

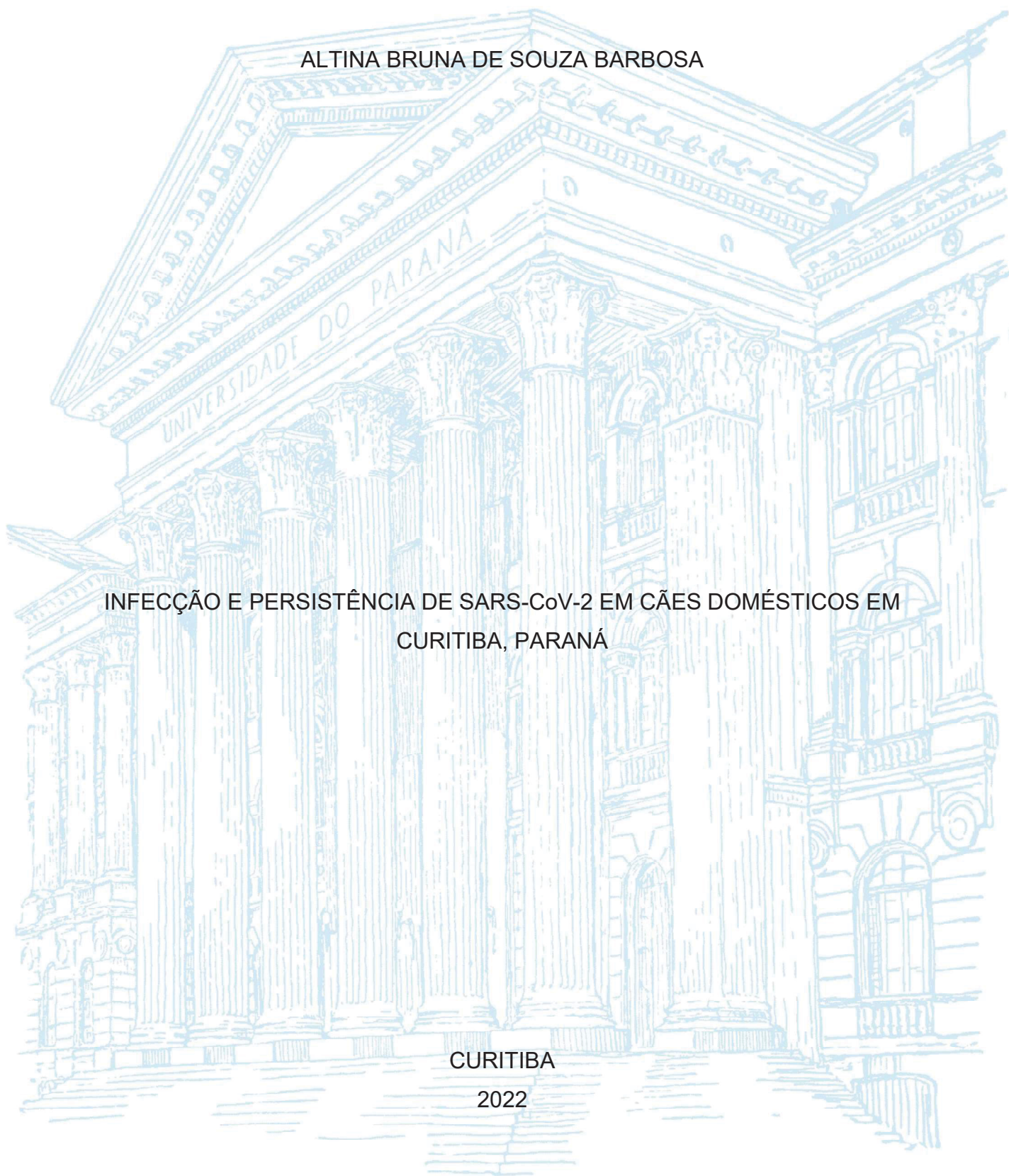
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALTINA BRUNA DE SOUZA BARBOSA

INFECÇÃO E PERSISTÊNCIA DE SARS-CoV-2 EM CÃES DOMÉSTICOS EM
CURITIBA, PARANÁ

CURITIBA

2022



ALTINA BRUNA DE SOUZA BARBOSA

INFECÇÃO E PERSISTÊNCIA DE SARS-CoV-2 EM CÃES DOMÉSTICOS EM
CURITIBA, PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, no Setor de Ciências Biológicas, na Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alexander Welker Biondo

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Barbosa, Altina Bruna de Souza.

Infecção e persistência de SARS-CoV-2 em cães domésticos em Curitiba, Paraná. /
Altina Bruna de Souza Barbosa. – Curitiba, 2022.
1 recurso on-line : PDF.

Orientador: Alexander Welker Biondo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. COVID-19 (doença). 2. Relações homem-animal. 3. SARS-CoV-2. 4. Cães. I. Título.
II. Biondo, Alexander Welker. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ALTINA BRUNA DE SOUZA BARBOSA** intitulada: **INFECÇÃO E PERSISTÊNCIA DE SARS-CoV-2 EM CÃES DOMÉSTICOS EM CURITIBA, PARANÁ**, sob orientação do Prof. Dr. ALEXANDER WELKER BIONDO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 03 de Agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica

03/08/2022 20:30:01.0

ALEXANDER WELKER BIONDO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

04/08/2022 06:38:25.0

VIVIEN MIDORI MORIKAWA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - SAÚDE COLETIVA)

Assinatura Eletrônica

04/08/2022 08:07:02.0

JULIANA FERREIRA DE MOURA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

*Dedico este trabalho à minha filha, Felipa, razão pela
qual eu continuo seguindo em frente.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial minha mãe Angela Afonsina por me ensinar que o conhecimento é o bem mais valioso que podemos ter. É meu exemplo de persistência e superação. Agradeço por ter me ensinado, com palavras e exemplos, que o estudo é o melhor caminho para conquistar o que almejo. Às minhas irmãs pelo apoio nessa jornada. Agradeço à minha filha, Felipa, por sempre ser luz nos meus dias e, mesmo sem saber, me motivou e não me deixou desistir.

Aos colegas do Laboratório de COVID-19 da UFPR, em especial Madson Melo e Carla Royer, pelo auxílio e companheirismo até nos dias mais difíceis da rotina do laboratório. Ainda, agradeço aos Professores Ana Cláudia Bonatto, Roseli Wassem, Jaqueline Carvalho, Daniela Gradia, Douglas Adamoski, Emanuel Maltempi e Edvaldo Trindade, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório da COVID-19 da UFPR e por todo aprendizado que me proporcionaram. Ao colega de mestrado, Fernando Doline, pela parceria em todas as etapas dessa jornada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto.

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Alexander Welker Biondo e à Dra. Louise Bach Kmetiuk pelas orientações, apoio, confiança e compreensão. A dedicação de vocês à pesquisa é admirável e inspiradora. Agradeço pelo acolhimento e todos ensinamentos.

A todos que participaram desse projeto e o tornaram real.

*“Para nós os grandes homens não são aqueles que resolveram os problemas, mas
aqueles que os descobriram.”*

Albert Schweitzer

RESUMO

O SARS-CoV-2, agente etiológico responsável pela pandemia de COVID-19, é um vírus com potencial zoonótico já demonstrado. Este fato somado à alta prevalência do vírus no mundo todo, tendo já infectado mais de 200 milhões de pessoas, coloca em risco também os animais em contato próximo com humanos. Mesmo com a especificidade molecular de reconhecimento das células do hospedeiro pelo vírus, foram demonstradas infecções naturais e experimentais de animais domésticos e silvestres pelo SARS-CoV-2. Isso ocorre devido a semelhanças na sequência e estrutura do receptor celular que interage com o vírus, entre as variadas espécies. Este projeto 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 zooantroponótica no Brasil”, que está sendo realizado em seis capitais brasileiras. Foram coletadas amostras de swab nasal, oral e retal de cães de tutores positivos para COVID-19, na cidade de Curitiba, Paraná. As amostras de swab foram analisadas para detecção de SARS-CoV-2 por RT-qPCR. Ainda, foram coletadas amostras de sangue para avaliação de presença de anticorpos específicos para SARS-CoV-2 através de ensaio de ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) por *beads* magnéticas. Foram identificados 20 tutores positivos para SARS-CoV-2, de 13 residências. Destas, 5 de 22 cães (22,7%) foram positivos para detecção de SARS-CoV-2 por RT-qPCR. A persistência do vírus após oito e nove dias foi detectada em amostras de swab de orofaringe de dois dos cinco cães (40%). Foi possível observar que a detecção de SARS-CoV-2 nos cães foi associada a cargas virais mais altas nos tutores. Todos os cinco cães positivos para RT-qPCR tinham anticorpos para pelo menos uma proteína viral testada no ensaio sorológico. Através da aplicação de um questionário epidemiológico foi possível observar que a detecção molecular de SARS-CoV-2 em cães foi associada a presença de sinais clínicos como resfriado, tosse ou diarreia ($p = 0,039$), número de pessoas positivas no domicílio ($p = 0,002$) e maior carga viral do tutor ($p = 0,039$). Os achados evidenciam o risco de infecção de humanos para cães, principalmente quando há interação próxima e alta carga viral do tutor. Dessa forma, sugere-se que pessoas com COVID-19 devem tomar as mesmas medidas preventivas que realizam com pessoas, ao interagir com seus cães durante o isolamento.

Palavras-chave: COVID-19, animais de companhia, transmissão, SARS-CoV-2

ABSTRACT

SARS-CoV-2, the etiological agent of the COVID-19 pandemic, is a virus with proved zoonotic potential. This fact, added to the high worldwide prevalence of the virus that already infected more than 200 million people, also set animals that lives in close contact with humans at risk. Even with the molecular specificity of the virus in recognition of host cells, both natural and experimental infections of domestic and wild animals by SARS-CoV-2 have been demonstrated. This is due to similarities among the different species in the sequence and structure of the cell receptor that interacts with the virus. This project is part of the “Multicenter Study for the Surveillance of SARS-CoV-2 in Companion Animals with Interface to One Health (PetCOVID-19 Study): prospective cohort of domiciled mammals for risk assessment of zoonanthroponotic transmission in Brazil”, which is being carried out in six Brazilian capitals. Nasal, oral, and rectal swab samples were collected from dogs of COVID-19 positive owners in the city of Curitiba, Paraná. Swab samples were analyzed for detection of SARS-CoV-2 by RT-qPCR. Furthermore, blood samples were collected to evaluate the presence of specific antibodies to SARS-CoV-2 through an ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) using magnetic beads. Twenty SARS-CoV-2 positive tutors from 13 households were identified. Of these households, 5 of 22 dogs (22.7%) were positive for SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR. Virus persistence after eight and nine days was detected in oropharyngeal swab samples from two of five dogs (40%). It was possible to observe that the detection of SARS-CoV-2 in dogs was associated with higher viral loads in tutors. All five RT-qPCR positive dogs had antibodies to at least one viral protein tested in the serological assay. Through the application of an epidemiological questionnaire, it was possible to observe that the molecular detection of SARS-CoV-2 in dogs was associated with the presence of clinical signs such as cold, cough or diarrhea ($p = 0.039$), number of positive people in the household ($p = 0.002$) and higher viral load of the owner ($p = 0.039$). The findings show the risk of infection from humans to dogs, especially when there is close interaction and high viral load from the tutor. Thus, it is suggested that people with COVID-19 should take the same preventive measures as they do with people, when interacting with their dogs during isolation.

