

Detección de anticuerpos del SARS-CoV-2 en perros en contacto con humanos positivos COVID-19

Detection of SARS-CoV-2 antibodies in dogs in contact with COVID-19 positive humans

Roberto Danilo Chiliquinga-Quinchiguano*^{ID}, Nathalie Campos-Murillo^{ID} y Edy Castillo-Hidalgo^{ID}

Universidad Católica de Cuenca. Cuenca, Azuay, Ecuador.
Correo electrónico: roberto.chiliquinga.80@est.ucacue.edu.ec

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de anticuerpos IgG e IgM para el SARS-CoV-2 en mascotas que tuvieron contacto con humanos positivos a COVID-19 de la parroquia de Alangasí, perteneciente a la ciudad de Quito, Ecuador, durante el primer semestre 2022. Para ello se estudiaron 40 perros de distintas edades y sexo, que llegaron a consulta al centro veterinario RoChi-Vet, a los cuales se les realizó la respectiva historia clínica. Para el estudio de las Inmunoglobulinas y otros analitos hepáticos (TGP y TGO) se obtuvieron muestras sanguíneas mediante punción de la vena cefálica y llevadas en tubos con EDTA, las cuales fueron enviadas a laboratorios SERVILAB para determinar la presencia de Inmunoglobulinas (Ig), mediante el método de inmunofluorescencia, adicionalmente se determinó la integridad del hígado a través de un espectrofotómetro. Los datos obtenidos de Ig, TGP y TGO fueron cotejados con la historia clínica del paciente, y se analizó mediante estadística descriptiva, ji-cuadrado y correlación, los posibles efectos entre las variables estudiadas, mediante el paquete estadístico SAS. Los resultados obtenidos arrojaron que, de los valores de anticuerpos IgG e IgM, al menos 2 de los sueros dieron positivos para SARS-CoV-2, para una prevalencia en este estudio de 5 %; y adicionalmente los valores de TGP y TGO no fueron indicativo de alguna patología para la integridad del hígado, aunque se encontró 1 individuo con un valor ligeramente alto TGP y 4 con valores ligeramente inferiores a los normales para la misma transaminasa. El ANAVA indicó la ausencia de efecto ($P>0,05$) de la edad ni el sexo sobre la probabilidad de padecer o no el SARS-CoV-2; al igual de la no existencia de correlación entre los valores de Ig y las transaminasas evaluadas. Para finalizar se puede indicar, que a pesar de que se cuenta con herramientas sensibles para el diagnóstico del SARS-CoV-2 en perros, no hay evidencia que exista la probabilidad de transmisión y contagio desde el ser humano (propietario) a sus mascotas, y mucho menos de manera de contagio zoonótico inverso.

Palabras clave: SARS-CoV-2; inmunoglobulinas; IgG; IgM; caninos

ABSTRACT

The objective of this study was to detect the presence of IgG and IgM antibodies for SARS-CoV-2 in pets that had contact with COVID-19 positive humans from the Parish of Alangasí belonging to the City of Quito, Ecuador, during the first half of 2022. To do this, 40 canine patients of different ages and sex were studied, who came to medical appointments at the RoChi-Vet veterinary center, to which the respective clinical history was made. For the study of Immunoglobulins and other liver analytes (TGP and TGO), blood samples were obtained by puncture of the cephalic vein, in tubes with EDTA content, which were sent to SERVILAB laboratories to determine the presence of Immunoglobulins (Ig), using the immunofluorescence method, in addition to determining the integrity of the liver through a spectrophotometer. The data obtained from Ig, TGP and TGO were compared with the patient's clinical history, and the possible effects between the variables studied using SAS statistical package, it was analyzed using descriptive statistics, Chi-square and correlations. The results obtained showed that for the values of IgG and IgM antibodies, at least 2 of the serums tested positive for SARS-CoV-2, with a prevalence in this study of 5%; and additionally, the values of TGP and TGO were not indicative of any pathology in the liver's integrity, although one individual was found with a slightly high TGP value and four with values slightly lower than normal for the same transaminase. The ANAVA indicated the absence of effect ($P>0.05$) of age or sex on the probability of suffering or not from SARS-CoV-2; as well as the non-existence of correlation between the values of Ig and the transaminases evaluated. Finally, it can be indicated that although it is a sensitive tool for the diagnosis of SARS-CoV-2 in dogs; there is no evidence that there is a probability of transmission and contagion from the human being (owner) to their pets and much less in the form of reverse zoonotic contagion.

