: 23/03/2021

Responsabilidade técnica


Dr. Otávio Valério de Carvalho
Médico Veterinário - CRMV-MG 8201
Diretor técnico - TECSA Laboratórios



Anexo 5

Entrevista Record TV

<http://recordtv.r7.com/fala-brasil/videos/animais-que-tiveram-contato-com-humanos-infectados-pelo-coronavirus-serao-testados-21102020>

Revista UNISA

<http://www.unisa.br/A-UNISA/Noticias/2020/Unisa-seleciona-casos-para-estudar-transmissao-da-Covid-de-homens-para-animais-6421.html>

Revista Veja SP

<https://vejasp.abril.com.br/saude/sao-paulo-tem-primeira-confirmacao-de-pet-com-covid-19/>

UNISA YouTube

<https://m.youtube.com/watch?v=vPIQjMO7DJ0>

E-UNISA: https://unisateste-my.sharepoint.com/personal/rqarabet_prof_unisa_br/_layouts/15/onedrive.aspx?FolderCTID=0x012000449DDC7539DC5A4297655E76C9FE4DFF&id=%2Fpersonal%2Frgarabet%5Fprof%5Funisa%5Fbr%2FDocuments%2Fveterinaria%2Fdepto%2FP%C3%B3s%2Dstricto%2FH%C3%A9lida%20Deliane%2FPROFESSOR%20%2D%20RAFAEL%2FCurr%C3%ADculo%20Lattes%2FE%2Dunisa%2DDezembro2020%2Epdf&parent=%2Fpersonal%2Frgarabet%5Fprof%5Funisa%5Fbr%2FDocuments%2Fveterinaria%2Fdepto%2FP%C3%B3s%2Dstricto%2FH%C3%A9lida%20Deliane%2FPROFESSOR%20%2D%20RAFAEL%2FCurr%C3%ADculo%20Lattes

<https://vejasp.abril.com.br/blog/bichos/primeira-gata-covid-19-sao-paulo/>

First reported cases of SARS-CoV-2 infection in pets in São Paulo, Brazil

Rafael G. Agopian¹, Suelen C. G. da Luz², Alexandre G. B. Zebraf¹, Giovanna F. de Sousa¹, Igor A. V. de Oliveira¹, Leticia S. Lima¹, Marcela A. Sechi¹, Mayara C. de Oliveira¹, Valéria F. Rudinski¹, Daniel Friguglietti Brandespim³, Otávio V. de Carvalho⁴, Christina Pettan-Brewer⁵, Andrea P. dos Santos⁶, Louise B. Kmetiuk⁷, and Alexander Welker Biondo⁷

1. Department of Veterinary Medicine, Veterinary College, University of Santo Amaro (UNISA), São Paulo, Brazil; 2. Department of Medicine, University of Santo Amaro (UNISA), São Paulo, Brazil; 3. Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; 4. TECSA Animal Laboratories, Belo Horizonte, Brazil; 5. Department of Comparative Medicine, School of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, USA; 6. Department of Comparative Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA; 7. Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

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

Co-authors: RGA: rgarabet@prof.unisa.br, SCGL: su-guedes@uol.com.br, AGBZ: zebraf.vet@gmail.com,

GFS: gih.funiscello@hotmail.com, IAWO: l.vonvetere@gmail.com, LSL: leticialima.x@gmail.com,

MAS: marcela.sechi@hotmail.com, MCD: coliveira.mayara@gmail.com, VFR: v.rudinski@hotmail.com,

DFB: danielbrandespim@gmail.com, OVC: otaviovalerio@tacs.com.br, CP: kcpb@uw.edu, APS: santos1@purdue.edu,

LBK: louisebadhk@gmail.com

Received: 24-05-2022, Accepted: 03-10-2022, Published online: 16-11-2022

doi: [www.doi.org/10.14202/vetworld.2022.2593-2596](https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2593-2596) How to cite this article: Agopian RG, da Luz SCG, Zebraf AGB, de Sousa GF, de Oliveira IAV, Lima LS, Sechi MA, de Oliveira MC, Rudinski VF, Brandespim DF, de Carvalho OV, Pettan-Brewer C, dos Santos AP, Kmetiuk LB, and Biondo AW (2022) First reported cases of SARS-CoV-2 infection in pets in São Paulo, Brazil, *Veterinary World*, 15(11): 2593–2596.