Keywords: COVID-19, companion animals, transmission, SARS-CoV-2

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURE 1 -	The median of owners Ct was lower in the group of dogs with a positive result (13.83) compared to the group of dogs with a negative result (21.57). The Ct value is inversely proportional to the viral load presented in the sample. That is, the lower the Ct, the higher the owner's viral load.....	34
FIGURE S1 -	Number of positive dogs in the household in relation to the number of positive people in the household.....	38
FIGURE S2 -	Analysis of the distribution of asorbance values obtained in the ELISA assay based on magnetic beads in the different groups - (A) Absorbance signal for IgG anti-N; (B) Absorbance signal for anti-Spike IgG.....	47

LISTA DE TABELAS

TABLE 1 -	Ct (Cycle threshold) comparisons between owners (O) and dogs (D) in households with positive dogs. Dogs that showed amplification of one or more genes of the SARS-CoV-2 virus underwent new sample collection after 7, 10 and/or 14 days to assess the virus persistence in positive dogs.....	35
TABLE S1 -	Result interpretation for SARS-CoV-2 detection using a commercial diagnostic kit (Allplex™ 2019-nCoV, Seegene, Seoul, South Korea).....	39
TABLE S2 -	Epidemiological Questionnaire – Multicentric Study – Description of the characteristics of the dogs, owners and homes included in the study, according to the result of the RT-PCR test for SARS-CoV-2 in dogs (qualitative variables).....	40
TABLE S3 -	Description of the characteristics of the dogs, owners and homes included in the study, according to the result of the RT-PCR test for SARS-CoV-2 in dogs (quantitative variables).....	43
TABLE S4 -	Ct values of RT-qPCR SARS-Cov-2 detection, using a commercial kit (Allplex™ 2019-nCoV, Seegene, Seul, South Korea), for all households.....	44
TABLE S5 -	CT Values of probe-based genotyping system to detect VOCs (Variants of Concern), using a dropout scheme for Spike Δ69–70 and Orf1a Δ3675–3677 deletions.....	45
TABLE S6 -	Absorbance value obtained in the serological assay based on magnetic beads. Dog blood samples obtained before the pandemic were used as a negative control. The cut-off was established through calculation (Mean of pre pandemic samples + 3x Standard Deviation). Cut-off N protein = 596; Cut-off Protein Spike = 434; PP = Pre pandemic sample.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

CDC	-	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIRD	-	Doença respiratória infecciosa canina
COVID-19	-	<i>Coronavirus disease 2019</i>
CRCoV	-	Coronavírus respiratório canino
cECA-2	-	Enzima conversora de angiotensina 2 canina
hECA-2	-	Enzima conversora de angiotensina 2 humana
ELISA	-	<i>Enzyme-linked immunoassay</i>
IgG	-	Imunoglobulina G
MERS-CoV	-	<i>Middle East respiratory syndrome</i>
ORF	-	<i>Open reading framing</i>
RBD	-	<i>Receptor binding domain</i>
RRAR	-	Sítio de clivagem polibásico
RT-qPCR	-	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SARS-CoV	-	<i>Severe acute respiratory syndrome Coronavirus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	SARS-CoV-2	14
2.2	Coronavírus em cães	17
2.3	SARS-CoV-2 em cães	18
3	PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	20
3.1	Infection of SARS-CoV-2 in domestic dogs associated with owner viral load ..	20
4	DISCUSSÃO	49
5	CONCLUSÃO.....	51
6	REFERÊNCIAS	52
	ANEXO A – QUESTIONÁRIO DE TELEVIGILÂNCIA PetCOVID-19 STUDY	57
	ANEXO B – CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA DE USO ANIMAL	62

1 INTRODUÇÃO

O ponto inicial da pandemia de COVID-19 (do inglês *Coronavirus Disease 2019*) foi identificado como um grupo de casos de pneumonia com origem na cidade de Wuhan, na China, em dezembro de 2019. Essa doença foi caracterizada como potencial zoonose uma vez que o epicentro inicial da COVID-19 foi ligado ao possível contato com animais selvagens vendidos no atacado de frutos do mar e mercados de animais exóticos de Wuhan (ZHU et al., 2020). Após análise da sequência genômica de isolado de amostras de pacientes nos estágios iniciais do surto em Wuhan, foi possível a confirmação de que o agente etiológico é um novo beta-coronavírus, relacionado ao SARS-CoV (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus*), denominado SARS-CoV-2 (WU et al., 2020a; ZHOU et al., 2020).

Apesar de a COVID-19 ser uma doença predominantemente humana, o SARS-CoV-2 foi detectado em outras espécies animais, incluindo cães, gatos, visons e primatas não-humanos (ABDEL-MONEIM; ABDELWHAB, 2020). Foram registrados surtos de infecção por SARS-CoV-2 em visons na Europa, levando ao abate generalizado desses animais e à proibição temporária de sua criação comercial (MOLENAAR et al., 2020; OUDE MUNNINK et al., 2020). Com o avanço da pandemia e milhões de pessoas contaminadas com o SARS-CoV-2, surgiram relatos de infecções em cães e gatos (FERASIN et al., 2021; SHI et al., 2020; SIT et al., 2020). Até agosto de 2021 doze países haviam relatado a ocorrência de infecção natural de cães, geralmente associadas ao contato com uma pessoa com COVID-19 (OIE, 2021). Uma característica em comum nos casos de animais de companhia infectados é o contato próximo com uma ou mais pessoas positivas para COVID-19, geralmente o próprio tutor (DE MORAIS et al., 2020), demonstrando fortes indícios de que seres humanos podem transmitir o vírus aos seus animais de companhia (FERASIN et al., 2021; MEDKOUR et al., 2021; SIT et al., 2020).

O primeiro relato de infecção natural por SARS-CoV-2 em cão ocorreu em Hong Kong. Um cão da raça Spitz Alemão de 17 anos com diversas comorbidades permaneceu assintomático, mas foi colocado em quarentena quando seu tutor foi hospitalizado com COVID-19. Após exame realizado por um Médico Veterinário, foram coletadas amostras de swab nasal, oral e retal. Tanto as amostras nasal e oral foram positivas para detecção de SARS-CoV-2. Ao realizar sequenciamento do genoma viral

encontrado no cão foi observada identidade com a sequência do vírus encontrada no tutor, sugerindo transmissão humano-animal. Ainda, o cão apresentou anticorpos anti-SARS-CoV-2 detectáveis (OIE-WAHIS, 2020).

O CDC (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) recomenda que sejam testados animais de companhia que tenham contato com pessoas diagnosticadas com COVID-19 ou apresentem sinais clínicos consistentes com infecção por SARS-CoV-2. Assim como as pessoas, animais podem permanecer assintomáticos, enquanto outros podem apresentar sinais respiratórios ou gastrointestinais (CDC, 2021).

Considerando a transmissão do vírus SARS-CoV-2 a diferentes espécies animais, a proximidade dos tutores com os cães pode ser um fator de risco associado na infecção de cães domésticos. Além disso, a carga viral dos tutores pode estar associada a uma maior transmissibilidade do vírus aos cães. O objetivo deste trabalho foi identificar a infecção por SARS-CoV-2 em cães cujos tutores testaram positivo para o vírus, e verificar a persistência do vírus nesses animais. Ainda, avaliar o possível risco associado às cargas virais de tutores e o contato próximo com os cães, para ocorrência da transmissão para cães.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SARS-CoV-2

Infecções por coronavírus em humanos afetam principalmente o trato respiratório superior e o trato gastrointestinal, podendo variar de doença autolimitada a manifestações graves. Os coronavírus já descritos por infectar humanos são o HCoV-229E (229E), HCoV-OC43 (OC43), SARS-CoV, HCoV-NL63 (NL63), HCoV-HKU1 (HKU1), MERS-CoV (KIN et al., 2015) e o SARS-CoV-2 (ZHU et al., 2020). O SARS-CoV foi responsável por um surto de doença respiratória aguda grave na China durante 2002 e 2003, e o MERS-CoV é responsável por uma doença respiratória grave endêmica concentrada no Oriente Médio desde 2012 (PEIRIS et al., 2003).

Os coronavírus são categorizados em quatro gêneros, de acordo com sua filogenia e estrutura genômica (alfa-coronavírus, beta-coronavírus, gamma-coronavírus e delta-coronavírus). Alfa e beta-coronavírus infectam apenas mamíferos, enquanto gama e delta-CoVs afetam aves, podendo também infectar mamíferos (CUI; LI; SHI,

2019; SU et al., 2016). A organização e expressão do genoma de todos os coronavírus são semelhantes: uma ORF 1a/b (do inglês *Open Reading Frame*) codifica 16 proteínas não estruturais (nsp1 a nsp16) na extremidade 5', enquanto outra ORF na extremidade 3' codifica as proteínas estruturais Spike (S), Envelope (E), Membrana (M) e nucleocapsídeo (N) (MASTERS, 2006). O domínio de ligação ao receptor (RBD), localizado na proteína Spike é a parte mais variável do genoma do coronavírus (WU et al., 2020b; ZHOU et al., 2020). Neste domínio, seis aminoácidos são essenciais para a ligação aos receptores do hospedeiro e, cinco desses seis resíduos são diferentes entre SARSCoV-2 e SARS-CoV (ANDERSEN et al., 2020).

O SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, compartilha 79% e 50% de semelhança genômica com SARS-CoV e MERS-CoV (*Middle East respiratory syndrome coronavirus*), respectivamente (GORBALENYA et al., 2020; LU et al., 2020). Sabe-se que a maioria dos vírus que afetam humanos são de origem zoonótica (WOLFE; DUNAVAN; DIAMOND, 2007) e foi demonstrado que o SARS-CoV-2 possui identidade de 96% com um coronavírus de morcego (BatCoV RaTG13), encontrado no morcego-ferradura (*Rhinolophus affinis*) na província de Yunnan, na China. Desta forma, o morcego aparenta ser a espécie de origem do SARS-CoV-2, similarmente ao SARS-CoV e MERS-CoV (EPSTEIN et al., 2005). Tendo em vista que o contato entre humanos e morcegos não é usual, pode ser necessária a participação de um hospedeiro intermediário para a passagem do vírus aos humanos, assim como ocorreu com SARS-CoV e MERS-CoV. Esses vírus tiveram como hospedeiros intermediários civetas e camelos, respectivamente (CUI; LI; SHI, 2019). No caso do SARS-CoV-2 foi observada semelhança genômica de 91,02% com um coronavírus de pangolins (*Manis javanica*), sugerindo que estes animais foram hospedeiros intermediários antes de afetar humanos (ZHANG; WU; ZHANG, 2020).

A detecção do vírus em amostras biológicas pode ser realizada através de RT-qPCR para amplificação da sequência do RBD do gene da proteína S, que é a região mais variável do genoma. Primers específicos para essa região podem diferenciar o SARS-CoV-2 de todos os outros coronavírus humanos. Entretanto, é recomendado outros alvos, incluindo os genes de RdRp ou envelope (E) sejam usados para diagnóstico (ZHOU et al., 2020).

A interação do vírus com receptores específicos na membrana plasmática das células hospedeiras é um dos principais fatores que confere a especificidade ao vírus, tanto com relação à espécie hospedeira quanto ao tropismo tecidual. A infecção por coronavírus tende a ser espécie-específica, geralmente determinada pela interação da proteína S (*Spike*) presente na superfície viral com as células do hospedeiro. A proteína S, uma glicoproteína de membrana presente nos CoVs, é responsável pela adesão do vírus na célula do hospedeiro e posterior fusão celular (WENTWORTH; HOLMES, 2001). A afinidade da proteína S pelos receptores celulares do hospedeiro é determinada pela sua sequência de aminoácidos. Em humanos, a Enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2) é o receptor celular que é reconhecido pela proteína S nas infecções por HCoV-NL63, SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 (LAN et al., 2020; LI et al., 2003). Ainda, na proteína S há uma região denominada RBD (do inglês *Receptor binding domain*), formada por 69 resíduos de aminoácidos, que é responsável pela interação apropriada com a ECA-2. Essa região é variável entre os diferentes CoVs (LI et al., 2005). Em análise molecular, foi observado que a ECA-2 de cães (cECA-2) compartilha 83,88% de identidade de sequência com a ECA-2 de humanos (hECA-2). Ainda, ao analisar a estrutura do complexo RBD/cECA-2 e RBD/hECA-2 pesquisadores perceberam que a estrutura dos complexos é muito semelhante. Entretanto, o modo de interação dos dois complexos é diferente. RBD/cECA-2 apresentou número de átomos de contato, resíduos e ligações de hidrogênio menores do que os encontrados em RBD/hECA-2, justificando a afinidade 6,65 vezes menor de cECA2 para RBD do que a de hECA2 (ZHANG et al., 2021). Entretanto, uma mutação (N501Y) no RBD pode aumentar significativamente a afinidade à cECA-2, aumentando a possibilidade de transmissão interespecies.

Além do RBD, o SARS-CoV-2 possui um sítio de clivagem polibásico (RRAR) na junção das subunidades da proteína S, S1 e S2. Esse sítio de clivagem, além de permitir a clivagem por proteases, influencia na infectividade viral e na especificidade de hospedeiros (WALLS et al., 2020). Entretanto, esse sítio de clivagem não é encontrado no BatCoV RaTG13 ou no SARS-CoV-2-like de Pangolins. Essa diferença sugere que o vírus pode não passar diretamente dessas duas espécies para os humanos (ANDERSEN et al., 2020).