Key words: SARS-CoV-2; immunoglobulins; IgG; IgM; canines

INTRODUCCION

El síndrome respiratorio agudo severo Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) o también llamado COVID-19, es una enfermedad producida por un beta corona virus con envoltura, no segmentado, de polaridad positiva y cadena simple de Ácido Ribonucleico (ARN). La fuente primaria más probable del SARS-CoV-2 es de origen animal, es decir, tiene un origen zoonótico; estudios genómicos indican que su genoma tiene 96 % de homología con un beta coronavirus descrito en murciélagos (*Rhinolophus affinis*) y 91 % en pangolines (*Manis*) [14, 17, 20].

Desde el año 2019, el COVID-19 se reportó como pandemia, y en el caso particular del Ecuador, el primer caso reportado fue en febrero del 2020 y desde entonces se mantuvo como el país en Suramérica con el mayor número de contagios confirmados por esta enfermedad [8, 25].

El origen de SARS-CoV-2 como su ruta de introducción en los seres humanos aún no se esclarece, sin embargo, investigaciones sugieren que su procedencia proviene de un virus aislado de los murciélagos *Rhinolophus* [21, 23], que desde su aparición hasta la fecha ha provocado severas complicaciones en la Salud Pública a escala mundial [2, 18].

En animales de laboratorio se ha revelado que, aunque pueden no ser un modelo fiel para SARS-COV-2, se ha demostrado que su presencia es causante del aumento de temperatura tras la infección por contacto directo con aerosoles de humanos y/o animales infectados [3, 7].

Investigaciones científicas mencionan que la transmisión del SARS-CoV-2 de personas infectadas hacia perros (*Canis lupus familiaris*) y otros animales de compañía, como gatos (*Felis catus*), hurones (*Mustelidae*) y hámsters (*Cricetinae*), debido a la posible interacción cercana con los dueños y a la susceptibilidad de los animales, ha ocurrido ya que éstos tienen los receptores celulares, que el virus necesita para ingresar a sus organismos y además multiplicarse exitosamente [5, 13, 26].

En este sentido, los estudios experimentales describen, además que la susceptibilidad a infectarse es menor en perros que en gatos domésticos, debido a que estos últimos, poseen un mayor número de receptores para SARS-CoV-2 en las células de su aparato respiratorio, que los hace más propensos de presentar la enfermedad [5, 6, 10, 22, 27].

Para el diagnóstico de esta virosis, así como, la mayoría de enfermedades que afectan al ser humano y a los animales, la serología cumple un papel importante como herramienta de ayuda y orientación. En el caso del COVID-19, una de las principales pruebas laboratoriales utilizadas es la cuantificación de las inmunoglobulinas (Ig) en suero, y ello permite identificar si se estuvo en contacto o no con el virus del COVID-19, y además puede cuantificar la respuesta inmune del organismo frente a SARS-CoV-2 [1].

A pesar que en la actualidad aún no hay evidencia cierta de que los animales domésticos y/o de compañía, tales como los perros y los gatos tengan un papel significativo en la transmisión zoonótica al ser humano, queda la duda ya que ellos también son susceptibles al virus. Es por ello que se planteó esta investigación, cuyo propósito u objetivo fue la de evaluar los niveles de anticuerpo anticovid-19 presentes en perros que convivían con personas que padecieron el COVID-19, con sintomatología y pruebas de laboratorio positivas y determinar la posible zoonosis inversa, de humanos a mascotas caninas.

MATERIALES Y METODOS

Zona de estudio

El estudio se enmarcó en una investigación del tipo cuantitativa, no experimental, transversal y exploratoria, cuya muestra poblacional fue tomada de 40 perros domésticos, sin diferencia de edad o sexo, que ingresaron al consultorio RoChi-Vet® en la parroquia de Alangasi, perteneciente a la ciudad de Quito, Ecuador y cuyos propietarios fueron diagnosticados con SARS-CoV-2 durante el periodo de diciembre de 2021 a enero de 2022.

Extracción de muestras

A las 40 unidades experimentales (pacientes), se les tomaron muestras sanguíneas, punción de la vena cefálica, y almacenadas en tubos que contenían ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante. Cada una de las muestras, luego fue depositada en una cava portátil de transporte conteniendo moldes de refrigeración para su posterior análisis en laboratorios SERVILAB.