Abstract

Background and Aim: The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is responsible for the global coronavirus pandemic (COVID-19) in humans in 2019. Although SARS-CoV-2 infection is primarily asymptomatic and transitory in companion animals, the role of these animals in the life cycle of the virus remains unclear. This study aimed to survey the first SARS-CoV-2 infection cases in pets, including a dog and three cats in São Paulo, Brazil.

Materials and Methods: We invited COVID-19-positive pet owners to participate in the survey and obtained nasal, oropharyngeal, and rectal swab samples from their pets. These samples were placed in vials and subjected to a real-time quantitative polymerase chain reaction. In addition, the owners answered an epidemiological questionnaire, and the pets underwent clinical examination and monitoring.

Results: Out of 49 sampled pets, 3/19 (15.8%) cats and 1/30 (3.3%) dogs tested positive, with wide variations in viral loads. Despite the limitations of size and non-randomized sampling, our results showed that cats are more susceptible than dogs to SARS-CoV-2 infection, presenting a cat: dog ratio of 4.8: 1. Only one cat presented mild and transitory respiratory symptoms.

Conclusion: Although SARS-CoV-2 infection was detected in pets in the largest South American city and the COVID-19 epicenter at the time, these first detected pet cases displayed either none or mild clinical signs.

Keywords: novel coronavirus, One Health, veterinary medicine, zoonoses.

Introduction

In December 2019, a novel strain of coronavirus, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), was identified in Wuhan, China. This virus caused the coronavirus disease 2019 (COVID-19), which became a pandemic in early 2020, causing pneumonia and severe respiratory failure with high mortality among elderly, comorbid, and immunocompromised persons [1, 2]. SARS-CoV-2 belongs to the genus *Betacoronavirus*, which also includes the

SARS-CoV and the Middle East respiratory syndrome coronavirus [3].

The virus is believed to have originated in bats as it shares 96% genomic similarity with bat coronavirus RaTG13 [1]. Another wildlife species that may have transmitted SARS-CoV-2 is the pangolin (*Manis javanica*), whose virus shares 85%–92% genomic similarity [3].

Since 2002, cats and ferrets have been reported to be susceptible to experimental infection with SARS-CoV, which uses the same angiotensin-converting enzyme II (ACE2) receptor as SARS-CoV-2 for human cell entry [4]. Despite a few amino acid differences in the binding sites between human and other mammal species, monkeys have identical regions and infections, indicating interspecies interaction [5]. Cats are more susceptible than dogs, and experimentally infected cats can transmit the disease to other

Copyright: Agopian, 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.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER N. 66/2021

Projeto de Pesquisa: "Detecção de SARS-COV-2 em cães e gatos contactantes de tutores positivos no rt-PCR na Cidade de São Paulo"

Pesquisador Responsável: Prof. Rafael Garabet Agopian

Suellen Cristina Guedes da Luz

Curso: Medicina Veterinária

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca), as resoluções do CONCEA, que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais no país e a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, deliberando pela **Dispensa** do Projeto "**Detecção de SARS-COV-2 em cães e gatos contactantes de tutores positivos no rt-PCR na Cidade de São Paulo**".

São Paulo, 30 de dezembro de 2021.



PROFA. DRA. VALERIA CASTILHO ONOFRIO

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
UNISA - Universidade Santo Amaro

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS – DBCA CONCEA

5.2.9. Relatório de projetos ou protocolos

5.2.9.1. O responsável pelo projeto ou protocolo encaminhará à CEUA, ao final do estudo, um relatório de uso de animais. O relatório deverá conter informações básicas acerca do projeto ou protocolo baseando-se nos itens descritos no Anexo I (Formulário Unificado para Solicitação de Autorização para Uso de Animais em Ensino e/ou Pesquisa) da Resolução Normativa nº 04 do CONCEA, de 18 de abril de 2012.