O SARS-CoV-2 além de ter origem zoonótica, pode afetar diversos hospedeiros. Há evidências de que a ECA-2 de diversos animais (macacos, coelho, pangolim, cavalo, gato, raposa, cachorro, porco, camelo, bovinos, caprinos e ovinos) pode se ligar ao RBD do SARS-CoV-2, de modo similar à ECA-2 humana (WU et al., 2020b). Além disso, foi demonstrado que o vírus é capaz de se replicar de forma eficiente em furões e gatos, mas fracamente em cães (SHI et al., 2020). Isso ocorre provavelmente devido à baixa afinidade do RBD viral à ECA-2 de cães, quando comparado à ECA-2 de humanos (ZHANG et al., 2021).

2.2 Coronavírus em cães

Em 2003, durante um grande surto de doenças respiratórias em um canil em Londres em 2003, o coronavírus respiratório canino (CRCoV) foi isolado pela primeira vez (ERLES et al., 2003). O CRCoV pertence ao gênero Beta-coronavírus e é intimamente relacionado ao coronavírus humano OC43 (ERLES; SHIU; BROWNLIE, 2007). Atualmente, esse vírus é considerado um importante agente etiológico de doenças respiratórias em cães de canil. O CRCoV apresenta tropismo pelos tecidos respiratórios, principalmente nas vias aéreas superiores (MITCHELL et al., 2013). Devido à predileção por tecidos do sistema respiratório o CRCoV está associado à doença respiratória leve durante os estágios iniciais da CIRDC (doença respiratória infecciosa canina), evidenciada tosse seca e secreção nasal (MITCHELL et al., 2013).

O CRCoV é diferente do coronavírus canino (CCoV), um alfacoronavírus, que é tradicionalmente considerado um patógeno entérico de baixa virulência. O CCoV é frequentemente identificado em cães com diarreia, mas também pode ser detectado em fezes de cães sem sinais clínicos (TENNANT et al., 1991). Embora os sinais clínicos da infecção por CCoV sejam frequentemente gastrointestinais e neurológicos, sua presença nos pulmões de cães infectados pode sugerir um envolvimento na patogênese da doença respiratória infecciosa canina. Para diferenciar casos respiratórios dos casos com tropismo unicamente intestinal, este foi denominado coronavírus canino pantrópico (PRIESTNALL et al., 2014).

2.3 SARS-CoV-2 em cães

Dois cães de uma residência em Hong Kong foram confirmados para detecção de SARS-CoV-2. Na residência havia casos humanos confirmados para COVID-19 e a sequência genética do vírus encontrado nos dois cães foi idêntica à observada nos casos humanos. Esses achados sugerem que pessoas com COVID-19 em contato com cães podem transmitir SARS-CoV-2 para estes animais (SIT et al., 2020).

Diante da hipótese da transmissão do SARS-CoV-2 a animais domésticos, um estudo realizou a infecção experimental de cães e gatos domésticos, a fim de elucidar a reação dos animais a este vírus. Os pesquisadores demonstraram que gatos são susceptíveis à infecção, sendo possível a detecção do vírus por via oral e nasal por longo período, podendo transmitir para outros gatos através de contato direto. Ainda, os felinos domésticos infectados desenvolveram uma robusta resposta imune humoral de anticorpos neutralizantes que evitou a reinfeção após segundo desafio com o vírus. Já em cães infectados experimentalmente não foi possível realizar a detecção do vírus em amostras orais e nasais após a infecção. Entretanto também houve soroconversão nesses animais e apresentaram resposta imune com anticorpos neutralizantes (BOSCO-LAUTH et al., 2020).

A infecção por SARS-CoV-2 em animais de companhia é geralmente subclínica, mas pode se apresentar com sinais clínicos respiratórios ou gastrointestinais (BOSCO-LAUTH et al., 2020). Apesar de os cães terem sido observados como não susceptíveis ao SARS-CoV-2 (SHI et al., 2020), cães com doenças pré-existentes podem apresentar quadros graves ou piora em decorrência da infecção pelo vírus. Um cão com evidência de doença respiratória crônica grave pré-existente apresentou piora clínica devido à infecção por SARS-CoV-2, evoluindo para óbito (CARPENTER et al., 2021). Em cães sem comorbidades, apesar de incomum, a infecção por SARS-CoV-2 também pode causar consequências graves (CARPENTER et al., 2021).

O diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 é realizado por RT-PCR de amostras do sistema respiratório, onde é feita detecção de sequências genômicas do vírus. Entretanto, o material genético viral é detectável por um tempo limitado após a infecção. Tendo em vista que os cães eliminam o vírus rapidamente (BOSCO-LAUTH et al., 2020), dificultando a detecção molecular por RT-qPCR, pode ser necessária também a análise

sorológica de anticorpos específicos para SARS-CoV-2 nestes animais (BIENZLE et al., 2022). A detecção de anticorpos específicos tem sido observada em taxas altamente variáveis sugerindo uma taxa de infecção maior do que o observado apenas com a detecção de sequências de RNA viral (STEVANOVIC et al., 2021; ZHAO et al., 2021).

3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

3.1 Infection of SARS-CoV-2 in domestic dogs associated with owner viral load

Title: Infection of SARS-CoV-2 in domestic dogs associated with owner viral load

Running title: SARS-CoV-2 in domestic dogs

Altina Bruna de Souza Barbosa¹, Louise Bach Kmetiuk¹, Otávio Valério de Carvalho^{1,2}, Fernando Rodrigo Doline¹, Ana Pérola Drulla Brandão³, Douglas Adamoski Meira⁴, Emanuel Maltempi de Souza⁴, Edvaldo da Silva Trindade⁴, Valter Baura⁴, David Soeiro Barbosa⁵, Daniel Friguglietti Brandespim⁶, Juliana Arena Galhardo⁷, Christina Pettan-Brewer⁸, Ana Marcia de Sá Guimarães⁹, Valéria Dutra¹⁰, Hélio Autran de Moraes¹¹, Luciano Huergo¹², Andrea Pires dos Santos¹³, Alexander Welker Biondo^{1,13*}

¹Graduate College of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, 81531-970, Brazil.

²TECSA Laboratories, Belo Horizonte, MG, 30110-042, Brazil.

³Department of Preventive Medicine, School of Medicine, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, 01246-903, Brazil.

⁴Departments of Genetic and of Cellular Biology and of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, 81530-000, Brazil.

⁵Graduate College of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil.

⁶Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, 52171-900, Brazil.

⁷Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil.

⁸Department of Comparative Medicine, School of Medicine, University of Washington, Seattle, WA, 98195, USA.

⁹Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, 05508-000, Brazil.

¹⁰Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Federal University of Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, 78060-900, Brazil.

¹¹Department of Clinical Sciences, Oregon State University, Corvallis, OR, 97331, United States.

¹²Federal University of Paraná (UFPR), Seashore Campus, Matinhos, PR, 83260-000, Brazil.

¹³Department of Comparative Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Purdue University, West Lafayette, IN, 47906, USA.

*Address for correspondence: Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná (UFPR), 1540 Funcionários Street, Curitiba, PR, 80035-050, Brazil.

Phone: +55 (41) 3350-5623. Email: abiondo@ufpr.br

Abstract

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)-positive pet owners are reported to be a risk factor for infection of their pets; however, the influence of the viral load and associated risks has not been fully established. This study aimed to assess potential association of viral load in owners with the presence of SARS-CoV-2 infection in their dogs. Of 20 SARS-CoV-2-positive pet owners from 13 families in Curitiba, Brazil, 5 of 22 (22.7%) dogs were positive for

SARS-CoV-2. Viral presence was detected in oropharyngeal samples for 2 of 5 (40.0%) dogs at 8 and 9 days after the first positive sample. Detection of SARS-CoV-2 in these dogs was associated with higher viral loads in the owners and close owner contact. All 5 RT-qPCR-positive dogs had antibodies to at least one viral protein tested in the serological assay. Molecular detection of SARS-CoV-2 in dogs was statistically associated with clinical signs such as cold, cough, or diarrhea ($P = 0.039$), number of positive persons in the household ($P = 0.002$), and higher viral load ($P = 0.039$). Such findings serve as a warning for risks of human to dog infection, mainly due to sharing beds and other close interactions without protection. In conclusion, people with coronavirus disease 2019 (COVID-19), particularly in households with multiple residents and high viral load, should take the same preventive measures when interacting with their dogs during self-isolation as they do with people.

Keywords: coronavirus, pets, transmission.

1. Introduction

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is described as a positive-sense single-stranded RNA virus causing the coronavirus disease 2019 (COVID-19) in humans (Zhu et al., 2020). While primarily a human infection, SARS-CoV-2 has been reported in other animal species such as cats, dogs, non-human primates, and minks (Abdel-Moneim and Abdelwhab, 2020). In dogs, the infection has been associated with close owner interaction, with or without associated clinical signs (de Moraes et al., 2020).

Dogs experimentally infected by SARS-CoV-2 intranasal inoculation resulted in viral particles found in 2 of 4 rectal swabs, with no detection in internal organs after 4 days, and

antibodies in 2 of 4 dogs after 14 days (Shi et al., 2020). Experimental studies have demonstrated seroconversion in dogs exposed to infected humans and an absence of viral shedding that suggested low susceptibility to SARS-CoV-2 (Bosco-Lauth et al., 2020).

Despite SARS-CoV-2 infected owners reportedly being risk factors for pet infection, viral load as an associated risk factor has not been fully established. As part of an ongoing multicentric study of SARS-CoV-2 in infected owners and their pets, this study aimed to assess the potential association of owner viral load with detection of SARS-CoV-2 in dogs of southern Brazil.

2. Materials and method

This study was conducted from October 2020 through June 2021 and assessed dogs of owners who tested positive for SARS-CoV-2 infection by RT-qPCR assay at the Federal University of Paraná after invitation, signed consent, and voluntary participation of owners and household members (Table S1). An epidemiological questionnaire was given to owners. Dogs were sampled via oropharyngeal and rectal swabs by a certified veterinarian after gentle physical restraint. Blood samples were collected for serological analysis on day 0 and after 7 days. This study was approved by the Ethics Committee in Animal Use (protocol number 4879280420).

2.1. SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR

The nucleic acid extraction was performed by an automated system using commercially available magnetic beads (Mvxap016Fast, Extracta 32, Locus Co, Cotia, SP, Brazil) following the manufacturer's protocol. One-step multiplex RT-qPCR was performed to detect three specific target genes of SARS-CoV-2 (N, RdRP, and E genes) using a commercial kit (Allplex™ 2019-nCoV, Seegene, Seoul, South Korea), following the manufacturer's recommendations. Cyclic

threshold (Ct) values ≤ 40 correspond to a detectable result, while Ct values > 40 or undetectable. Also, given that the kit used is a multiplex assay for 3 different target genes of SARS-CoV-2, the interpretation of the results is described in Table S2. The amplification of all three genes, E and N, E and RdRP, RdRp and N, only N or only RdRP, means 2019-nCoV (SARS-CoV-2) RNA is detected, and the sample is positive. If there is only amplification of gene E, as occurred for the first dog case (1.D1), confirmation using a different method is necessary. The 1.D1 case was confirmed with a different commercial kit to validate the results, eliminate the possibility of a false positive, and show effectiveness of the first kit at detecting the virus in canine samples. Diagnostic confirmation for the first case to validate the results using a second commercial RT-qPCR reaction kit (EuroRealTime SARS-CoV-2 kit, Euroimmun, Lübeck, Germany) for the detection of SARS-CoV-2 nucleic acids, following the manufacturer's recommendations. All swab samples were also tested at a private animal laboratory to ensure positivity (TECSA, Technology in Animal Health, Brazil). Furthermore, all dog samples were tested and found negative for Canine Adenovirus type 2, *Bordetella bronchiseptica*, Canine herpesvirus-1, and Canine Distemper virus.