Determinación de inmunoglobulinas

Los niveles de Ig, se determinaron por método de inmunofluorescencia, mediante equipo LANSIONBIO LS-1100, fabricación China, para determinar la presencia de Ig. Se evaluaron los niveles de IgG, la cual es indicativa de la respuesta inmunológica de infecciones activas, y de IgM, que da indicios de infecciones no actuales y que habían permitido al perro, desarrollar una respuesta inmunitaria secundaria ante el COVID-19. Los posibles resultados a obtenerse podrían ser:

- IgM negativo e IgG positivo: Indica inmunidad activa a la enfermedad (por infección anterior, de meses o años, o vacunación);
- IgM positivo e IgG negativo: Indica una infección aguda, de días o semanas;
- IgM negativo e IgG negativo: Muestra que la persona nunca ha tenido contacto con el agente infeccioso;
- IgM positivo e IgG positivo: Indica una infección reciente, de semanas o meses [16].

Los niveles negativos permitidos para IgG son hasta 0,04 Miliunidades internacionales por mililitro (mIU·mL⁻¹), valores superiores se consideran positivos, indicadores de la enfermedad. Mientras que en el caso de IgG, los valores normales se consideraron hasta 0,04 mIU·mL⁻¹, a partir de allí, se consideran como valores positivos.

Análisis serológicos adicionales

Además de los niveles de las Ig (IgG e IgM), se midieron los valores de transaminasa glutámico oxalacética (TGO) también llamada AST (aspartato aminotransferasa) y de transaminasa pirúvica (TGP) o ALT (alanina aminotransferasa), como posibles indicadoras de patologías asociadas al COVID-19, mediante el uso del analizador automático Vetscan analizador químico (ABAXIS, EUA). Los rangos normales para TGO y TGP, correspondieron a 8,9-48,5 y 8,2-57,3, unidades por litros (U·L⁻¹), respectivamente. Adicionalmente se utilizó un espectrofotómetro, de marca ELAB BIOLOGICAL SCIENCE, de fabricación Alemana, que mediante el método ultra violeta visible (UV-vis) optimizado (IFCC) permitió la determinación de la integridad del hígado.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos del laboratorio (IgG, IgM), así como, las transaminasas (TGO y TGP), y los demás datos obtenidos de la historia clínica (edad y sexo) se evaluaron con estadística descriptiva. Mediante pruebas de frecuencias (Ji-cuadrado) y porcentajes todo ellos, utilizando el programa estadístico SAS [28].

RESULTADOS Y DISCUSION

En la TABLA I se puede apreciar la composición por sexo de los individuos (caninos) que conformaron el estudio.

TABLA I
Frecuencias de los individuos bajo estudio por Sexo

Sexo	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
Hembras	23	57,5	57,5
Machos	17	42,5	100,0
Total	40		

En la misma se observa, que a pesar de que hubo una mayor cantidad de perros del género femenino, hubo una muy buena representación también de los machos.

En la TABLA II se puede apreciar la composición por edad de los individuos (perros) que conformaron el estudio destacando que la mayor cantidad de individuos involucrados correspondió a animales de la categoría jóvenes y adultos, con muy poca representación de cachorros y menos aún de geriátricos. Esto permite deducir, que se contó con un contingente de animales fuertes y con su aparato inmunológico funcional.

TABLA II
Frecuencias de los individuos bajo estudio por Edad

Edad	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
Menor a 1 año	3	7,5	7,5
1-5 años	27	67,5	75,0
5-10 años	9	22,5	97,5
10-13 años	1	2,5	100
Total	40		

Ambas variables categóricas (sexo y edad), no mostraron efectos significativos sobre la probabilidad de padecer o no el COVID-19 y al igual que en los humanos, ambos sexos y jóvenes y adultos, podrían padecer la enfermedad.

Del total de los 40 perros evaluados, solo 2 de ellos mostraron niveles positivos en los valores de las inmunoglobulinas (5 %). El primero de ellos, correspondió a una perra de 5 años (AdE), la cual presentó el cuadro de IgG negativo e IgM positivo, indicativo de una infección aguda; mientras que el segundo caso fue una perra de 1 AdE, que presentó ambas Ig's positivas, siendo indicativo que su cuadro era de

recién adquisición. Todos los demás perros (38), presentaron valores negativos de ambas Ig, lo que indicaba que a pesar de estar en contacto con sus dueños (COVID positivos), nunca entraron en contacto con el virus o en todo caso fueron resistente al mismo (FIG. 1).