VI. RESPONSABILIDADES DOS PESQUISADORES E PROFESSORES

VI.1. GERAIS

6.1.1. Pesquisadores e professores são responsáveis por todas as questões relacionadas ao bem-estar dos animais utilizados e devem agir de acordo com as exigências desta Diretriz. Essa responsabilidade se inicia quando os animais são alocados para uso em um projeto e se finaliza com término do mesmo.

6.1.2. Para garantir o bem-estar dos animais utilizados, os usuários de animais (pesquisadores, professores, alunos e técnicos) devem assegurar que a qualidade da supervisão do pessoal envolvido no cuidado e manejo dos animais usados esteja de acordo com a responsabilidade e com o nível de competência do pessoal.

6.1.3. Antes do início de qualquer atividade científica ou didática envolvendo o uso de animais, os pesquisadores e professores devem enviar uma proposta à CEUA indicando que o planejamento do projeto ou protocolo se encontra de acordo com esta Diretriz, com a Lei nº 11.794 e seus instrumentos de regulamentação.

6.1.4. Pesquisadores, professores, alunos e técnicos não podem iniciar atividade científica ou didática envolvendo o uso de animais antes de obter a aprovação por escrito da CEUA, cumprindo todas as exigências solicitadas por esta.

6.1.5. Ao solicitar a aprovação para uma proposta, usuários de animais (pesquisadores, professores, alunos, técnicos) devem informar à respectiva CEUA sobre outras Instituições científicas ou didáticas participantes do projeto ou protocolo.

6.1.6. Pesquisadores, professores, alunos e técnicos envolvidos em projetos com animais devem disponibilizar meios para que possam ser contatados em casos de emergência.

6.1.7. Os pesquisadores e professores devem garantir que a escolha da espécie animal a ser utilizada encontra-se apropriada ao fim científico ou didático. Devem ser observadas as condições de padrão genético, a ausência de patógenos específicos, a documentação de padrão sanitário, os históricos nutricionais e ambientais, e outros fatores relevantes.

6.1.8. Pesquisadores, professores, alunos e técnicos devem registrar e manter todas as informações sobre o uso e o monitoramento de animais usados para fins científicos ou didáticos. Os registros devem, sempre que possível, incluir a origem e o destino dos animais, o tempo de permanência dos animais no projeto, os procedimentos realizados, o manejo dos animais e as medidas para promoção do bem-estar animal durante seu período em experimentação.

6.1.9. A aprovação da CEUA é obrigatória quando animais são utilizados para adquirir, desenvolver ou demonstrar conhecimentos e técnicas para fins científicos ou didáticos.

6.1.10. Quando animais de produção, domésticos ou de companhia forem utilizados para fins científicos ou didáticos e seus proprietários (ou terceiros) tiverem a responsabilidade pelo tratamento e cuidados diários, a descrição dessas responsabilidades do pesquisador ou professor, assim como as do proprietário do(s) animal(is) ou terceiros devem estar claramente definidas na proposta.

6.1.11. Quando cabível deve ser anexado à proposta o Termo de Consentimento – TC, assinado pelos responsáveis.

6.1.12. Nos casos em que cadáveres ou parte deles sejam oriundos de animais utilizados em experimentos, o profissional responsável pelo protocolo original deverá obter aprovação prévia da CEUA. Nos casos em que cadáveres ou parte deles tenham outra origem, o profissional responsável deve informar a procedência deles à CEUA.

Referências

ADDIE, D.D.; JARRETT, O. Feline Coronavirus Infections. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and the cat. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. p.88-102.

Barrozo L.V, Serafim M.B, Moraes S.L, Mansur G. Monitoramento espaço-temporal das áreas de alto risco de COVID-19 nos municípios do Brasil. Hygeia 2020; 43 (2): 417-25. <http://doi.org/10.14393/Hygeia0054547>

CUI, J. et al. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nat. Rev. Microbiol., v.17, p.181-192, 2019. doi: 10.1038/s41579-018-0118-9

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. The Lancet, v.395, n.10223, p.497-506, 2020. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5

KREUTZ, Luiz C. et al. SARS-cov-2/COVID/19 em animais de companhia. **Ars Veterinaria**, v. 37, n. 1, p. 01-02, 2021.