2.2. Genotyping of Variants

Samples of positive dog households were further tested using a probe-based genotyping system to detect Variants of Concern, using a dropout scheme for Spike $\Delta 69-70$ and Orf1a $\Delta 3675-3677$ deletions as an outcome to distinguish B.1.1.7, B.1.351 or P.1, and wild type or other lineages, as previously established (Vogels et al., 2021). Due to the limitation of the technique, only samples that had Ct < 30 in RT-qPCR were genotyped. Assays were performed using a commercial system (GoTaq[®] Probe 1-Step RT-qPCR System, Promega, Madison, WI, USA) with a CDC N1 target included and a Ct 28 threshold defined to evaluate the gene dropouts.

2.3. Antibody detection

The magnetic bead ELISA assay was performed to verify the presence of specific antibodies to SARS-CoV-2 proteins in RT-qPCR positive dogs. Day zero was the day of swab sample collection. The blood samples from the dogs were analyzed for the presence of IgG antibodies to viral proteins nucleocapsid (N) and spike (S) by magnetic bead-based ELISA immunoassay (Huergo et al., 2021). The magnetic bead immunoassay was performed using a 96-well with flat bottom commercial plate (Cralplast plate, Cotia, SP, Brazil), as previously established (Conzentino et al., 2021). Aliquots of antigen-loaded beads were resuspended in tris buffered saline with tween 20 (TBST) containing 1% milk, with 0.1 ml of the mix put into each well. Four microliters of dog serum were diluted in 0.2 ml of TBST and put into wells of a second 96-well plate. The magnetic beads were transferred to the sample plate and incubated with the dog sample (serum) for 2 min with gentle mixing. Beads were captured and loaded in two sequential washing steps for 30 seconds in 1x TBST. For fluorescent detection, beads were incubated for 2 min with 0.15 ml of FITC-conjugated anti-dog antibody diluted 1:100 in 1x TBST, followed by a second wash step for 30 seconds at 1x TBST. When the reactions were complete, the beads were removed, and reading was performed using a TECAN M Nano plate reader (TECAN) operating at top fluorescent readout. Excitation 545nm (bandwidth 9nm and 25 flashes) and emission 578nm (bandwidth 20nm, integration time 20 μ s and Z position at 20,000 μ m). Dog blood samples obtained before the pandemic were used as a negative control. The cut-off point was established through calculation (mean of pre-pandemic samples plus 3x standard deviation).

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Fisher's exact test to verify the association between the results of SARS-CoV-2 in dogs (positive and negative) and the qualitative variables of the questionnaire (Table S3). The Mann-Whitney test was applied to compare the results of

SARS-CoV-2 in dogs (positive and negative) and the quantitative variables of the questionnaire. The tests were performed considering a bidirectional significance level (α) of 5%. IBM SPSS 26 (IBM corp., 2019) and Microsoft Excel 365® software were used as computational support.

3. Result

Out of 13 households with 22 dogs, 5 (22.7%) dogs tested positive and 17 (77.3%) dogs had negative results for SARS-CoV-2 by real-time RT-qPCR (Table S4). These were the first 5 reported dog cases in Brazil (OIE, 2021). Results and epidemiological data from all owners and their dogs are presented (Table 1).

Case 01 was a four-year-old male French Bulldog with no pre-existing diseases that shared a bed with the owner. The owner, an adult male, had symptoms on November 10th and tested positive (saliva sample) on November 12, 2020. The owner reported that the dog had mild and transitory nasal discharge. On November 19th, the owner tested negative (saliva) and the dog tested positive (oropharyngeal swab).

Dog cases 02 and 03 were part of family with 5 dogs and 4 people. Two human adults tested positive on November 19th. The following day, all household members were tested; nasopharyngeal swab samples from the people and oropharyngeal and rectal swab samples from the dogs were used to test. All the people and 2 of the dogs tested positive. The dogs were mixed-breed adults that slept on the same bed as 2 of the owners. The dogs tested negative on samples collected on November 30th.

Case 04 was a dog owned by an elderly couple. One person tested positive on a sample from November 19th. The dog slept in the living room on a pet bed. Samples from the entire

household were collected and results were positive on November 21st and 30th but negative on December 7th.

Case 05 was 1 dog that shared the bed with an owner couple. The couple had contact with the family of cases 02 and 03 when they were infected. Samples collected from this household on November 22nd and 30th, yielded positive results. On December 7th samples, all test results were negative.

The presence of SARS-CoV-2 RNA in 2 of 5 (40.0%) dogs was detected in oropharyngeal samples at 8 and 9 days after the first positive sampling.

A significant association was observed between the presence of clinical signs such as nasal discharge, cough, or diarrhea and a positive test result for SARS-CoV-2 in dogs ($P = 0.039$). Among the positive dogs, 80.0% showed signs of nasal discharge, cough, or diarrhea, while 76.5% of the negative dogs did not show such clinical signs. In addition, a statistically significant difference was observed between the number of confirmed human cases in the household and the result of SARS-CoV-2 in dogs ($P = 0.002$) (Figure S1). The median number of positive persons in the household was 2 for dogs with a positive test result compared to a median of 1 positive person for dogs with a negative test result. Furthermore, there was also a statistically significant difference between the owner viral load, which can be estimated using the Ct number, and the result of SARS-CoV-2 in dogs ($P = 0.039$) (Figure 01). The median of the owner Ct value was lower in the group of dogs with a positive result (13.83) compared to the group of dogs with a negative result (21.57). In this analysis, household 1 was excluded because the owner's sample was not collected during the symptomatic period of the disease, making it an outlier.

At probe-based genotyping, the samples 2.H1, 2.H2, 3.H1, 3.H2, and 4.H2 were identified as wild strains, with no identification of the Spike $\Delta 69-70$ and Orf1a $\Delta 3675-3677$ deletions as results distinguishing B.1.1.7, B.1.351, or P.1. Samples 2.H3, 2.H4, 3.D1, 4.H1, and 4.D1, despite having $CT > 30$, were included in the genotyping protocol to demonstrate the limitation of the technique and were classified as invalid, as they only showed N1 gene amplification (Table S5). All dogs showed high Ct values on RT-qPCR. Therefore, it was not possible to genotype the canine samples due to the low viral load.

Based on the magnetic bead ELISA assay, all 5 positive dogs by RT-qPCR showed intense fluorescence for at least one target viral protein (N and S), demonstrating seroconversion and the presence of specific SARS-CoV-2 antibodies (Table S6). Dogs 1.D1 and 2.D1 presented increased fluorescence intensity for both viral proteins in the two tested samples (days 0 and 7), presenting higher titration of specific anti-SARS-CoV-2 antibodies. Dog 4.D1 showed an increase in antibody titer only in the sample collected after 7 days. Dog 3.D1 showed antibodies only to protein N and dog 2.D4 showed antibodies only to protein S (Figure S2).

4. Discussion

The study presents the first 5 reports of naturally occurring SARS-COV-2 infection in dogs of Brazil, which were immediately notified to the Brazilian Ministry of Agriculture and the World Organization for Animal Health (OIE, 2021). Higher likelihood of dog infection was associated with closer contact with owners (such as exchanging kisses and sleeping on the same bed), presenting clinical signs noticed by owners, and with owners with higher viral load.

Although results have demonstrated a positive correlation between SARS-CoV-2 infection in dogs and clinical onset, signs were mild and thus corroborate previous studies showing pet infections as mostly asymptomatic or self-resolving (Sarah A. Hamer^{1*}, Alex Pauvolid-Corrêa^{1, 2}, Italo B. Zecca¹, Edward Davila¹, et al., 2017). However, death of domestic animals has been observed during the time of SARS-CoV-2 diagnosis, including a dog with evidence of pre-existing severe chronic respiratory disease presented clinical worsening due to SARS-CoV-2 infection, leading to the animal's death (Carpenter et al., 2021). Moreover, rare cases where SARS-CoV-2 infection could cause serious consequences in healthy dogs, regardless of their clinical history have also been reported (Carpenter et al., 2021; Davis et al., 2017). Such a wide difference in the outcome of dog cases mirrors some human cases and remains to be fully established.

The presence of SARS-CoV-2 RNA in dogs of this study has been described in dogs of China, with 5 positive nasopharyngeal swabs following 13-days after the first detection (Sit et al., 2020). In addition, a recent longitudinal study with domestic animals and owners in Brazil has shown 3 of 8 (37.5%) dogs tested positive to SARS-CoV-2 RNA in nasopharyngeal and oropharyngeal samples for 14 to 31 days after the first positive sample (Calvet et al., 2021). In addition, the correlation between the number of infected household owners and dog infection corroborates previous studies of human-to-human transmission, particularly among children (Madewell et al., 2020), which may be extrapolated to the interspecies transmission when there is close owner-dog contact.

The complex and multidimensional issues raised herein by the interface of human, animal, and environmental health have required a One Health Approach to better understand the epidemiology, prevention, and control of COVID-19 and SARS-CoV-2 transmission. Further multidisciplinary and comparative research should also be carried out to understand COVID-19

transmission and prevent future pandemics, particularly the role of humans and animals sharing the environment.

In summary, despite low sample numbers, molecular detection of SARS-CoV-2 in dogs was statistically associated with clinical signs such as nasal discharge, cough, or diarrhea, number of positive persons in the household, and higher viral load (low Ct number). Such findings should raise awareness of human-to-dog infection risk, especially when sharing beds or other closer interactions without protection. In conclusion, COVID-19 infected persons, particularly with multiple residents and high viral load, should take the same preventive person-to-person precautions with their dogs during self-isolation. In addition, dogs presenting mild clinical signs may likely indicate infection. Finally, as human-animal-environment interactions may play an important role in cross-species infection and transmission, One Health Approach should always be conducted in zoonotic infections.

Acknowledgments

The authors kindly thank faculties and technicians working at the Molecular and Serological Diagnostic Laboratories of Federal University of Parana, and Suzanne Pratt for editing and improving the article.

Funding

Present research was funded through the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (2020-1/402341).

Conflict of interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- Abdel-Moneim, A.S., Abdelwhab, E.M., 2020. Evidence for SARS-CoV-2 Infection of Animal Hosts. *Pathog. (Basel, Switzerland)* 9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070529>
- Bosco-Lauth, A.M., Hartwig, A.E., Porter, S.M., Gordy, P.W., Nehring, M., Byas, A.D., VandeWoude, S., Ragan, I.K., Maison, R.M., Bowen, R.A., 2020. Experimental infection of domestic dogs and cats with SARS-CoV-2: Pathogenesis, transmission, and response to reexposure in cats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 26382 LP – 26388. <https://doi.org/10.1073/pnas.2013102117>
- Calvet, G.A., Pereira, S.A., Ogrzewalska, M., Pauvolid-Corrêa, A., Resende, P.C., Tassinari, W. de S., Costa, A. de P., Keidel, L.O., da Rocha, A.S.B., da Silva, M.F.B., Dos Santos, S.A., Lima, A.B.M., de Moraes, I.C.V., Mendes Junior, A.A.V., Souza, T. das C., Martins, E.B., Ornellas, R.O., Corrêa, M.L., Antonio, I.M. da S., Guaraldo, L., Motta, F. do C., Brasil, P., Siqueira, M.M., Gremião, I.D.F., Menezes, R.C., 2021. Investigation of SARS-CoV-2 infection in dogs and cats of humans diagnosed with COVID-19 in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One* 16, e0250853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250853>
- Carpenter, A., Ghai, R., Gary, J., Ritter, J., Carvalho, F., Diel, D., Martins, M., Murphy, J.,

- Schroeder, B., Brightbill, K., Tewari, D., Boger, L., Gabel, J., Cobb, R., Hennebelle, J., Stanton, J., McCullough, K., Mosley, Y.-Y., Naikare, H., Radcliff, R., Parr, B., Balsamo, G., Robbins, B., Smith, D., Slavinski, S., Williams, C., Meckes, D., Jones, D., Frazier, T., Steury, K., Rooney, J., Torchetti, M., Wendling, N., Currie, D., Behraves, C.B., Wallace, R., 2021. Determining the Role of Natural SARS-CoV-2 Infection in the Death of Ten Domestic Pets. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-440343/v1>
- Conzentino, M.S., Santos, T.P.C., Selim, K.A., Wagner, B., Alford, J.T., Deobald, N., Paula, N.M., Rego, F.G.M., Zanette, D.L., Aoki, M.N., Nardin, J.M., Huergo, M.C.C., Reis, R.A., Huergo, L.F., 2021. Ultra-fast, high throughput and inexpensive detection of SARS-CoV-2 seroconversion using Ni²⁺ magnetic beads. *Anal. Biochem.* 631, 114360. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114360>
- Davis, M.F., Rankin, S.C., Schurer, J.M., Cole, S., Conti, L., Rabinowitz, P., 2017. Checklist for One Health Epidemiological Reporting of Evidence (COHERE). *One Heal.* (Amsterdam, Netherlands) 4, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.07.001>
- de Moraes, H.A., dos Santos, A.P., do Nascimento, N.C., Kmetiuk, L.B., Barbosa, D.S., Brandão, P.E., Guimarães, A.M.S., Pettan-Brewer, C., Biondo, A.W., 2020. 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. *Front. Vet. Sci.*
- Huergo, L.F., Selim, K.A., Conzentino, M.S., M Gerhardt, E.C., S Santos, A.R., Wagner, B., Alford, J.T., Deobald, N., Pedrosa, F.O., de Souza, E.M., Nogueira, M.B., Raboni, M., Souto, M., Rego, F.G., Zanette, D.L., Aoki, M.N., Nardin, J.M., Fornazari, B., P Morales, H.M., Borges, A., Nelde, A., Walz, J.S., Becker, M., Schneiderhan-Marra, N.,