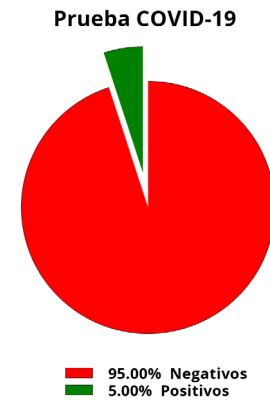


FIGURA 1. Resultados obtenidos de las pruebas de Anticuerpos de IgA e IgM en perros (positivos y negativos)

Desde el punto de vista experimental, la forma o mecanismo de transmisión del COVID-19 del humano al perro indican, que al igual que ocurre entre los seres humanos, es decir, se contagian de manera directa, ya sea por inhalación de microgotas en el aire, saliva o aerosoles provenientes del tracto respiratorio o bien estas mismas partículas en el suelo, más aún, conociendo las características virulentas del SARS-CoV-2 [6, 10].

Los estudios previos realizados en plena pandemia han sido contradictorios, ya que algunos trabajos indican reportes positivos de transmisión en perros y gatos [4, 11, 12, 15, 24, 27]; sin embargo, de ninguna manera representan una fuente de infección para las personas por lo que su valor en el ciclo epidemiológico de la enfermedad es muy bajo [5, 6, 9, 10].

Por otra parte, Meekins y col. [19] concluyen, que incluso en casos de infecciones experimentales producidas en condiciones de laboratorio, los perros de forma especial, podrían desarrollar una respuesta inmune contra la infección del COVID-19, que limitaría la posibilidad de transmisión hacia las personas.

Los análisis de las transaminasas tampoco fueron indicativo de alguna patología, que hiciera sospechar de un cuadro clínico de COVID-19, y que conllevaran a alteraciones en los niveles de TGP y/o TGO. Los resultados indicaron, que solo uno de los pacientes presentó un valor ligeramente alto de TGP (58,1 U·L⁻¹), correspondiendo a un ejemplar macho de 8 AdE y 4 de los perros mostraron valores ligeramente inferiores de TGP (4,2 a 6,0 U·L⁻¹), los cuales no mostraron un patrón característico, ya que correspondieron a tres de ellos a ejemplares machos de 9 meses, 3 y 9 AdE, respectivamente y a una hembra de 1 AdE, lo cual indica que dichos valores disminuidos en TGP podrían deberse a cualquier otro factor, no necesariamente causado por el virus del COVID-19. Los valores de TGO estuvieron dentro de su rango normal (8,9-48,5 U·L⁻¹).

Se debe destacar que ninguno de los 40 pacientes mostró durante el periodo de estudio síntomas relacionados con el COVID-19, representado por cuadros respiratorios o digestivos, a pesar que estas relaciones íntimamente próximas entre los humanos enfermos y sus mascotas, lo cual podría propiciar la transmisión zoonótica. Así mismo, no se presentó correlación estadística entre los resultados de Ig y los valores de TGP y TGO.

CONCLUSIONES

El estudio permite concluir, que se cuenta con una herramienta sensible para el diagnóstico del COVID-19 en perros; no obstante, no se tiene evidencia que exista la probabilidad de transmisión y contagio desde el ser humano (dueño) a sus mascotas, y muchos menos de manera de contagio zoonótico inverso, ya que el 95 % de los perros bajo estudio, resultó ser negativo a la prueba. El factor sexo y edad no afectó significativamente la probabilidad de padecer o no el COVID-19, al igual que no existió correlación entre Ig y los valores de TGP y TGO.