LAM, T. et al. Identification of 2019-nCoV related coronaviruses in Malayan pangolins in southern China. Nature, 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2169-0

LAU, E.; *VIN NEWS SERVICE. Tigers, lions and the novel coronavirus: a discovery unfolding. 2020. Disponível em:*
< <https://news.vin.com/default.aspx?pid=210&Id=9613371>

LI, R. et al. Analysis of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) from different species sheds some light on cross-species receptor usage of a novel coronavirus 2019-nCoV. J. Infec., v.80, n.4, p.469-496, 2020. doi: 10.1016/j.jinf.2020.02.013

LOPES, Osayanne Fernandes Martins; GOMES, Naelson Railson de Sousa; FREITAS, Daniela Reis Joaquim; EVANGELISTA, Luanna Soares de Melo. COVID19 e os animais domésticos: há alguma evidência de relação entre eles? Journal of Health and Biological Sciences, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2020.

MARTINA, B.E.E. et al. SARS virus infection of cats and ferrets. Nature, v.425, n.6961, p.915-915, 2003. doi: 10.1038/425915^a

MCLOOSE, Denise et al. From People to Panthera: Natural SARS-CoV-2 Infection in Tigers and Lions at the Bronx Zoo. mBio, vol. 11, n. 5 e02220-20, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33051368/>

OIE (World Organisation for Animal Health) SARS-CoV-2 positive test results in dogs in Hong Kong: Follow-up report no. 3 (28/03/2020). Disponível em:

<https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=33762>

PARRY, Nicola M. A. COVID-19 and pets: when pandemic meets panic. *Forensic Science International: Reports*, v. 2, p. 1-4, 2020.

PERISÉ-BARRIOS, A.J. et al. Humoral responses to SARS-CoV-2 by healthy and sick dogs during the COVID-19 pandemic in Spain. *BioMed Central*, v. 52, n. 22, 2021.

SIT, Thomas H. C. et al. Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature*, vol. 586, n. 7831, p. 776-778, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32408337/>.

SHI, J.; WEN, Z.; ZHONG, G.; YANG, H.; WANG, C.; HUANG, B.; LIU, R.; HE, X.; SHUAI, L.; SUN, Z.; ZHAO, Y.; LIU, P.; LIANG, L.; CUI, P.; WANG, J.; ZHANG, X.; GUAN, Y.; TAN, W.; WU, G.; CHEN, H.; BU, Z. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. *Science*, 2020. DOI: 10.1126/science.abb7015

WAN, Y. et al. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.*, v.94, n.7, p.e00127-20, 2020. doi: 10.1128/JVI.00127-20

WANG, L.; ZHANG, Y. Animal Coronaviruses: A Brief Introduction. In: Wang, L (ed) *Animal Coronaviruses*. London, **Humana Press**, v. 1, p:3-14, 2016

WCS News Room. Update: Bronx Zoo Tigers and Lions Recovering from COVID-19. 2020. Disponível em: <<https://newsroom.wcs.org/News-Releases/articleType/ArticleView/articleId/14084/Update-Bronx-Zoo-Tigers-and-Lions-Recovering-from-COVID-19.aspx>>

ZHOU, P.; YANG, X. L.; WANG, X. G.; HU, B.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; SI, H.R.; ZHU, Y.; LI, B.; HUANG, C.L.; CHEN, H-D.; CHEN, J.; LUO, H.; GUO, H.; JIANG, R-D.; LIU, M-Q.; CHEN, Y.; SHEN, X-R.; WANG, X.; ZHENG, X-S.; ZHAO, K.; CHEN, Q-J.; DENG, F.; LIU, L-L.; YAN, B.; ZHAN, F-X.; WANG, Y-Y.; XIAO, J.F.; SHI, Z. L.; A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020. DOI:10.1038/s41586-020-2012-7

ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England journal of medicine*, vol. 382, n. 8, p. 727-733, 2020.