- Rothbauer, U., Reis, R.A., Forchhammer, K., 2021. Magnetic Bead-Based Immunoassay Allows Rapid, Inexpensive, and Quantitative Detection of Human SARS-CoV-2 Antibodies 6, 703–708. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c02544>
- Madewell, Z.J., Yang, Y., Longini, I.M., Halloran, M.E., Dean, N.E., 2020. Household Transmission of SARS-CoV-2: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw. open*. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.31756>
- OIE, W.O. for A.H., 2021. COVID-19 - Events in animals [WWW Document].
- Sarah A. Hamer^{1*}, Alex Pauvolid-Corrêa^{1, 2}, Italo B. Zecca¹, Edward Davila¹, L., D. Auckland¹, Christopher M. Roundy³, Wendy Tang³, Mia Torchetti⁴, M.L.K., Melinda Jenkins-Moore⁴, Katie Mazingo⁴, Yao Akpalu⁵, Ria R. Ghai⁶, J.R.S., Casey Barton Behravesh⁶, Rebecca S. B. Fischer⁷, G.L.H., 2017. Natural SARS-CoV-2 infections, including virus isolation, among serially tested cats and dogs in households with confirmed human COVID-19 cases in Texas, USA. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 21–25.
- 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., Bu, Z., 2020. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science* (80-.). 368, 1016–1020. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
- Sit, T.H.C., Brackman, C.J., Ip, S.M., Tam, K.W.S., Law, P.Y.T., To, E.M.W., Yu, V.Y.T., Sims, L.D., Tsang, D.N.C., Chu, D.K.W., Perera, R.A.P.M., Poon, L.L.M., Peiris, M., 2020. Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature* 586, 776–778. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2334-5>

Vogels, C.B.F., Breban, M.I., Ott, I.M., Alpert, T., Petrone, M.E., Watkins, A.E., Kalinich, C.C., Earnest, R., Rothman, J.E., de Jesus, J.G., Claro, I.M., Ferreira, G.M., Crispim, M.A.E., Singh, L., Tegally, H., Anyaneji, U.J., Hodcroft, E.B., Mason, C.E., Khullar, G., Metti, J., Dudley, J.T., MacKay, M.J., Nash, M., Wang, J., Liu, C., Hui, P., Murphy, S., Neal, C., Laszlo, E., Landry, M.L., Muyombwe, A., Downing, R., Razeq, J., de Oliveira, T., Faria, N.R., Sabino, E.C., Neher, R.A., Fauver, J.R., Grubaugh, N.D., da Silva Sales, F.C., Ramundo, M.S., Candido, D.S., Silva, C.A.M., de Pinho, M.C., Coletti, T. de M., Andrade, P. dos S., de Souza, L.M., Rocha, E.C., Gomes Jardim, A.C., Manuli, E., Gaburo, N., Granato, C., Levi, J.E., Costa, S., de Souza, W.M., Salum, M.A., Pereira, R., de Souza, A., Matkin, L.E., Nogueria, M.L., Levin, A.S., Mayaud, P., Alexander, N., Souza, R., Acosta, A.L., Prete, C., Quick, J., Brady, O., Messina, J., Kraemer, M., Gouveia, N. da C., Oliva, I., de Souza, M., Lazari, C., Alencar, C.S., Thézé, J., Buss, L., Araujo, L., Cunha, M.S., Loman, N.J., Pybus, O.G., Aguiar, R.S., Wilkinson, E., Msomi, N., Iranzadeh, A., Fonseca, V., Doolabh, D., San, E.J., Mlisana, K., von Gottberg, A., Walaza, S., Allam, M., Ismail, A., Mohale, T., Glass, A.J., Engelbrecht, S., van Zyl, G., Preiser, W., Petruccione, F., Sigal, A., Hardie, D., Marais, G., Hsiao, M., Korsman, S., Davies, M.A., Tyers, L., Mudau, I., York, D., Maslo, C., Goedhals, D., Abrahams, S., Laguda-Akingba, O., Alisoltani-Dehkordi, A., Godzik, A., Wibmer, C.K., Sewell, B.T., Lourenço, J., Kosakovsky Pond, S.L., Weaver, S., Giovanetti, M., Alcantara, L.C.J., Martin, D., Bhiman, J.N., Williamson, C., 2021. Multiplex qPCR discriminates variants of concern to enhance global surveillance of SARS-CoV-2. *PLoS Biol.* 19, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001236>

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G.F., Tan, W., 2020. A Novel

Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733.

<https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>

Figure 1 - The median of owners Ct was lower in the group of dogs with a positive result (13.83) compared to the group of dogs with a negative result (21.57). The Ct value is inversely proportional to the viral load presented in the sample. That is, the lower the Ct, the higher the owner's viral load.

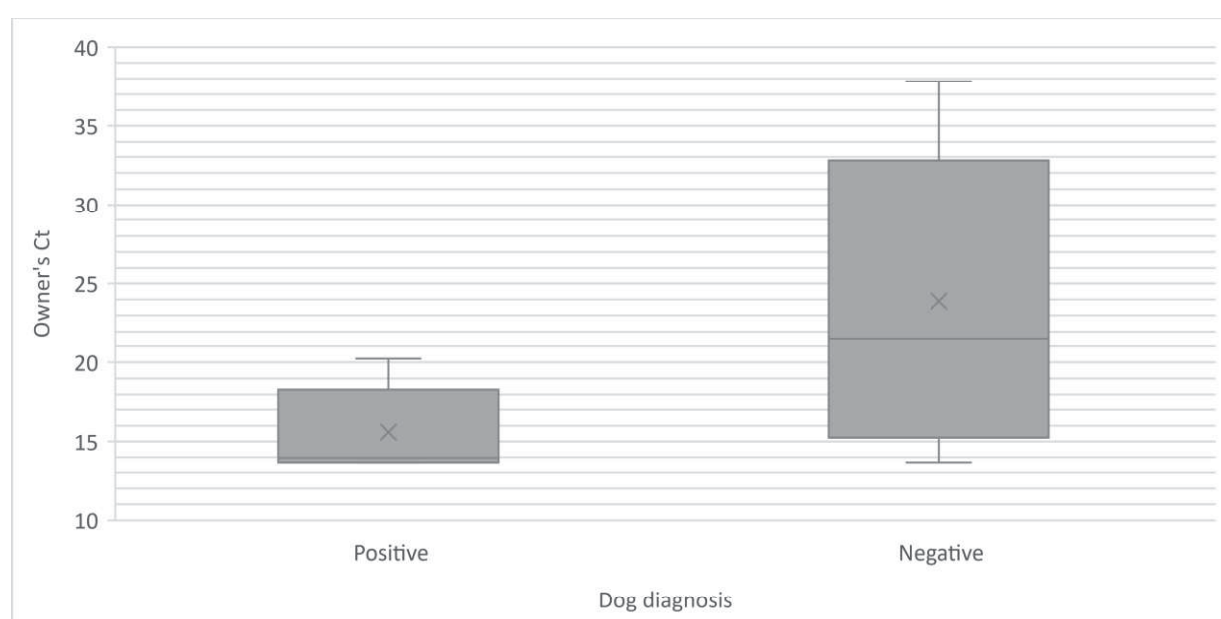


Table 1 - Ct (Cycle threshold) comparisons between owners (O) and dogs (D) in households with positive dogs. Dogs that showed amplification of one or more genes of the SARS-CoV-2 virus underwent new sample collection after 7, 10 and/or 14 days to assess the virus persistence in positive dogs.

			AIIPlex			EuroImmun		
Animal	Day	Intern	Gene E	RdRP	Gene N	Endogenous	SARS-CoV-	
Control								
2								
Household 1	1.O1	1	22.65	>40	35.67	35.32	35.25	
	1.O1	7	32.60	>40	>40	>40	>40	
	1.D1	1	27.45	>40	36.92	29.87	38.71	
	1.D1	7	28.78	>40	>40	29.97	>40	
Household 2	2.O1	1	>40	13.92	14.31	13.69	>40	>40
	2.O2	1	>40	19.61	20.43	18.85	>40	>40
	2.O3	1	30.26	>40	>40	32.78	>40	>40
	2.O4	1	28.36	>40	32.74	30.41	>40	>40
	2.D1	1	26.60	>40	34.17	>40	>40	>40

2.D2	1	28.27	>40	>40	>40	>40	>40
2.D3	1	27.79	>40	>40	>40	>40	>40
2.D4	1	27.42	>40	32.72	32.97	>40	>40
2.D5	1	27.67	>40	>40	>40	>40	>40
2.O1	10	>40	21.64	22.30	21.82	>40	>40
2.O2	10	34.21	24.88	25.81	24.44	>40	>40
2.O3	10	29.94	>40	>40	36.06	>40	>40
2.O4	10	29.98	>40	38.48	31.35	>40	>40
2.D1	10	25.65	>40	>40	>40	>40	>40
2.D4	10	26.35	>40	>40	>40	>40	>40
3.O1	1	>40	14.09	14.39	13.98	>40	>40
3.O2	1	>40	19.88	20.39	19.25	>40	>40
3.D1	1	30.25	>40	>40	36.83	>40	>40
3.D1	7	25.89	>40	33.24	36.40	>40	>40
3.D1	14	28.59	>40	>40	>40	>40	>40

Household

3

4.O1	1	1	39.62	>40	>40	38.63	>40	>40
4.O2	1	1	>40	17.27	18.62	16.39	>40	>40
4.D1	1	1	28.57	>40	>40	35.58	>40	>40
4.D1	7	7	25.84	>40	34.71	37.16	>40	>40
4.D1	14	14	30.10	>40	>40	>40	>40	>40
O= Owner; D= Dog								

Household

4

Supplementary Material

Figure S 1 - Number of positive dogs in the household in relation to the number of positive people in the household.

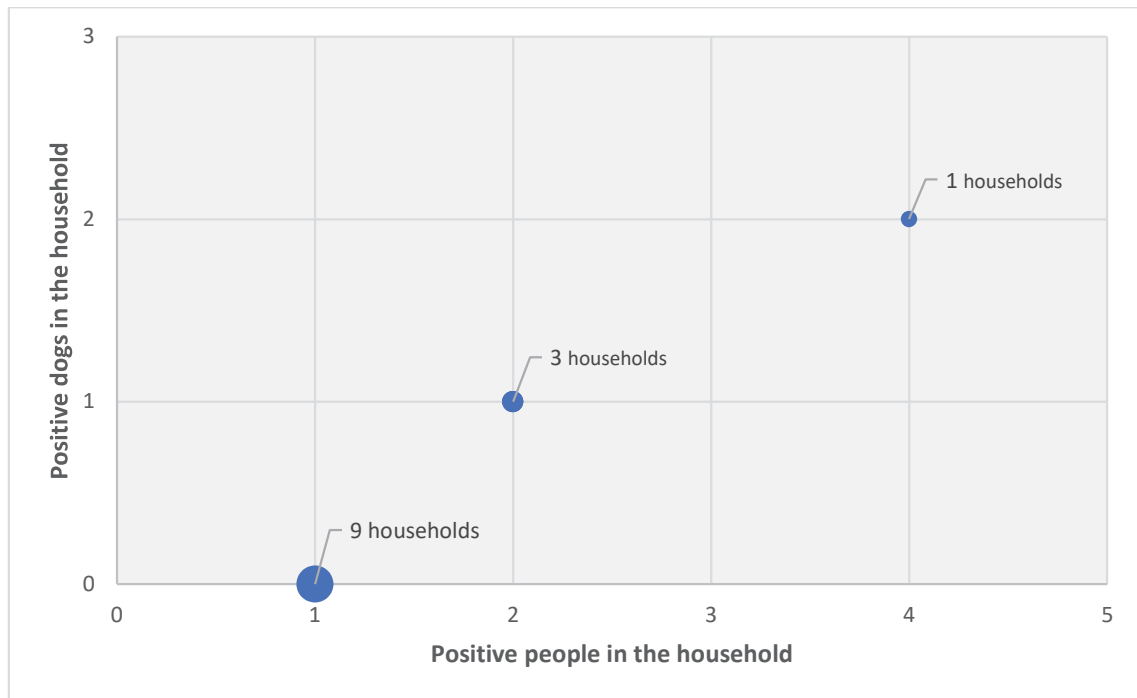


Table S 1 - Result interpretation for SARS-CoV-2 detection using a commercial diagnostic kit (Allplex™ 2019-nCoV, Seegene, Seoul, South Korea).