Conflicto de Intereses

Los autores certifican que no existen conflictos de interés en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] ABDEL-MONEIM, A. S.; ABDELWHAB, E.M. Evidence for SARS-CoV-2 Infection of Animal Hosts. **Pathogens**. 9(7): 529. 2020. <https://doi.org/gg4fzt>.
- [2] AGUILAR, N.; HERNÁNDEZ, A.; GUTIERREZ, C. Descripción del virus Características del SARS-CoV-2 y sus mecanismos de transmisión SARS-CoV-2. **Rev. Latin. Infect. Pediatr.** 33(3): 143-148. 2020. <https://doi.org/h969>.
- [3] 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. Experimental infection of domestic dogs and cats with SARS-CoV-2: Pathogenesis, transmission, and response to reexposure in cats. **Proceed. Nation. Academy Sci.** 117(42): 26382-26388. 2020. <https://doi.org/ghj9d7>.
- [4] CABRERA, A.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, D.; GUTIÉRREZ, L.A.; DÍAZ, F.J.; FORERO, D.; RODAS, J.D. Infección natural de SARS-CoV-2 en gatos y perros domésticos de humanos diagnosticados con COVID-19 en el Valle de Aburrá, Antioquia. **Biomed.** 42: e6407. 2022.
- [5] CALVET, G.A.; PEREIRA, S.A.; OGRZEWALSKA, M.; PAUVOLID-CORRÉA, A.; RESENDE, P.C.; TASSINARI, W.S.; COSTA, A.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.D.C.; MARTINS, E.B.; ORNELLAS, R.O.; CORRÉA, M.L.; ANTONIO, I.M.; GUARALDO, L.; MOTTA, F.D.C.; BRASIL, P.; SIQUEIRA, M.M.; GREMIÃO, I.D.; MENEZES, R.C.. 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. 2021.
- [6] CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC-COVID-19). Animals and COVID-19. 2020. Center for Disease Control and Prevention (CDC). EUA. En línea: <https://bit.ly/3AKt8CS>. 02/04/2022.
- [7] COHEN, J. From mice to monkeys, animals studied for coronavirus answers Infected lab animals can assess drugs and vaccines. **Sci.** 368: 221-222. 2020.
- [8] COLINA, S.; ASPITIA, C.; NOGUEIRAS, J.; SERENA, M.; ECHEVERRIA, M.; METZ, G. The third great leap: animal coronaviruses in Latin America. **Analecta Vet.** 41(2): e059. 2021.
- [9] CSISZAR, A.; JAKAB, F.; VALENCAK, T.G.; LANSZKI, Z.; TÓTH, G.E.; KEMENESI, G.; TARANTINI, S.; FAZEKAS-PONGOR, V.; UNGVARI, Z. Companion animals likely do not spread COVID-19 but may get infected themselves. **GeroSci.** 42(5): 1229-1236. 2020. <https://doi.org/gk7d9s>.
- [10] DECARO, N.; BALBONI, A.; BERTOLOTI, L.; MARTINO, P. A.; MAZZEI, M.; MIRA, F.; AGNINI, U. SARS-CoV-2 Infection in Dogs and Cats: Facts and Speculations. **Frontiers in Vet. Sci.** 8: 80. 2021. <https://doi.org/h97b>.
- [11] FREULING, C.M.; BREITHAUP, A.; MÜLLER, T.; SEHL, J.; BALKEMABUSCHMANN, A.; RISSMANN, M.; KLEIN, A.; WYLEZICH, C.; HÖPER, D.; WERNIKE, K.; AEBISCHER, A.; HOFFMANN, D.; FRIEDRICH, V.; DORHOI, A.; GROSCHUP, M.H.; BEER, M.; ETTENLEITER, T.C. Susceptibility of Raccoon Dogs for Experimental SARS-CoV-2 Infection. **Emerg. Infect. Dis.** 26(12): 2982. 2020. <https://doi.org/ffzf>.
- [12] FRITZ, M.; ROSOLEN, B.; KRAFFT, E.; BECQUART, P.; ELGUERO, E.; VRATSKIKH, O.; DENOLLY, S.; BOSON, B.; VANHOMWEGEN, J.; GOUILH, M. A.; KODJO, A.; CHIROUZE, C.; ROSOLEN, S.G.; LEGROS, V.; LEROY, E.M. High prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in pets from COVID-19+ households. **One Health**. 11: 100192. 2020. <https://doi.org/gk7fbm>.
- [13] HOSSAIN, M.G.; JAVED, A.; AKTER, S.; SAHA, S. SARS-CoV-2 host diversity: An update of natural infections and experimental evidence. **J. Microbiol. Immunol. Infect.** 54(2): 175-181. 2021. <https://doi.org/gg4s87>.
- [14] HU, B.; GUO, H.; ZHOU, P.; SHI, Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nat. Rev. Microbiol.** 19: 141-154. 2021.
- [15] KLAUS, J.; ZINI, E.; HARTMANN, K.; EGBERINK, H.; KIPAR, A.; BERGMANN, M.; PALIZZOTTO, C.; ZHAO, S.; ROSSI, F.; FRANCO, V.; PORPORATO, F.; HOFMANN-LEHMANN, R.; MELI, M.L. SARS-CoV-2 Infection in Dogs and Cats from Southern Germany and Northern Italy during the First Wave of the COVID-19 Pandemic. **Viruses**. 13(8):1453. 2021. <https://doi.org/h97h>.
- [16] LAIDOUDI, Y.; SEREME, Y.; MEDKOUR, H.; WATIER-GRILLOT, S.; SCANDOLA, P.; GINESTA, J.; ANDRÉO, V.; LABARDE, C.; COMTET, L.; POURQUIER, P.; RAOULT, D.; MARIÉ, J.L.; DAVOUST, B. SARS-CoV-2 antibodies seroprevalence in dogs from France using ELISA and an automated Western blotting assay. **One Health**. 13: 100293. 2021. <https://doi.org/h97c>.
- [17] LAU, S.K.P.; LUK, H.K.H.; WONG, A.C.P.; LI, K.S.M.; ZHU, L.; HE, Z.; FUNG, J.; CHAN, T.T.Y.; FUNG, K.S.C.; WOO, P.C.Y. Possible bat origin of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. **Emerg. Infect. Dis.** 26: 1542-1547. 2020.
- [18] MAGUIÑA-VARGAS, C.; GASTELO-ACOSTA, R.; TEQUEN-BERNILLA, A. El nuevo Coronavirus y la pandemia del Covid-19. **Rev. Med. Herediana**. 31(2): 125-131. 2020. <https://doi.org/gh9h>.