	Intern Control	E gene	RdRP gene	N gene	2019-nCoV Interpretation	Further Actions
Case 1	+/-	+	+	+	Positive	All target results are valid.
Case 2	+/-	+	-	+	Positive	All target results are valid. Missing
Case 3	+/-	+	+	-		amplification of individual targets may be
Case 4	+/-	-	+	+		due to sample at concentrations near or
Case 5	+/-	-	-	+		below the limit of detection of the test, a
Case 6	+/-	-	+	-	Presumptive positive	mutation in the corresponding target region, or other factors.
Case 7	+/-	+	-	-		All target results are valid. Sarbecovirus RNA may be detected but 2019-nCoV (SARS-CoV-2) specific RNA targets are not detected. Tested should be repeated.
Case 8	+	-	-	-	Negative	All target results are valid. 2019-nCoV (SARSCoV-2) RNA is not detected.
Case 9	-	-	-	-	Invalid	Results were invalid. Tested should be repeated. If the result is still invalid, a new specimen should be obtained.

Table S 2 - Epidemiological Questionnaire – Multicentric Study - Description of the characteristics of the dogs, owners and homes included in the study, according to the result of the RT-PCR test for SARS-CoV-2 in dogs (qualitative variables).

Variable		Dogs				Total (n = 22)	
		Positives (n = 5)		Negatives (n = 17)			
		n	%	n	%	n	%
City of origin	Curitiba	5	100.0	17	100.0	22	100.0
	Other	0	0	0	0	0	0
Home state	Paraná	5	100.0	17	100.0	22	100.0
	Outro	0	0	0	0	0	0
Type of residence	Unique house on the yard	3	60.0	12	70.6	15	68.2
	Residential complex	0	0	2	11.8	2	9.1
	Apartament	2	40.0	3	17.7	5	22.7
Indoor area: full sun enters in every room?	Yes	5	100.0	9	52.9	14	63.6
	No	0	0	8	47.1	8	36.4
Do you have an outdoor area?	No	1	20.0	2	11.8	3	13.6
	Yes. balcony	1	20.0	3	17.6	4	18.2
	Yes. paved yard	0	0	1	5.9	1	4.6
	Yes. semi-paved yard	3	60.0	11	64.7	14	63.6
	Yes. backyard entirely with grass or organic matter	0	0	0	0	0	0.00
Do you have an animal shelter?	No	3	60.0	4	23.5	7	31.8
	Yes	2	40.0	13	76.5	15	68.2
Garbage destination	Public collection	5	100.0	17	100.0	22	100.0
	Other	0	0	0	0	0	0
Water source	Public supply company	5	100.0	17	100.0	22	100.0
	Other	0	0	0	0	0	0
Sewage	Public collection network	5	100.0	17	100.0	22	100.0
	Other	0	0	0	0	0	0
Frequency of cleaning the indoor and outdoor area before quarantine/isolation	Daily	0	0	0	0	0	0.00
	weekly	2	40.0	8	47.1	10	45.4
	From 1 to 3 days	3	60.0	7	41.2	10	45.4
	From 3 to 5 days	0	0	2	11.8	2	9.1
Adopted new dog after diagnosis of COVID-19?	No	5	100.0	17	100.0	22	100.0
	Yes	0	0	0		0	0

Where does the dog spend most of its time?	Untied in the yard	0	0	6	35.3	6	27.3
	Untied inside the house	3	60.0	4	23.5	7	31.8
	Released equally in the yard and indoors	2	40.0	7	41.2	9	40.9
	Tied in kennel/cattery/cage	0	0	0	0	0	0
	Tied in the yard	0	0	0	0	0	0
	In the street	0	0	0	0	0	0
Does the dog usually go out alone?	No	5	100.0	15	88.2	20	90.9
	Yes	0	0	1	5.9	1	4.6
	No information	0	0	1	5.9	1	4.6
Where does the dog sleep?	In the backyard	0	0	5	29.4	5	22.7
	Inside home	5	100.0	9	52.9	14	63.6
	Equally backyard and indoors	0	0	2	11.8	2	9.1
	In kennel/cattery/cage	0	0	1	5.9	1	4.6
Does the dog have access to a table. bed. sofa. armchair?	Yes	4	80.0	11	64.7	15	68.2
	No	1	20.0	6	35.3	7	31.8
Do you have the habit of smoothing the dog. caressing or kissing?	Yes	5	100.0	17	100.0	22	100.0
	No	0	0	0	0	0	0
After contact with the dog. do you usually wash your hands?	Yes	1	20.0	10	58.8	11	50.0
	No	4	80.0	7	41.2	11	50.0
Do people sleep with the dog?	Yes	3	60.0	8	47.1	11	50.0
	No	2	40.0	9	52.9	11	50.0
Did you notice any signs of a cold. cough or diarrhea in the dog?	Yes	4	80.0	4	23.5	8	36.4
	No	1	20.0	13	76.5	14	63.6
Do you usually take it to the bath and tosa?	Yes	3	60.0	8	47.1	11	50.0
	No	2	40.0	9	52.9	11	50.0
Do you usually take the dog for walks with a leash and a guide?	Yes	2	40.0	9	52.9	11	50.0
	No	3	60.0	8	47.1	11	50.0
Do you take it to the vet?	Yes. only when you have symptoms	2	40.0	1	5.9	3	13.6
	Yes. when you have symptoms or for vaccination	2	40.0	10	58.8	12	54.6
	No	1	20.0	6	35.3	7	31.8
Owner's sex	Male	2	40.0	2	11.76	4	18.18
	Female	3	60.0	15	88.24	18	81.82

Owner's age	18 to 25	3	60.0	9	52.94	12	54.55
	26 to 35	2	40.0	5	29.41	7	31.82
	36 to 45	0	0	2	11.76	2	9.09
	46 to 60	0	0	1	5.88	1	4.55
	61 or more	0	0	0	0.00	0	0.00
Maximum education	No access to school	0	0	0	0	0	0
	Elementary School	0	0	0	0	0	0
	High school	1	20.0	4	23.5	5	22.7
	University education	1	20.0	9	52.9	10	45.4
	Postgraduate studies	1	20.0	1	5.9	2	9.1
	No information	2	40.0	3	17.6	5	22.7
Have you had contact with cases of covid-19 outside the home?	Do not know	3	60.0	10	58.8	13	59.1
	Yes	2	40.0	7	41.2	9	40.9
	No	0	0	0	0	0	0
Did you quarantine before diagnosis?	Yes	4	80.0	11	64.7	15	68.2
	No	1	20.0	6	35.3	7	31.8
Do you have travel history prior to your COVID-19 diagnosis?	Yes	0	0	4	23.5	4	18.2
	No	5	100.0	13	76.5	18	81.8
Do you have a preexisting history of other health conditions?	No	2	40.0	8	47.1	10	45.4
	Yes. one (asthma or obesity)	0	0	6	35.3	6	27.3
	Yes. two (asthma or bronchitis and obesity)	1	20.0	0	0.00	1	4.6
	No information	2	40.0	3	17.6	5	22.7
Did you have symptoms?	Yes	5	100.0	16	94.1	21	95.4
	No	0	0	1	5.9	1	4.6
Outcome	isolation at home	5	100.0	17	100.0	22	100.0
	outpatient admission	0	0	0	0	0	0
	ICU admission	0	0	0	0	0	0
	Death	0	0	0	0	0	0
Owner isolation time	7 days	1	20.0	3	17.6	4	18.2
	10 days	0	0.0	6	35.3	6	27.3
	14 days	4	80.0	8	47.1	12	54.6

Table S 3 - Description of the characteristics of the dogs, owners and homes included in the study, according to the result of the RT-PCR test for SARS-CoV-2 in dogs (quantitative variables).

Variable	Positives (n = 5)					Negatives (n = 17)				
	Average	SD	Median	Minimum	Maximum	Average	SD	Median	Minimum	Maximum
Indoor area: number of rooms	8.60	2.61	9	5	11	7.29	2.95	6	2	12
Indoor area: number of bathrooms	2.20	0.84	2	1	3	2.24	1.09	2	1	5
Dogs at home	4.20	4.38	1	1	9	2.76	3.01	2	1	9
Dog Age	3.34	2.38	3	1	7	4.35	3.22	3	1	11
People residing in the same house	2.80	1.10	2	2	4	2.82	0.88	3	2	4
Confirmed cases of COVID-19 at household	2.80	1.10	2	2	4	1.53	1.18	1	1	4
Lower Ct of Owner	14.44	1.31	13.83	13.69	16.39	23.89	9.38	21.57	13.69	37.83

Table S 4 - Ct values of RT-qPCR SARS-Cov-2 detection, using a commercial kit (Allplex™ 2019-nCoV, Seegene, Seoul, South Korea), for all households.

		AllPlex			
		Endogenous	Gene E	RdRP	Gene N
Household 001	1.O1	22.65	>40	>40	35.67
	1.D1	27.45	>40	>40	36.92
	2.O1	>40	13.92	14.31	13.69
	2.O2	>40	19.61	20.43	18.85
	2.O3	30.26	>40	>40	32.78
	2.O4	28.36	>40	32.74	30.41
Household 002	2.D1	26.60	>40	34.17	>40
	2.D2	28.27	>40	>40	>40
	2.D3	27.79	>40	>40	>40
	2.D4	27.42	>40	32.72	32.97
	2.D5	27.67	>40	>40	>40
Household 003	3.O1	>40	14.09	14.39	13.98
	3.O2	>40	19.88	20.39	19.25
	3.D1	30.25	>40	>40	36.83
Household 004	4.O1	39.62	>40	>40	38.63
	4.O2	>40	17.27	18.62	16.39
	4.D1	28.57	>40	>40	35.58
Household 5	5.O1	24.78	31.79	29.28	38.05
	5.D1	28.98	>40	>40	>40
Household 6	5.D2	34.28	>40	>40	>40
	6.O1	28.76	>40	>40	>40
	6.D1	>40	>40	>40	>40
Household 7	7.O1	29.38	>40	>40	>40
	7.D1	32.24	>40	>40	>40
	7.D2	35.60	>40	>40	>40
Household 8	8.O1	37.78	>40	>40	>40
	8.D1	32.63	>40	>40	>40
Household 9	9.O1	>40	16.48	17,30	22,46
	9.O2	25.39	>40	>40	>40

	9.D1	25.54	>40	>40	>40
	9.D2	25.21	>40	>40	>40
	10.O1	>40	15.25	15.97	21.54
	10.O2	26.28	>40	>40	>40
Household 10	10.D1	25.70	>40	>40	>40
	10.D2	27.61	>40	>40	>40
	10.D3	27.87	>40	>40	>40
Household 11	11.O1	>40	21.57	22.62	28.13
	11.D1	27.89	>40	>40	>40
Household 12	12.O1	30.41	>40	>40	>40
	12.D1	28.61	>40	>40	>40
Household 13	13.O1	31.01	>40	36.58	35.14
	13.D1	27.82	>40	>40	>40

Table S 5 - CT Values of probe-based genotyping system to detect VOCs (Variants of Concern), using a dropout scheme for Spike $\Delta 69-70$ and Orf1a $\Delta 3675-3677$ deletions.