- [19] MEEKINS, D.A.; GAUDREAU, N.N.; RICHT, J.A. Natural and experimental SARS-CoV-2 infection in domestic and wild animals. **Viruses**. 13: 1993. 2021.
- [20] NEWMAN, A.; SMITH, D.; GHAI, R. R.; WALLACE, R. M.; TORCHETTI, M. K.; LOIACONO, C.; MURRELL, L.S.; CARPENTER, A.; MOROFF, S.; ROONEY, J.A.; BEHRAVESH, C.B. First Reported Cases of SARS-CoV-2 Infection in Companion Animals—New York, March–April 2020. **Morb. Mort. Week. Rep.** 69(23): 710. 2020. <https://doi.org/ghc7tm>.
- [21] OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Infeccion por SARS-COV-2 en animales (Ficha Tecnica de Enfermedad). 2021. OIE. EUA. En línea: <https://doi.org/h97d>. 24/04/2022.
- [22] PATTERSON, E.I.; ELIA, G.; GRASSI, A.; GIORDANO, A.; DESARIO, C.; MEDARDO, M.; SMITH, S.L.; ANDERSON, E.R.; PRINCE, T.; PATTERSON, G.T.; LORUSSO, E.; LUCENTE, M.S.; LANAVE, G.; LAUZI, S.; BONFANTI, U.; STRANIERI, A.; MARTELLA, V.; BASANO, F.S.; BARRS, V.R.; RADFORD, A.D.; AGRIMI, U.; HUGHES, G.L.; PALTRINIERI, S.; DECARO, N. Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy. **Nature Communicat.** 11: 6231. 2020.
- [23] SALLARD, E.; HALLOY, J.; CASANE, D.; DECROLY, E.; VAN-HELDEN, J. Tracing the origins of SARS-COV-2 in coronavirus phylogenies: a review. **Envirom. Chemistry Lett.** 19(2): 769–785. 2021. <https://doi.org/gjnzwm>.
- [24] SÁNCHEZ-MONTES, S.; BALLADOS-GONZÁLEZ, G.G.; GAMBOA-PRIETO, J.; CRUZ-ROMERO, A.; ROMERO-SALAS, D.; PÉREZ-BRÍGIDO, C.D.; AUSTRIA-RUIZ, M.J.; GUERRERO-REYES, A.; LAMMOGLIA-VILLAGÓMEZ, M.A.; CAMACHO-PERALTA, I.P.; MORALES-NARCIA, J.Á.; BRAVO-RAMOS, J.L.; BARRIENTOS-VILLEDA, M.; BLANCO-VELASCO, L.A.; BECKER, I. No molecular evidence of SARS-CoV-2 infection in companion animals from Veracruz, Mexico. **Transbound. Emerg. Dis.** 16: e10.1111. 2021.
- [25] SANTILLAN-HARO, A. Caracterización Epidemiológica De Covid-19 En Ecuador. **InterAme. J. Med. Health.** 3: 1–7. 2020. <https://doi.org/h97f>.
- [26] 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.; BU, Z. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. **Sci.** 368(6494): 1016–1020. 2020. <https://doi.org/ggrj6s>.
- [27] 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.; POON, L.M.; PEIRIS, M. Infection of dogs with SARS-CoV-2. **Nature.** 586: 776–778. 2020.
- [28] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. SAS/STAT. User's guide, Rel. 9.1.3. 2014.