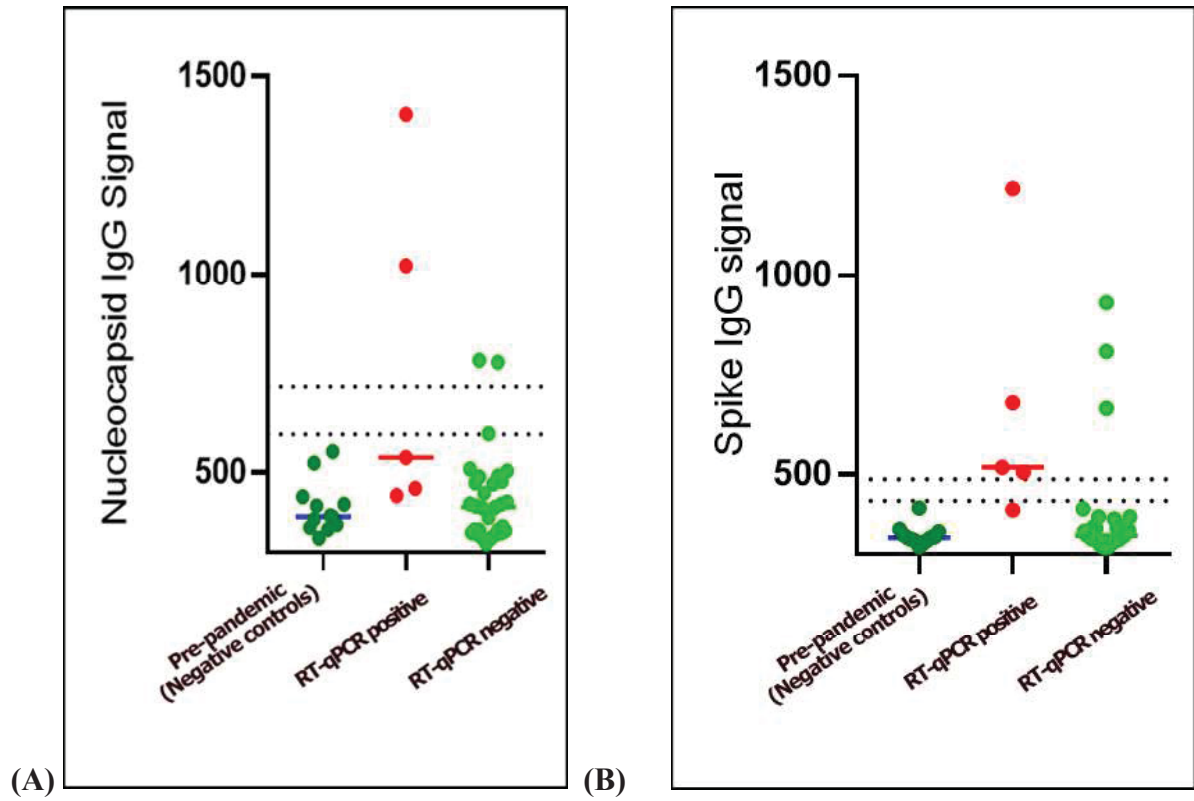
	Genotype Protocol Yale_Vogels			Genotype
	Ct N1	Ct del69-70	Ct orf1a-del	
2.H1	10.72	14.21	13.45	Wild
2.H2	18.95	21.93	21.18	Wild
2.H3	28.82	>40	>40	Invalid
2.H4	28.58	>40	>40	Invalid
3.H1	12.81	15.82	14.41	Wild
3.H2	20.25	23.44	21.50	Wild
3.D1	29.79	>40	>40	Invalid
4.H1	29.66	>40	>40	Invalid
4.H2	16.74	19.97	18.68	Wild
4.D1	29.39	>40	>40	Invalid

Table S 6 - Absorbance value obtained in the serological assay based on magnetic beads. Dog blood samples obtained before the pandemic were used as a negative control. The cut-off was established through calculation (Mean of pre pandemic samples + 3x Standard Deviation). Cut-off N protein = 596; Cut-off Protein Spike = 434; PP = Pre pandemic sample.

	N-protein		S-Protein	
	Day 0	Day 7	Day 0	Day 7
PP1	439	-	334	-
PP2	388	-	338	-
PP3	391	-	342	-
PP4	369	-	319	-
PP5	357	-	357	-
PP6	335	-	327	-
PP7	362	-	342	-
PP8	524	-	344	-
PP9	553	-	349	-
PP10	382	-	335	-
PP11	416	-	363	-
PP12	420	-	416	-
PP13	474	-	369	-
PP14	415	-	389	-
PP15	421	-	394	-
1.D1	442	777	518	808
2.D1	1404	782	1217	932
2.D3	364	448	330	340
2.D4	460	348	332	506
2.D5	359	-	333	-
3.D1	538	598	411	414
4.D1	420	1023	349	680
5.D1	478	-	394	-
5.D2	412	411	317	347
6.D2	504	509	358	346
7.D1	338	356	323	318
8.D2	471	-	365	-
8.D3	345	-	666	-
9.D1	387	-	358	-
9.D2	426	-	338	-
10.D1	349	-	320	-
11.D1	491	489	367	371

- dogs not resampled due to refusal / unavailable owner.

Figure S 2 - Analysis of the distribution of asorbance values obtained in the ELISA assay based on magnetic beads in the different groups - (A) Absorbance signal for IgG anti-N; (B) Absorbance signal for anti-Spike IgG.



4 DISCUSSÃO

Animais de companhia, por conviverem de maneira mais próxima dos humanos, são mais expostos ao SARS-CoV-2. O primeiro caso de transmissão de SARS-CoV-2 de humano para cão foi descrito após 15 cães de domicílios com casos confirmados de COVID-19 foram colocados em quarentena e testados em Hong Kong de fevereiro de 2020 a março de 2020. Um spitz alemão macho de 17 anos e um pastor alemão macho de 2,5 anos de idade foram testados positivos para SARS-CoV-2. Ambos os animais não apresentaram sinais clínicos específicos. A análise do genoma viral demonstrou que as sequências genéticas dos vírus encontrados nos cães eram idênticas ao vírus detectado nos respectivos tutores (SIT et al., 2020). Estudos anteriores mostraram que infecções em animais de companhia apresentam um padrão assintomático ou auto-resolutivo (CARPENTER et al., 2021; HAMER et al., 2020).

Este trabalho identificou os cinco primeiros relatos de infecção natural por SARS-COV-2 em cães do Brasil. Os casos foram imediatamente notificados ao Ministério da Agricultura do Brasil e à Organização Mundial de Saúde Animal. Foi observado risco associado ao contato mais próximo com os tutores e altas cargas virais dos tutores. Ainda, a maior taxa de positivos entre cães com sinais clínicos corrobora os achados em outros estudos, que mostram que os cães são menos susceptíveis ao SARS-CoV-2 e, portanto, eliminam o vírus mais rapidamente que outras espécies (como gatos e furões) (SHI et al., 2020). Outro fator que pode influenciar os resultados é o intervalo entre o início da infecção dos tutores e a coleta de amostras dos animais.

Embora cães possam ser infectados com SARS-CoV-2, não há evidências de que esses animais estejam envolvidos na transmissão deste vírus (MEDKOUR et al., 2021). Em contrapartida, em gatos domésticos foi observada a transmissão gato-gato, o que pode ser explicado pela susceptibilidade da espécie (HALFMANN et al., 2020; SHI et al., 2020).

Em qualquer hospedeiro, o desenvolvimento da infecção depende da interação da proteína S com a enzima conversora de angiotensina-2 (ECA-2), que permite a endocitose viral (LAN et al., 2020; LI et al., 2003; LUAN et al., 2020). Essa interação é um ponto crítico para a replicação viral no hospedeiro. Tendo em vista que a afinidade de cECA2 para o RBD é 6,65 vezes menor do que a de hECA2 (ZHANG et

al., 2021), associado ao fato de cães apresentarem pouca expressão de ECA-2 nas vias respiratórias (SHI et al., 2020; ZHAI et al., 2020). Essas particularidades podem justificar as baixas cargas virais encontradas nos cinco animais positivos deste estudo e demonstra a dificuldade de coletar as amostras de cães na curta janela diagnóstica entre infecção e eliminação do vírus. Ainda, devido às baixas cargas virais encontradas nos cães positivos, não foi possível realizar a genotipagem das amostras de cães.

A correlação entre o número de pessoas infectadas na residência e a transmissão do vírus já foi descrita entre humanos (MADEWELL et al., 2020) e esse comportamento pode ser observado também na transmissão humano-cão, principalmente onde há contato próximo com o cão (BARRS et al., 2020). Além disso, o compartilhamento de alimentos entre tutores infectados e animais de companhia pode estar associado à infecção por SARS-CoV-2 (ALBERTO-ORLANDO et al., 2022). Neste estudo observamos também que a carga viral do tutor pode ser um fator de risco associado à transmissão do vírus aos cães.

A resposta de anticorpos ao SARS-CoV-2 se mostra altamente variável em humanos (GRZELAK et al., 2020), e em cães também ainda não foi estabelecido o critério para definir testes soropositivos. Na detecção de anticorpos realizada neste estudo, os anticorpos secundários utilizados foram anti-IgG de cão direcionados para a molécula inteira. Devido à essa característica pode ter ocorrido reações inespecíficas com IgM, tendo em vista as regiões conservadas na estrutura dos anticorpos de diferentes classes. A reação com IgM justifica os cães que demonstraram maior absorbância no teste realizado no dia zero quando comparado a sete dias depois. Nesse estudo os cães positivos na RT-qPCR apresentaram maior absorbância para pelo menos uma proteína viral no ensaio de detecção de anticorpos. Porém, foi possível observar alta fluorescência também em cães negativos na RT-qPCR. Esses dados corroboram a dificuldade da coleta de amostras dentro da janela diagnóstica, tendo em vista que os cães eliminam rapidamente o vírus.

5 CONCLUSÃO

Uma limitação importante deste estudo foi o número de amostras. Porém, apesar disso, foi possível associar estatisticamente a detecção molecular de SARS-CoV-2 em amostras de cães à presença de sinais clínicos, número de pessoas positivas na residência e a carga viral do tutor (estimada pelo valor de Ct). Esses dados obtidos trazem um alerta sobre a transmissão humano-cão, especialmente em interações próximas. Portanto, recomenda-se que pessoas infectadas com COVID-19 adotem medidas de prevenção semelhantes às utilizadas para evitar a transmissão humano-humano, principalmente em residências com mais de uma pessoa infectada e/ou quando há contato próximo com os cães.

Como observado neste estudo, a interface da saúde humana, animal e ambiental exigem uma abordagem de Saúde Única para entender melhor as características da epidemiologia do SARS-CoV-2 e assim criar medidas de prevenção e controle da transmissão. Através desse entendimento, outras pesquisas multidisciplinares podem prevenir futuras pandemias, uma vez que humanos e animais compartilham o mesmo ambiente.

6 REFERÊNCIAS

ABDEL-MONEIM, A. S.; ABDELWHAB, E. M. Evidence for SARS-CoV-2 infection of animal hosts. **Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 1–27, 2020.

ALBERTO-ORLANDO, S. et al. SARS-CoV-2 transmission from infected owner to household dogs and cats is associated with food sharing. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 122, n. January, p. 295–299, set. 2022.

ANDERSEN, K. G. et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nat. Med.**, v. 26, n. April, p. 450–452, 2020.

BARRS, V. R. et al. SARS-CoV-2 in Quarantined Domestic Cats from COVID-19 Households or Close Contacts, Hong Kong, China. v. 26, n. 12, p. 3071–3074, 2020.

BIENZLE, D. et al. Risk Factors for SARS-CoV-2 Infection and Illness in Cats and Dogs1. **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 6, 2022.

BOSCO-LAUTH, A. M. et al. Experimental infection of domestic dogs and cats with SARS-CoV-2: Pathogenesis, transmission, and response to reexposure in cats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 42, p. 26382 LP – 26388, out. 2020.

CARPENTER, A. et al. **Determining the Role of Natural SARS-CoV-2 Infection in the Death of Ten Domestic Pets** Research Square, , 2021. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/PPR/PPR313634>>

CDC, C. FOR D. C. AND P. **Evaluation for SARS-CoV-2 Testing in Animals | CDC**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/animals/animal-testing.html>>. Acesso em: 15 ago. 2021.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, 2019.

DE 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, n. October, p. 1–10, 2020.

EPSTEIN, J. H. et al. Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 676–679, 2005.

ERLES, K. et al. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. **Virology**, v. 310, n. 2, p. 216–223, 2003.

ERLES, K.; SHIU, K. B.; BROWNLIE, J. Isolation and sequence analysis of canine respiratory coronavirus. **Virus Research**, v. 124, n. 1–2, p. 78–87, 2007.

FERASIN, L. et al. Infection with SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 detected in a group of dogs and cats with suspected myocarditis. **Veterinary Record**, v. 189, n. 9, p. no, 2021.

GORBALENYA, A. E. et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 2020.

GRZELAK, L. et al. A comparison of four serological assays for detecting anti–SARS-CoV-2 antibodies in human serum samples from different populations. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 559, p. 1–13, 2020.

HALFMANN, P. J. et al. Transmission of SARS-CoV-2 in Domestic Cats. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 6, p. 592–594, 6 ago. 2020.

HAMER, S. A. et al. Natural SARS-CoV-2 infections, including virus isolation, among serially tested cats and dogs in households with confirmed human COVID-19 cases in Texas, USA. **bioRxiv : the preprint server for biology**, p. 2020.12.08.416339, 8 dez. 2020.

KIN, N. et al. Genomic analysis of 15 human coronaviruses OC43 (HCoV-OC43s) circulating in France from 2001 to 2013 reveals a high intra-specific diversity with new recombinant genotypes. **Viruses**, v. 7, n. 5, p. 2358–2377, 2015.

LAN, J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**, v. 581, n. May, 2020.

LI, F. et al. Structural biology: Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. **Science**, v. 309, n. 5742, p. 1864–1868, 2005.

LI, W. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. v. 426, n. NOVEMBER, 2003.

LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus:

implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 2020.

LUAN, J. et al. Spike protein recognition of mammalian ACE2 predicts the host range and an optimized ACE2 for SARS-CoV-2 infection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 526, n. 1, p. 165–169, maio 2020.

MADEWELL, Z. J. et al. Household Transmission of SARS-CoV-2 A Systematic Review and Meta-analysis + Supplemental content. **JAMA Network Open**, v. 3, n. 12, p. 2031756, 2020.

MASTERS, P. S. The Molecular Biology of Coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 66, p. 193, 2006.

MEDKOUR, H. et al. First evidence of human-to-dog transmission of SARS-CoV-2 B.1.160 variant in France. **Transboundary and Emerging Diseases**, n. July, p. 1–8, 2021.

MITCHELL, J. A. et al. Tropism and pathological findings associated with canine respiratory coronavirus (CRCoV). **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2–4, p. 582–594, mar. 2013.

MOLENAAR, R. J. et al. **Clinical and Pathological Findings in SARS-CoV-2 Disease Outbreaks in Farmed Mink (Neovison vison)** *Veterinary Pathology*, 2020.

OIE-WAHIS. **SARS-CoV-2 in animals (Inf. with), Hong Kong: Follow-up report 2**. Disponível em: <<https://wahis.oie.int/#/report-info?reportId=14657>>. Acesso em: 15 ago. 2021.

OIE, W. O. FOR A. H. **COVID-19 - Events in animals**. Disponível em: <<https://www.oie.int/en/what-we-offer/emergency-and-resilience/covid-19/#ui-id-3>>. Acesso em: 11 ago. 2021.

OUDE MUNNINK, B. B. et al. Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans. **Science**, v. 177, n. January, p. eabe5901, 2020.

PEIRIS, J. et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory

syndrome. **The Lancet**, v. 361, n. 9366, p. 1319–1325, abr. 2003.

PRIESTNALL, S. L. et al. New and Emerging Pathogens in Canine Infectious Respiratory Disease. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 492–504, 2014.

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

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

STEVANOVIC, V. et al. The emergence of sars-cov-2 within the dog population in croatia: Host factors and clinical outcome. **Viruses**, v. 13, n. 8, 2021.

SU, S. et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 490–502, 2016.

TENNANT, B. J. et al. Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. **Research in Veterinary Science**, v. 51, n. 1, p. 11–18, jul. 1991.

WALLS, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281–292.e6, 2020.

WENTWORTH, D. E.; HOLMES, K. V. Molecular Determinants of Species Specificity in the Coronavirus Receptor Aminopeptidase N (CD13): Influence of N-Linked Glycosylation. v. 75, n. 20, p. 9741–9752, 2001.

WOLFE, N. D.; DUNAVAN, C. P.; DIAMOND, J. Origins of major human infectious diseases. **Nature**, v. 447, n. 7142, p. 279–283, 2007.

WU, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 2020a.

WU, L. et al. Broad host range of SARS-CoV-2 and the molecular basis for SARS-CoV-2 binding to cat ACE2. **Cell Discovery**, v. 6, n. 1, 2020b.

ZHAI, X. et al. Comparison of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Spike Protein Binding to ACE2 Receptors from Human, Pets, Farm Animals, and Putative Intermediate Hosts. **Journal of Virology**, v. 94, n. 15, p. 1–16, 16 jul. 2020.

ZHANG, T.; WU, Q.; ZHANG, Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2

Associated with the COVID-19 Outbreak. **Current Biology**, v. 30, n. 7, p. 1346-1351.e2, 2020.

ZHANG, Z. et al. The molecular basis for SARS-CoV-2 binding to dog ACE2. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2021.

ZHAO, S. et al. Serologic screening of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection in cats and dogs during first coronavirus disease wave, the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 1362–1370, 2021.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020.

ZHU, N. et al. **A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019** *New England Journal of Medicine*, 2020.

ANEXO A – QUESTIONÁRIO DE TELEVIGILÂNCIA PetCOVID-19 STUDY

Iniciais do nome do

tutor: _____

Endereço de e-

mail: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Endereço

completo: _____

Telefone com DDD: (____) _____ - _____

1.1. Tipo de residência:

() Casa única no terreno () Casa em terreno compartilhado

() Apartamento () Outro: _____

1.2. Área interna

1.2.1. Número de cômodos: _____

1.2.2. Número de banheiros: _____

1.2.3. Sol entra plenamente em todos os cômodos? () Sim () Não

1.3. Possui área externa? () Sim () Não

1.3.1. SE SIM, tipo de área externa:

1.3.2. Sol entra plenamente na área?

1.4. Possui abrigo para animais? () Sim () Não

1.4.1. SE SIM, tipo de abrigo:

1.5. Destinação do

lixo: _____

1.6. Origem da

Água: _____

1.7. Destinação do

Esgoto: _____

1.8. Frequência de limpeza da área interna e externa antes de quarentena / isolamento (intervalo de dias):

1.8.1. Como realizava? (descrever produtos e técnica):

1.9. Frequência de limpeza da área interna depois de quarentena / isolamento intervalo de dias):

1.9.1. Como realiza? (descrever produtos e técnica): _____

2. Sobre os animais:

2.1. Número de cães na residência: _____

2.2. Número de gatos na residência: _____

2.3. Número de outros animais na residência: _____

2.4. Idade dos Animais (responder para cada animal):

2.5. Adotou novos animais após diagnóstico de COVID-19?: () Sim () Não

2.5.1. SE SIM, de onde os adotou? _____

2.6. Onde o animal passa a maior parte do tempo? () Solto dentro de casa

() Preso dentro de casa () Solto no quintal () Preso no quintal

() Solto igualmente entre quintal e dentro de casa

2.6.1. CASO PRESO NO QUINTAL, de que forma fica preso? _____

2.7. Existem barreiras físicas na casa (telas nas janelas, muros) para impedir que o animal vá para a rua sozinho? () Sim () Não

2.7.1. SE NÃO HOUVER BARREIRAS, Costuma ir sozinho para a rua?

() Sim () Não

2.8. Onde o animal
dorme? _____

2.9. O animal tem acesso a mesa, cama, sofá, poltrona? () Sim () Não

2.10. Tem o hábito de alisar o animal, acariciar ou beijar? () Sim () Não

2.11. Após o contato com o animal, costuma lavar as mãos? () Sim () Não

2.12. Os tutores dormem com o animal? () Sim () Não

2.13. Percebeu algum sinal de resfriado, tosse ou diarreia no animal?

() Sim () Não

2.13.1. SE SIM, Quando?

2.13.2. Por quanto tempo (dias)?

2.13.3. Levou ao veterinário? () Sim () Não

2.13.4. Qual foi o diagnóstico ou conduta?

2.14. Costuma levar ao banho e tosa? () Sim () Não

2.14.1. SE SIM, qual a frequência?

2.14.2. SE SIM, como? () Transporte próprio () Transporte do banho e tosa

() Outro: _____

2.15. Costuma levar o animal para passeios com coleira e guia?

() Sim () Não

2.15.1. SE SIM, quanto tempo, em média, duram os passeios (em minutos):

2.15.2. SE PASSEIA, outras pessoas alisam ou acariciam o animal durante o passeio na rua? () Sim () Não

2.15.3. SE PASSEIA, o animal tem contato com outros animais na rua, durante os passeios?() Sim () Não

2.15.4. SE PASSEIA, quando retorna do passeio, lava as patas do animal ou utiliza algum produto antes de entrar em casa? () Sim () Não

2.16. Costuma levar ao veterinário? () Sim () Não

2.16.1. Se sim, com que frequência?_____

3. Sobre as pessoas:

3.1. Quantas pessoas residem na mesma casa?

3.2. Qual a renda média da família?

3.3. Quantos casos confirmados de COVID-19 na residência?

3.4. Está doente no momento da entrevista? () Sim () Não

3.5. Sexo:

3.6. Idade:

3.7.

Ocupação:_____

3.8. Escolaridade máxima:

3.9. Data do diagnóstico: ____/____/____

3.10. Estado civil: _____

3.11. Teve contato com casos de COVID-19 fora de casa? () Sim () Não

3.11.1. SE SIM, contato com:

3.12. Fez quarentena antes do diagnóstico? () Sim () Não

3.13. Tem histórico de viagem antes do diagnóstico de COVID-19?

() Sim () Não

3.13.1. Se sim, para onde?

3.13.2. Quando (data de chegada no destino)? ____/____/____

3.13.3. Permaneceu por quanto tempo (dias)? _____

3.14. Tem histórico de preexistente de outras condições de saúde?

() Não () Sim / Quais: _____

3.15. Apresentou sintomas? () Sim () Não

3.15.1. SE SIM, considera os sintomas leves, moderados ou graves?

3.16. Desfecho: _____

3.16.1. Tempo isolamento em casa (dias):

3.16.2. Internação ambulatorial (dias):

3.16.3. Internação em UTI (dias):

3.16.4. Óbito (data):

ANEXO B – CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA DE USO ANIMAL



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "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 zoonotrófica no Brasil", protocolada sob o CEUA nº 4879280420 (in house), sob a responsabilidade de **Daniel Friguglietti Brandespin** e equipe; David Soeiro Barbosa; Luiz Eduardo Ristow; Alexander Welker Blondo; Juliana Arena Galhardo; Klayzi Christina Pettan-Brewer - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/URPE) na reunião de 10/06/2020.

We certify that the proposal "Multicentric study for the surveillance of SARS-CoV-2 in companion animals through the One Health approach (PetCOVID-19 Study): prospective cohort of domiciled mammals to assess the risk of the zoonanthroposis in Brazil", utilizing 90 Dogs (males and females), 20 Hamsters (males and females), 90 Cats (males and females), protocol number CEUA 4879280420 (in house), under the responsibility of **Daniel Friguglietti Brandespin** and team; David Soeiro Barbosa; Luiz Eduardo Ristow; Alexander Welker Blondo; Juliana Arena Galhardo; Klayzi Christina Pettan-Brewer - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Rural Federal University of Pernambuco (CEUA/URPE) in the meeting of 06/10/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 07/2020 a 07/2022

Área: Medicina Veterinária

Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Cães	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 10 anos	N:	90
Linhagem:	todas as raças			Peso:	1 a 100 kg		
Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Hamsters	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 10 anos	N:	20
Linhagem:	Todas as raças			Peso:	500 a 2000 g		
Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Gatos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 10 anos	N:	90
Linhagem:	todas as raças			Peso:	1 a 20 kg		

Local do experimento: A coleta das amostras serão realizadas no domicílio dos proprietários que aceitarem participar da pesquisa

Recife, 10 de junho de 2020

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite de Souza
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Carlos Fernando Rodrigues Guaraná
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco