



**Análise da presença de anticorpos específicos para a proteína
Nucleocápside em ruminantes de explorações do Nordeste
Transmontano**

Dara Almeida

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e ao Instituto Politécnico da Guarda para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde – Ramo Biotecnologia

Orientado por:

Prof.^a Doutora Carina de Fátima Rodrigues

Prof. Doutor Helder Quintas

Bragança, outubro 2023

DECLARAÇÕES

É autorizada a reprodução integral desta dissertação/tese apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete. Ao abrigo do artigo 8º do decreto-lei nº 388/70, declara-se que fazem parte integrante desta dissertação os seguintes trabalhos já publicados ou em publicação:

Poster apresentado em Congresso:

“SARS-CoV-2 Serological Screening in small ruminants of the Northeast of Portugal: a preliminary study”

2nd Egas Moniz One Health Symposium Teaming up for a better Public Health 3rd November 2023 Monte da Caparica.

Trabalho financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) e por fundos nacionais - Projetos de Investigação Científica e Desenvolvimento Tecnológico (IC&DT: Programa Testar com Ciência e Solidariedade), no âmbito do projeto “NORDTEST – Infeção por coronavírus SARS-CoV-2 no Nordeste de Portugal: desenvolvendo conhecimentos e ferramentas para uma melhor gestão da doença (NORTE-01-0145-FEDER-072562)”. Este trabalho foi efetuado em colaboração Unidade Local de Saúde do Nordeste de Bragança (ULSNE) bem como, com o Centro de Investigação de Montanha (CIMO).



RESUMO

O coronavírus SARS-CoV-2 é o agente causador da pandemia COVID-19. Segundo o ECDC, a situação epidemiológica do SARS-CoV-2 em humanos e animais está em constante evolução. Até à data, entre as espécies de animais de exploração que parecem transmitir o SARS-CoV-2, estão os visons americanos. Esta espécie parece apresentar uma maior probabilidade de ser infetada por humanos ou outros animais e, posteriormente, transmitir o SARS-CoV-2. No entanto, a informação é escassa relativamente a muitas outras espécies domesticadas. O principal objetivo deste estudo é identificar potencial exposição ao SARS-CoV-2 entre pequenos ruminantes (ovinos e caprinos) em explorações no nordeste de Portugal.

Foi realizada uma análise serológica em 600 amostras de sangue (300 de ovelhas e 300 de cabras) recolhidas desde o início da pandemia de COVID-19, abrangendo vários períodos pandémicos (T1: primeira vaga alfa; T2: delta; T3: omicron). As amostras de soro foram obtidas após centrifugação e este foi separado e conservado a -80°C . Estas amostras foram colhidas durante visitas técnicas de veterinários das organizações de produtores pecuários como parte de vários estudos zoonóticos realizados na região em 27 explorações diferentes. Todas as amostras de soro recolhidas nos períodos especificados foram submetidas a análises sorológicas utilizando um ensaio imunoenzimático indireto de ligação de anticorpos (ELISA) para detetar a presença de anticorpos IgG contra a nucleocápside (N) do SARS-CoV-2 nas amostras de soro (Kit ELISA multi-espécies de duplo antigénio D Screen SARS-CoV-2, seguindo as instruções do fabricante, para esta deteção de anticorpos).

Entre as amostras analisadas, 460 cumpriram os critérios de qualidade aceitáveis para o teste realizado (230 de cabras e 230 de ovelhas). Destas, 8 apresentaram um resultado positivo (1.7%), indicando a presença de anticorpos IgG contra a proteína N do SARS-CoV-2 (IgG anti-N), das quais 5 em caprinos (2.17%) e 3 em ovinos (1.3%). É importante notar que 2 dessas amostras positivas foram recolhidas durante o período T1, três delas, durante o período T2 e 2 durante o período T3. Importante ainda, 2 das amostras positivas eram provenientes da mesma exploração. As amostras positivas pertenciam a animais de 6m-2 a e eram exclusivamente fêmeas.

A análise de anticorpos anti-N realizada ao longo deste período permitiu a identificação de infecções recentes, possibilitando a avaliação da exposição ao SARS-CoV-2 nas populações de pequenos ruminantes desde o início da pandemia. Estes são os resultados preliminares de um estudo serológico realizado no âmbito do projeto NORDTEST-COVID19, com o objetivo de detetar potencial exposição ao SARS-CoV-2 em pequenos ruminantes. Estão planeadas análises adicionais para estas amostras, incluindo a deteção de anticorpos IgG específicos contra a proteína Spike do SARS-CoV-2, tendo em consideração as três principais estirpes do vírus tanto em animais como em seres humanos (tratadores), seguindo uma abordagem de “Uma só Saúde”.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; COVID-19; Transmissão para animais; Anticorpos; IgG anti- Nucleocápside

ABSTRACT

The SARS-CoV-2 coronavirus is the causative agent of the COVID-19 pandemic. According to the ECDC, the epidemiological situation of SARS-CoV-2 in humans and animals is constantly evolving. To date, among the species of farm animals that appear to transmit SARS-CoV-2, American minks are one such species. This species seems to have a higher probability of being infected by humans or other animals and subsequently transmitting SARS-CoV-2. However, information is scarce regarding many other domesticated species. The objective of this study is to identify potential exposure to SARS-CoV-2 among small ruminants (sheep and goats) on farms in northeastern Portugal.

A serological analysis was performed on 600 blood samples (300 from sheep and 300 from goats) collected since the beginning of the COVID-19 pandemic, spanning various pandemic periods (T1: first alpha wave; T2: delta; T3: omicron). The serum samples were obtained after centrifugation and were separated and stored at -80°C. These samples originally were collected during technical visits from official veterinarians of the local health units as part of various zoonotic studies conducted in the region from 27 different farms. All serum samples collected during the specified periods were subjected to serological analysis using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the presence of IgG antibodies against the nucleocapsid (N) protein of SARS-CoV-2 in the serum samples (D Screen SARS-CoV-2 dual antigen multi-species ELISA kit, following the manufacturer's instructions for antibody detection).

Among the analyzed samples, 460 met acceptable quality criteria for the test performed (230 from goats and 230 from sheep). Of these, 8 tested positive (1.7%), indicating the presence of IgG antibodies against the N protein of SARS-CoV-2 (anti-N IgG), with 5 in goats (2.17%) and 3 in sheep (1.3%). It is important to note that 2 of these positive samples were collected during period T1, three during period T2, and 2 during period T3. Importantly, 2 of the positive samples were from the same farm. The positive samples belonged to animals aged 6m-2 years or older and were exclusively female.

The analysis of anti-N antibodies conducted over this period allowed for the identification of recent infections, enabling the assessment of exposure to SARS-CoV-2 in small ruminant populations since the beginning of the pandemic. These are preliminary results of a serological study conducted as part of the NORDTEST-COVID19 project with the aim of detecting potential exposure to SARS-CoV-2 in small ruminants. Additional analyses for these samples are planned, including the detection of specific IgG antibodies against the Spike protein of SARS-CoV-2, considering the three major virus strains in both animals and humans (handlers), following a "One Health" approach.

Key words: SARS-CoV-2; COVID-19; Transmission to animals; Antibodies; Anti-Nucleocapsid IgG

ÍNDICE

RESUMO	IV
ABSTRACT	VII
CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO TEÓRICO	3
1.1 A COVID-19: uma zoonose	4
1.2 A família dos Coronavírus	5
1.3 O SARS-CoV-2: Estrutura e organização genómica	6
1.4 Processo de Infecção da COVID-19	7
1.5 Resposta Imunológica: Humoral e Celular	9
1.7 Sintomatologia	10
1.8 Diagnóstico Molecular e Serológico da COVID-19	11
1.9 COVID-19 detetada em diferentes ruminantes: estudos anteriores	12
CAPÍTULO II – OBJETIVOS	16
CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Amostra e desenho de estudo	19
3.2. Procedimentos laboratoriais	20
3.3. Análise estatística	23
3.4. Representação dos resultados no mapa	23
3.5. Considerações éticas	23
CAPÍTULO IV – RESULTADOS	24
4.1 Caraterização da amostra ruminantes e localização das clínicas veterinárias e explorações.	25
4.2. Resultados da análise serológica	26
4.3 Distribuição dos casos positivos no tempo	28
4.4 Prevalência estimada pelo método de Wilson	29
CAPÍTULO V – DISCUSSÃO	30

Transmissão SARS-CoV-2 em animais de produção	31
Resultados serológicos em pequenos ruminantes: o método utilizado	32
Limitações do estudo	33
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXO	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Estrutura do Vírus SARS-CoV-2	19
Fig. 2: Mecanismo de entrada do vírus SARS-CoV-2 na célula humana	20
Fig.3: Desenho do Estudo com Fluxograma representando o processo de seleção e as metodologias utilizadas	32
Fig.4: Gráfico com diferentes vagas da COVID-19 e a estirpe correspondente	33
Fig.5: Método de deteção ELISA para anticorpos dirigidos contra nucleocápside do SARS-CoV-2	35
Fig.6: Mapa de Portugal com a representação dos concelhos de distrito de bragança com as explorações deste estudo	40
Fig.7: Representação dos concelhos com explorações que tem casos de pequenos ruminantes positivos o antígeno anti-N SARS-Cov-2	41
Fig.8: Representação da linha do tempo relativamente ao tempo das infeções por sars-cov-2	41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Estudos realizados em ruminantes no início da pandemia COVID-19	27
Tabela 2: Características das amostras dos pequenos ruminantes	38
Tabela 3: Característica dos pequenos ruminantes seropositivos	39
Tabela 4: Verdadeira Prevalência dos seropositivos para anticorpos anti N	42

ABREVIATURAS

ACE2	Enzima conversora da angiotensina 2
BCoV, β -CoV	Coronavírus bovino
CECoV; α -CoV	Coronavírus entérico canino
CIMO	Centro de Investigação de Montanha
COV	Coronavírus humano
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
DGAV	Direção-Geral da Alimentação e Veterinária
E	Proteína de envelope do vírus SARS-COV-2
ECDC	Centro de Controlo de Doenças Europeu
EVOCs	Culturas de órgãos ex vivo
FCoV; α -CoV	Coronavírus felino
GRP78	Proteína regulada por glicose 78
HCoV	Coronavírus humanos
HRP	Amplificação de ácido nucleico
IC	Intervalo de Confiança
IgA	Imunoglobulina A
IBV; γ -CoV	Vírus da bronquite infecciosa
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL 1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
M	Proteína Transmembranar do vírus SARS-COV-2
MERS-CoV	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade da M.celular
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
N	Proteína Nucleocápside do vírus SARS-COV-2
NAAT	Amplificação de ácido nucleico
NK	Células Natural Killer
OMS	Organização Mundial de Saúde

ORF	Open Reading Frame
PEDV; β -CoV	Coronavírus da diarreia epidêmica suína
RAS	Enzima do Sistema Renina Angiotensina-Aldosteron
RBD	Domínio de ligação ao recetor
RE	Retículo endoplasmático
Rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Transcrição Reversa Seguida da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo rea
RPLN	Linfonodos retrofaríngeos
S	Proteína Spike do vírus SARS-COV-2
SNS	Serviço Nacional de Saúde
Se	Sensibilidade
Sp	Especificidade
SVNT	Testes de neutralização
SARS-ACoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave-2
TMPRSS2	Serina protease transmembranar-2
TC	Tomografia Computadorizada
TP	Verdadeira Prevalência
ULSNE	Unidade Local de Saúde do Nordeste
WHOAH	Organização Mundial da Saúde Animal

INTRODUÇÃO

A doença do novo coronavírus de 2019 (COVID-19) é uma doença causada por um novo coronavírus humano (CoV) conhecido como coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2, espécie SARS, subgênero *Sarbecovirus*, gênero *Betacoronavirus*, subfamília *Orthocoronavirinae*, família *Coronaviridae* (Di Teodoro et al., 20).

Este vírus foi descrito pela primeira vez em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, província de Hubei, China (Di Teodoro et al., 2021) e foi responsável pela situação de pandemia que resultou em mais de 5 milhões de mortes em menos de 2 anos (Wernike et al., 2022). Desde a primeira identificação do novo coronavírus em dois cães em Hong Kong (Sit et al., 2020), foram realizados estudos com intuito de caracterizar o tropismo e a gama de hospedeiros do vírus, pois esses dependem da capacidade do domínio de ligação ao recetor (RBD) da proteína Spike (S) do SARS-CoV-2 de se ligar à enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) do hospedeiro (Fusco et al. 2023).

Segundo os dados epidemiológicos da Organização Mundial da Saúde Animal (WOAH) foram reportados 676 surtos a nível mundial, afetando 23 espécies em 36 países. Foi comprovado que a estrutura primária da ACE2 é altamente conservada em vertebrados, sendo assim suscetíveis em várias espécies para infecção por SARS-CoV-2, estes normalmente apresentam uma infecção assintomática, mas com o tempo passam a ser ligeiros ou moderados (Fusco et al. 2023).

O SARS-CoV-2 é um vírus zoonótico com uma vasta gama de espécies animais suscetíveis que podem servir como reservatórios secundários para perpetuar a evolução viral e produzir novas variantes (Gaudreault et al., 2021) permitindo assim a adaptação viral e a propagação dos animais para os humanos (Pickering et al. 2022).

A detecção de anticorpos por exposição a SARS-CoV-2 em animais constitui uma estratégia para avaliar um contato anterior com o vírus, sendo um ponto de partida para avaliar a suscetibilidade de uma espécie à infecção. Determinar a gama de hospedeiros, a patogénese e a transmissibilidade de um patógeno emergente é importante para compreender melhor a epidemiologia da doença e direcionar os esforços de vigilância (Bosco-Lauth et al. 2021) e perceber a suscetibilidade de animais ao SARS-CoV-2 é de grande interesse para a comunidade científica internacional, pois tem-se colocado a

hipótese de que a faixa de hospedeiros do SARS-CoV-2 pode depender da interação da proteína de Spike do vírus com os recetores das células hospedeiras (Di Teodoro et al., 2021; Amer, 2018). Esta desempenha um papel crucial na entrada do vírus na célula hospedeira. Com base em análises filogenéticas e de padrões de expressão do ACE2, vários mamíferos podem ser suscetíveis ao SARS-CoV-2 (Di Teodoro et al., 2021; Amer, 2018). Além disso, é importante determinar tanto o risco de transmissão de doenças zoonóticas (infecção de seres humanos por animais) como de zoonose reversa (infecção de animais por seres humanos) das espécies que estão em contacto próximo com seres humanos (Bosco-Lauth et al., 2021).

O Centro de Investigação de Montanha (CIMO) em colaboração Unidade Local de Saúde do Nordeste de Bragança (ULSNE) desenvolvem algumas das atividades do projeto NORDTESTE: “Infecção por SARS-CoV-2: desenvolvendo conhecimentos e ferramentas para uma melhor gestão da doença” (02/SAICT/2020/072562). Uma das atividades deste projeto está relacionada com o estudo da suscetibilidade à infecção por SARS-CoV-2 em animais de produção através da análise serológica (anticorpos específicos) e/ou análise molecular em explorações do distrito de Bragança.

Este documento apresenta o estado da arte sobre a suscetibilidade à infecção por SARS-CoV-2 em animais bem como os resultados preliminares do rastreio serológico efetuado em amostras de pequenos ruminantes de explorações agrícolas do Nordeste Transmontano.

Esta dissertação é apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança (IPB) e ao Instituto Politécnico da Guarda (IPG), no âmbito da unidade curricular Projeto/Estágio/Dissertação, que corresponde ao segundo ano do mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde – Ramo Biotecnologia.

CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1.1 A COVID-19: uma zoonose

As Zoonoses são infecções causadas por agentes patogénicos que geralmente tem como reservatório um animal selvagem, podendo este ser assintomático, sendo transmitidos diretamente aos seres humanos ou animais domésticos, que por consequência pode-se transmitir novamente aos seres humanos (Cortés, 2021). O SARS-CoV-2 e outros coronavírus são considerados zoonoses e dependendo do vírus, existem diferentes reservatórios e intermediários, logo essas infecções representam um importante problema de saúde pública global (Halabowski & Rzymiski, 2021).

Sabe-se que o genoma do SARS-CoV-2 é 96% idêntico comparado com o genoma completo de um coronavírus do morcego-ferradura (*Rhinolophus affinis*), que vive em algumas regiões da China e que tem sido proposto como seu reservatório (Cortés, 2021).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem chamado a atenção para a necessidade de mudança na forma como se combatem e geram as zoonoses. O conceito “One Health” tem sido muito divulgado por ser uma abordagem que se baseia simultaneamente no bem-estar e a saúde das pessoas, animais, plantas e o ambiente que as acolhe, com o objetivo de alcançar mais e melhores resultados na área da saúde (*One Health-Uma Saúde*, n.d.). Esta é uma perspetiva atualizada, holística, colaborativa integradora, multidisciplinar e multifatorial, muito útil quando se trata de compreender tanto a transmissão quanto a prevenção de agentes patogénicos zoonóticos, emergentes ou reemergentes, como SARS-CoV-2 e outros coronavírus (Cortés, 2021).

1.2 A família dos Coronavírus

A diversidade genética, organização filogenética e características dos coronavírus humanos (HCOVs) se encontram na população humana há vários anos. Em 1968 com a observação dos viriões através de microscopia eletrónica, denominaram esta família de coronavírus devido a morfologia ser similar a uma “coroa solar” atribuída a projeções de proteínas (Sofia & Galhano, 2021).

Os CoVs são vírus ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples, envelopados com quatro classificações filogenéticas de estrutura genómica: alfa, beta, gama e delta, sendo os do género beta mais perigosos, promovendo infeções por CoV nas últimas duas décadas (Almeida et al., 2020).

O primeiro surgimento da epidemia de SARS-CoV foi em 2002 no hotel de Hong Kong num mercado de animais vivos em Guangdong, infetando 8.098 pessoas e causando 774 mortes (Walls et al., 2020).

No início da epidemia, muitos dos pacientes identificados tiveram exposições a animais antes de desenvolver a doença. Os anticorpos contra SARS-CoV foram detetados em animais expostos nos mercados como: civetas-das-palmeiras (*Paguma larvata*) e guaxinins (Goraichuk et al., 2020).

Pesquisas posteriores demonstraram que civetas e guaxinins criados em cativeiro e selvagens foram infetados por outros animais e provavelmente atuaram como hospedeiros intermediários (Goraichuk et al., 2020).

Mais tarde, o primeiro caso de infeção humana pela Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) foi detetada num indivíduo de 60 anos que sofreu uma pneumonia aguda grave em 2012 (Sofia & Galhano, 2021) na Península Arábica e disseminou-se para 27 países, infetando um total de 2.494 indivíduos (Walls et al., 2020).

O MERS-CoV foi detetado em 14 espécies de morcegos pertencentes a duas famílias de morcegos, *Vespertilionidae* e *Nycteridae*, o que indica que o MERS-CoV pode ter origem evolutiva em morcegos (Goraichuk et al., 2020).

O SARS-CoV-2 é o agente etiológico responsável pela Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19), foi identificado pela primeira vez em dezembro de 2019 em

Wuhan, China, e rapidamente se espalhou globalmente. Mais de 545 milhões de casos confirmados de COVID-19 são notificados pela OMS, resultando em mais de 6 milhões de mortes em todo o mundo (Fusco et al. 2023).

Alguns CoVs são endêmicos em animais domésticos em diferentes países. Os membros mais comuns dos CoVs que infetam animais são o vírus da bronquite infecciosa (IBV; γ -CoV) em galinhas, coronavírus da gastroenterite transmissível suína (TGEV; α -CoV), coronavírus da diarreia epidêmica suína (PEDV; β -CoV) em suínos, coronavírus bovino (BCoV, β -CoV), coronavírus entérico canino (CECoV; α -CoV) em cães, coronavírus felino (FCoV; α -CoV) em gatos (Abdel-Moneim & Abdelwhab, 2020).

CoVs como o SARS-CoV-2, podem emergir de hospedeiros da vida selvagem infetando humanos e animais domésticos e/ou pecuários produzindo um amplo espectro de doenças em diferentes espécies hospedeiras (Amer, 2018). Esses vírus destacam-se pela sua capacidade de alterar o tropismo dos tecidos, ultrapassar as barreiras interespecies e adaptar as variações ecológicas devido a alta taxa de mutação (uma única mutação/ genoma ou ciclo de replicação) (Decaro et al., 2010). No entanto, as mutações que alteram a sequência de aminoácidos da estrutura da proteína viral responsável pela ligação do vírus com as células do hospedeiro podem conferir ao vírus a capacidade de infetar uma nova espécie animal (Kreutz et al., 2021).

1.3 O SARS-CoV-2: Estrutura e organização genómica

O genoma completo do SARS-CoV-2 é de cerca de 30 kb e dois terços da região 5' contém poliproteínas ORF1ab (Open Reading Frame) que codificam ORF1ab, enquanto um terço da região 3' consiste em genes que codificam proteínas estruturais, conhecidas como glicoproteína de superfície (S), uma proteína do invólucro (E), proteína de membrana (M) e proteínas de nucleocapsídeo (N) (Yüce et al., 2021), todas necessárias para produzir uma partícula viral completa (Albuquerque et al., 2020)

A proteína (N), um invólucro proteico constituído por fosfolípidos e proteínas como a proteína (E) que é a menor proteína estrutural transmembranar, mas essencial na interação entre o vírus e a célula hospedeira devido à sua atividade na libertação

da partícula viral e a proteína de membrana (proteína M) (Fig 1), que é uma glicoproteína transmembranar com três domínios principais atuando como proteína estrutural mais abundante, que define a formação da partícula viral através do recrutamento dos restantes componentes do virião (Sofia & Galhano, 2021).

A proteína (S) determina a solubilidade das partículas do SARS-CoV-2, definindo assim a infeção viral, uma vez que é a maior proteína localizada na superfície do invólucro e está diretamente relacionada com a estabilidade e funcionalidade dos coronavírus (Sofia & Galhano, 2021) (Fig 1).

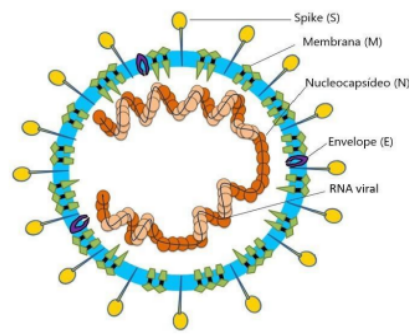


Fig. 1: Estrutura do Vírus SARS-CoV-2, adaptado de (Figueira, 2021)

1.4 Processo de Infeção da COVID-19

A transmissão do vírus SARS-CoV-2 é feita entre humanos por inalação ou contato com gotículas infetadas com período de incubação que varia de 2 a 14 dias (Granados-Riveron & Aquino-Jarquin, 2021).

A infeção de uma célula humana é feita através da introdução do genoma do RNA do SARS-CoV-2 na célula hospedeira pela proteína S homotrimérica altamente glicosilada para alcançar a fusão com as membranas das células alvo (Wrapp et al., 2019; Xia, 2021). A proteína (S) do SARS-CoV-2 é uma proteína transmembranar que possui uma subunidade S1 de ligação ao recetor N-terminal e uma subunidade S2 ligada C-terminal (Albuquerque et al., 2020).

Através da ligação ao recetor do hospedeiro pelo RBD em S1 é seguida pela clivagem proteolítica da proteína (S) pelas proteases do hospedeiro na parte S2

associada à membrana e na parte S1 distal, ligando-se à (ACE2) na superfície da célula hospedeira, enquanto S2 medeia a fusão da membrana (Granados-Riveron & Aquino-Jarquín, 2021). A clivagem proteolítica da proteína S pela furina ou outras proteases celulares é essencial para a infeção, pois separa duas funções da spike, demonstrando ser essencial para a entrada viral eficiente nas células pulmonares humanas, principalmente fusão célula-célula, para facilitar a disseminação viral de uma célula para outra (Granados-Riveron & Aquino-Jarquín, 2021).

Após a fusão da membrana do invólucro viral com a membrana plasmática ou do endossomo, o nucleocapsídeo viral é libertado no citoplasma e posteriormente, os ribossomas celulares traduzem o genoma viral envolvendo as proteínas ORF1a e ORF1b que são traduzidos através de um mecanismo de deslocamento ribossómico produzindo 15 ou 16 proteínas não estruturais (Hidalgo et al., 2021) (Fig 2).

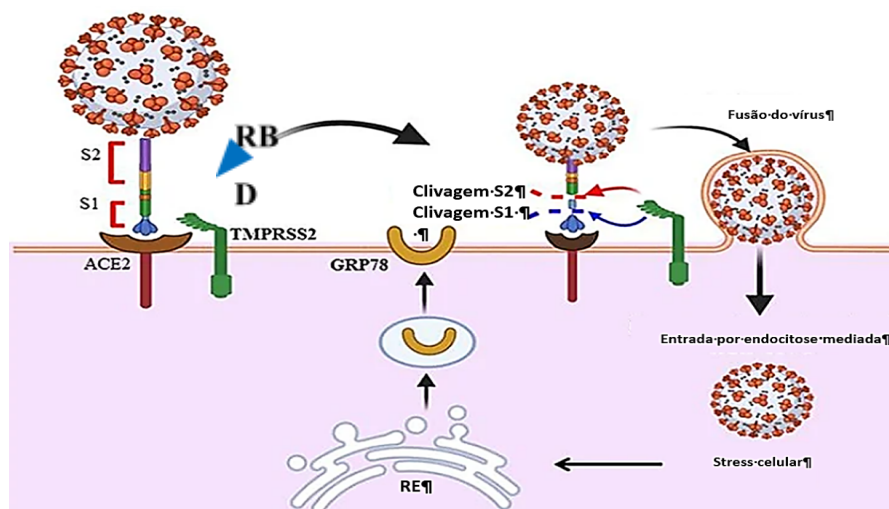


Fig.2. Mecanismo de entrada do vírus SARS-CoV-2 na célula humana, adaptado (Dessie & Malik, 2021). Legenda: (ACE2) enzima conversora de angiotensina 2; (GRP78) proteína regulada por glicose 78; (RBD) ligação ao recetor do hospedeiro; (TMPRSS2) serina protease transmembranar 2; (RE) retículo endoplasmático.

1.5 Resposta Imunológica: Humoral e Celular

A resposta imunitária celular tanto a inata como a adaptativa parecem desempenhar um importante papel na infeção por SARS-CoV-2 (Li et al., 2022). Estudos imunológicos anteriores, na infeção por SARS-CoV-1, demonstraram que as células T podem ser os principais mediadores no controlo da doença (Grifoni et al., 2020). A resposta inflamatória inata inicial ao SARS-COV 2 permite a ação rápida do recrutamento de células imunes para o local da infeção e a subsequente ativação, diferenciação e proliferação das células T (Molinero et al., 2022).

Associados à imunidade celular inata na COVID-19 temos diversos componentes celulares, entre os quais as células Natural Killer (NK), células linfóide inatas e as células T $\gamma\delta$, que geralmente limitam a propagação da infeção do vírus por ação citotóxica sobre as células alvo e produzem citocinas (Li et al., 2022) que em respostas inflamatórias patologicamente aumentadas se encontram em níveis elevados como a interleucina 1 β (IL 1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF) (Molinero et al., 2022).

Esses altos níveis de citocinas inflamatórias vão promover a resposta adaptativa mobilizando várias células imunes, como células T, macrófagos e neutrófilos da circulação sanguínea para o tecido infetado (Molinero et al., 2022).

A libertação desses mediadores é responsável por extensos danos tecidulares e celulares, inflamação pulmonar e sistémica, levando a casos graves de pneumonia viral e síndrome respiratória aguda severa (Almeida et al., 2020).

Na imunidade adaptativa, as células T CD8⁺ desempenham um papel crucial na citotoxicidade específica direcionada as células infetadas, os quais apresentam péptidos de origem viral nas moléculas de classe I do complexo maior de histocompatibilidade de membrana celular (MHC-I). Por outro lado, os linfócitos T CD4⁺ são fundamentais para ativar tando os T CD8⁺ como os linfócitos B (Li et al., 2022), por sua vez os linfócitos B vão produzir glicoproteínas como imunoglobulinas do tipo IgM, IgG e IgA específicas para SARS-COV-2 (Shi et al., 2020).

Após 10 dias de infecção por SARS-CoV-2, os anticorpos (IgM e IgG) começam a surgir. Os IgM são distintivos da fase inicial e aguda da doença, diminuindo progressivamente ao longo do tempo, por outro lado os níveis de IgG aumentam durante a fase de convalescença e diminuem de forma gradual (Brito et al., 2020; Arun Krishnan et al., 2020). A classe de imunoglobulinas IgG é a mais detetada em ensaios serológicos (Arun Krishnan et al., 2020).

A IgG é uma das proteínas mais abundantes no soro humano, representando cerca de 10–20% da proteína plasmática e pode ser dividida em quatro subclasses, nomeadas, em ordem decrescente de abundância, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. É constituída por quatro cadeias polipeptídicas, compostas por duas cadeias pesadas (H) idênticas de 50 kDa γ e duas cadeias leves (L) idênticas de 25 kDa κ ou λ , ligadas entre si por ligações dissulfeto intercadeias (Vidarsson et al., 2014).

A deteção de IgG é importante devido à sua persistência ao longo do tempo, sendo que os níveis de anticorpos resultantes da infecção podem variar. Geralmente, os níveis de anticorpos após uma infecção tendem a estar correlacionados com a gravidade da doença (De Donno et al., 2021).

A IgM é produzida como uma molécula ligada à superfície, na resposta imune, pelas células plasmáticas e secretada como pentâmeros solúveis que contêm 10 sítios de ligação ao antígeno e a cadeia de ligação (J), ou como hexâmeros contendo 12 sítios de ligação ao antígeno. Tem peso molecular de aproximadamente 900 ou 1050 kDa composto por uma cadeia pesada μ e uma cadeia leve (Keyt et al., 2020).

1.7 Sintomatologia

A fase I ou a fase da replicação viral é caracterizada pela entrada do vírus (Ochani et al., 2021) com presença de sintomas leves, como mal-estar, tosse seca e febre ou até mesmo assintomática (Molinero et al., 2022). Já na fase II ou inflamatória em que há uma multiplicação viral que provoca inflamação localizada no pulmão, está mais relacionada os pacientes desenvolvem pneumonia viral com tosse e febre (Molinero et al., 2022). Por sua vez, os imunocomprometidos tendem a desenvolver um estado mais grave com linfócitos T e linfócitos B significativamente reduzidos e citocinas inflamatórias elevadas (Ochani et al. 2021). Por último ocorre a fase III ou hiperinflamatória que é caracterizada pelo estágio mais grave da doença e

se manifesta como uma síndrome sistêmica extrapulmonar da hiperinflamação (Molinero et al.,2022).

Particularmente em animais os sinais clínicos da COVID-19 foram descritos como febre, tosse, dispneia, espirros, secreção nasal e ocular, vômito e diarreia (Wicaksana, 2016), inflamação no trato respiratório anterior e posterior e aumento da mortalidade (Emmanuel et al.,2023).

As principais lesões *post mortem* descritas em animais incluem pneumonia intersticial aguda com a presença de edema, hemorragias, necrose epitelial nas vias aéreas anteriores, diminuição do lúmen alveolar; infiltração de células inflamatórias e imunológicas; alterações hematológicas (Emmanuel et al.,2023).

1.8 Diagnóstico Molecular e Serológico da COVID-19

O diagnóstico de SARS-CoV-2 em humanos baseia-se no histórico epidemiológico, nas manifestações clínicas com a confirmação feita por métodos de detecção laboratorial como teste de amplificação de ácido nucleico (NAT), técnicas sorológicas (Rai et al.,2021) ou cultura e isolamento de partículas virais viáveis (Sousa,2020). De momento, o diagnóstico é feito principalmente por amplificação de ácidos nucleicos do SARS-CoV-2 pelo (RT-PCR), pois estes detetam o RNA viral em amostras de zaragatoa nasal ou faríngea, expetoração, aspirado traqueal, lavado bronco-alveolar, sangue, sendo que o trato respiratório inferior contém uma carga viral maior do que o trato respiratório superior (Sousa, 2020).

Embora a metodologia de o RT-PCR seja considerada “gold standard” esta pode produzir falsos negativos em certas ocasiões, o que inclui casos em que há uma carga viral insuficiente no trato respiratório superior, em pacientes em estágios iniciais da doença ou com forma leve, expressando baixa carga viral na amostra. Além disso, devido o SARS-CoV-2 ser um vírus de RNA, apresenta uma estabilidade limitada podendo ser degradado por RNAses libertadas após destruição celular, afetando a eficiência da detecção final (Liu et al., 2020; Wang et al., n.d.; Zhu et al., 2020). Os testes serológicos concentram-se na detecção de antígenos ou anticorpos contra o SARS-CoV-2 (Emmanuel et al.,2023), como detecção de anticorpos das classes IgM (revela exposição recente) podendo ser detetados no início da incubação,

anticorpos da classe IgG (exposição anterior), pois aparecem nos estádios de médio a tardio da infecção, demonstrando se um indivíduo foi infetado recentemente ou há mais tempo (Sousa, 2020). São caracterizados por serem testes de fácil execução e alto rendimento, porém suscetíveis a gerar falsos positivos e negativos (Gao & Quan, 2020). Algumas das técnicas usadas nessa base são o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), imunoensaio enzimático, o imunoensaio de fluxo lateral, teste de imunofluorescência, western blot e o teste de neutralização do vírus (Jarrom et al., 2022; Trabucchi et al., 2022).

A deteção de anticorpos neutralizantes permite detetar a interação entre o SARS-CoV-2 e a proteína recetora da membrana da célula hospedeira ACE2 que é considerada específica, mas apenas moderadamente sensível para amostras animais porque não deteta títulos baixos de anticorpos (Wernike et al. 2022).

A deteção do SARS-COV-2 em animais é relatada através do contato prévio com indivíduos infetados. De acordo com diversas publicações, o que se tem observado é que, assim como em humanos, o diagnóstico dos animais de produção vem sendo feitas através da deteção por RT-PCR e ensaios sorológicos (Hale et al., 2022; Fusco et al. 2023).

1.9 COVID-19 detetada em diferentes ruminantes: estudos anteriores

Devido à rápida propagação do agente patogénico produzida por infeções humanas, houve uma certa necessidade na intervenção de uma vigilância proativa em animais para deteção precoce de zoonose reversa de SARS-CoV-2, podendo levar ao estabelecimento de novos reservatórios, visto que infeções persistentes em um novo hospedeiro pode levar à adaptação viral, evolução e surgimento de transmissão de estirpes alteradas, apresentando assim riscos potencialmente significativos para a saúde humana e animal (Chandler et al., 2021b).

Estudos recentes, concentram-se em análises preditivas do potencial de ligação do SARS-CoV-2 com o recetor ACE2 em diferentes espécies animais, incluindo espécies de gado doméstico e ruminantes da vida selvagem (Kreutz et al., 2021), pois os genes (ACE2) de várias espécies de mamíferos são altamente conservados, logo pode haver

potencial ligação às proteínas ACE2 e posteriormente levar a infeção por SARS-CoV-2 (Sharun et al., 2021).

Num outro estudo feito em amostras de soro pré-pandemia e pós-pandemia, de veados selvagens nos EUA para exposição ao SARS-CoV-2, foram detetados anticorpos em (40%), amostras (Chandler et al., 2021b). Em outro recente relatório do Centro de Controlo de Doenças Europeu (ECDC), baseado numa revisão sistemática sobre as várias espécies animais que poderão constituir potenciais transmissores do SARS-CoV-2, são referidos os visons americanos, cães-guaxinins, gatos, furões, hamsters, ratos domésticos, morcegos de frutas do Egito, ratos-deer e veados-de-cauda-branca. De acordo com esta instituição Europeia, a abordagem de monitorização mais eficaz inclui a confirmação de surtos, testagem de animais doentes em caso de aumento de mortalidade, e vigilância genómica de variantes do vírus. A análise genómica revelou clusters específicos em visons com potencial de reintrodução na população humana.

Quanto aos animais de companhia, como gatos, furões e hamsters, são os mais suscetíveis à infeção, mas têm impacto limitado na circulação do vírus entre humanos. Entre os animais selvagens, estão principalmente carnívoros, grandes primatas e veados-de-cauda-branca que foram naturalmente infetados pelo SARS-CoV-2 (Nielsen et al., 2023).

Entre os animais de criação, os visons americanos têm a maior probabilidade de infeção por humanos ou outros animais, sendo responsáveis por vários surtos em explorações (ver tabela 1). Na maioria desses casos, sabia-se que os animais foram inicialmente infetados por uma pessoa com COVID-19 (Pickering et al. 2022). De acordo com o mesmo documento da ECDC, a introdução do SARS-CoV-2 em explorações de visons ocorre geralmente através de humanos infetados, sendo controlada por testes sistemáticos e medidas de biossegurança (Nielsen et al., 2023).

A grande maioria dos casos relatados de infeção natural pelo SARS-CoV-2 é em gatos domésticos (*Felis catus*). Foram registados em pelo menos 20 países, incluindo Argentina, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, Estados Unidos, França, Alemanha e Grécia (World Organisation for Animal Health, 2022). A maioria dos animais contraiu a infeção através de contacto próximo com humanos infetados por

SARS-CoV-2. Num caso descrito na Bélgica, um gato que naturalmente infetado apresentou sinais clínicos da doença, posteriormente a análise genómica de um isolado revelou que o gato apresentava a mesma estirpe do isolado do seu dono, comprovando pela primeira vez a transmissão humano-animal (Hosie et al., 2021).

Tabela 1: Estudos realizados em ruminantes desde o início da pandemia COVID-19.

Espécie	Amostra	Metodologia	Local	Principais resultados:	Ano	Ref.
Veado de cauda branca	213 esfregaços nasais e tecido de 294 nódulos linfáticos.	RT-PCR.	Canadá	21 amostras, representando 6% (17/298)	2022	(Pickering et al. 2022)
Bovino e ovino	EVOCS) Swab respiratório, Soro, swab retal	Imunohistoquímica Western blotting Imunocitoquímica Imunofluorescência Sequenciação	Itália	sVNT-negativo.; tecidos respiratórios de bovinos e ovinos sustentam a replicação viral in vitro de ambos os isolados associado a SARS-CoV-2 . SARS-CoV-2 com aminoácidos no local 614 da proteína spike replicou-se em maior magnitude em tecidos.	2020	(Teodoro et al. 2021)
Bovino	1.000 amostras de soro ou plasma de bovinos	ELISA; sVNT	Alemanha	11 bovinos positi. para sars-cov-2 sVNT :4 positivos	2022	(Wernike et al. 2022)
Ovinos	90 amostras de soro de ovinos pré-pandêmico e 336 amostras de soro do período pandêmico	ELISA	Itália	Todas as amostras negativas	2021	(Villanueva-Saz et al. 2021)

Legendas: EVOCS: Culturas de órgãos ex vivo; sVNT-Testes de neutralização; RPLN-linfonodos retrofaríngeo

Tabela 1: Estudos realizados em ruminantes desde o início da pandemia COVID-19.

Espécie	Amostra	Metodologia	Local	Principais resultados:	Ano	Ref.
Veados de cauda branca	360 esfregaços nasais	RT-PCR	EUA	129/360 positivos	2021	(Hale et al., 2022)
Veados de cauda branca	23 amostras de esfregaços nasais	RT-qPCR,	EUA	20 positivo para SARS-CoV-2	2022	Marques et al., 2022)
Veados de cauda branca	283 amostras de linfonodos RPLN	RT-PCR Análise de sequência dos genomas	EUA	94/283 positivo para sars-cov-2 Análise do genoma: 2 linhagens do SARS-COV-2, B.1.2 e B.1.311, representando ~75% de todas as amostras	2022	(Kuchipudi et al. 2022)
Cabra ovelha bovino e camelo	Amostras de soro de 54 bovinos, 176 ovinos, 207 caprinos e 180 camelos dromedários	sVNT por redução de placa	Omã	6 animais, 1 ovelha, 1 gado e 1 camelo testaram positivos. em ambos os testes sVNT	2023	(Masry et al. 2023)
Ovino e caprino	612 amostras de soro ovinos e caprinos	ELISA; sVNT	Itália	23 foram considerados positivos no ELISA (3,75%) com título de anticorpos neutralizantes	2023	(Fusco et al. 2023)

Legendas: EVOCS: Culturas de órgãos ex vivo; sVNT-Testes de neutralização; RPLN-linfonodos retrofaríngeo

CAPÍTULO II – OBJETIVOS

OBJECTIVOS

O objetivo principal deste estudo é avaliar o possível contato com o vírus SARS-CoV-2 em pequenos ruminantes (ovinos e caprinos), de explorações de regiões do Nordeste transmontano, através de um rastreio serológico.

Como objetivos específicos:

- Realizar uma revisão abrangente da literatura científica relacionada à transmissão do SARS-CoV-2 entre seres humanos e animais de produção.
- Sintetizar e discutir os principais resultados e tendências observados nos estudos revistos identificando lacunas no conhecimento e possíveis áreas de investigação adicional.
- Análise serológica das amostras colhidas de pequenos ruminantes;
- Análise dos resultados, levando em consideração a implementação de controlos laboratoriais apropriados,
- Análise da associação entre os resultados da análise serológica e o período a que correspondem as colheitas onde foram observados testes sorológicos positivos.
- Determinar a prevalência de acordo com a metodologia apropriada a partir da sensibilidade e especificidade do método.
- Delinear futuras metodologias a serem aplicadas a diferentes espécies animais de forma a averiguar o fenómeno de “spillover” do SARS-CoV-2 entre animais e humanos numa abordagem “One Health”.

CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostra e desenho de estudo

Foi realizado um estudo exploratório retrospectivo, utilizando uma amostra não probabilística, em que foram selecionadas amostras de soro de pequenos ruminantes (caprinos e ovinos) por conveniência e divididas em partes iguais provenientes de 27 explorações do concelho de Bragança (Fig 3).

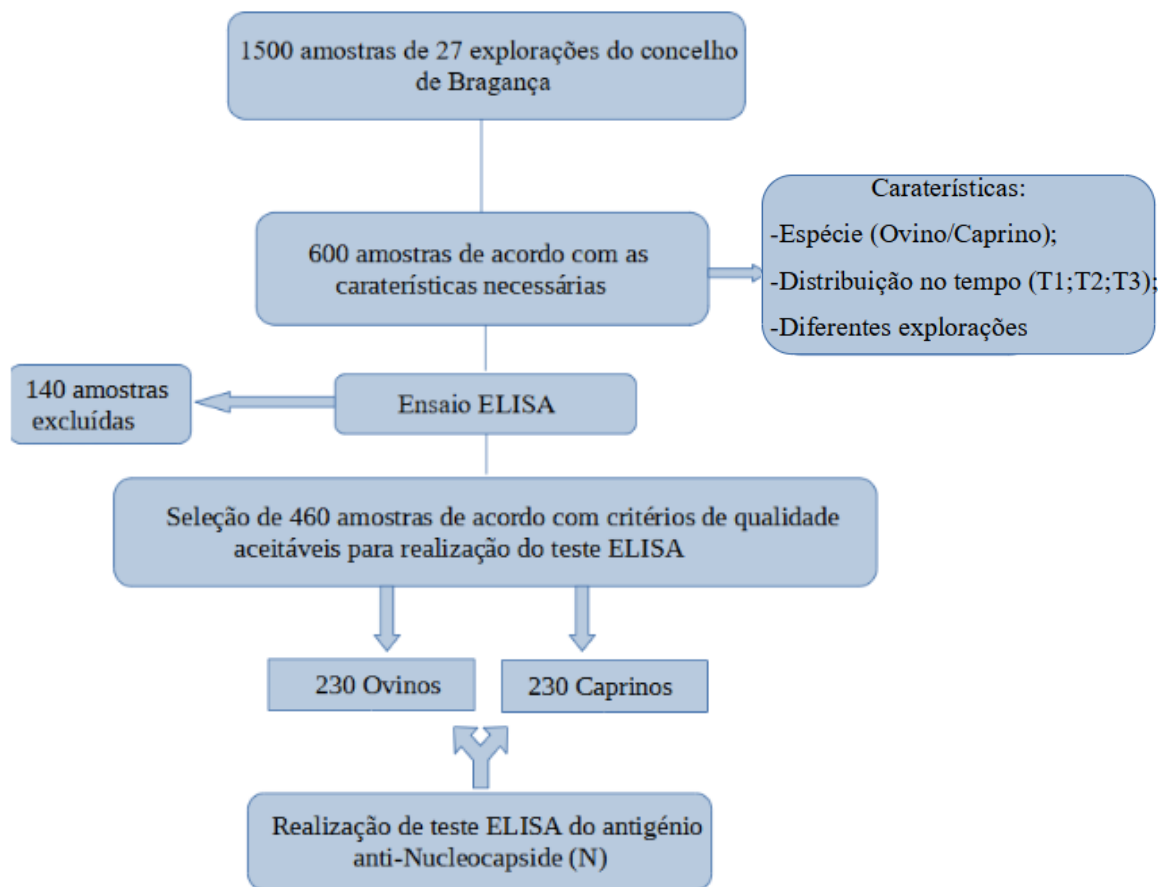


Figura 3. Desenho do Estudo com Fluxograma representando o processo de seleção e as metodologias utilizadas.

As amostras foram caracterizadas por fatores como espécie, subespécie, sexo, idade, exploração, localização da exploração, contato com outros ruminantes, ventilação adequada e intervalo de tempo T1(variante alfa), T2(variante delta) e T3(variante ómicron), cuja a seleção da amostra visou ter amostras representativas destas principais vagas (Fig.4).

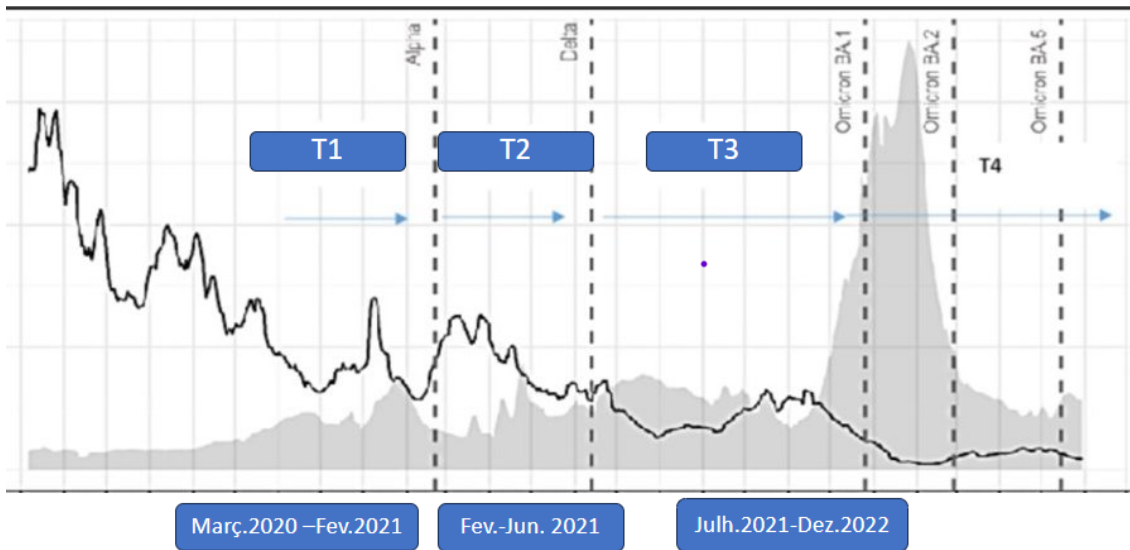


Fig.4: Gráfico com diferentes vagas da COVID 19 e a estirpe correspondente, adaptado ACSS: Administração Central do Sistema de Saúde

3.2. Procedimentos laboratoriais

Os procedimentos laboratoriais foram realizados no centro de Veterinário pedagógico da Escola Superior da Agrária do IPB no Laboratório de Biologia Molecular no Centro de Investigação de Montanha (CIMO).

3.2.1 –Colheita da amostra

Foi feita a colheita de sangue por meio de punção venosa jugular por profissionais e o número de amostras foi colhido consoante o efetivo da exploração e devidamente identificadas.

As amostras de sangue (10 mL) foram colhidas em cada animal por punção venosa jugular em tubos de 10 mL (Vacutainer®, Becton Dickinson, Plymouth, Reino Unido) com ativador de coágulo e deixadas coagular à temperatura ambiente. Sob o ponto de vista ético e de bem estar animal, de salientar que todas as amostras foram colhidas durante visitas técnicas de veterinários das organizações de produtores pecuários no âmbito dos planos nacionais de erradicação da brucelose, aproveitando-se o excedente de soro.

3.2.2 –Preparação e conservação da amostra

No laboratório, o soro foi obtido por centrifugação a 200 rpm por 10 min. Em seguida com uma micropipeta de 1000 µl o soro foi colocado em microplacas ELISA de poço fundo, sempre em duplicado e ultracongelamento das microplacas ELISA a temperatura de -80°C até serem processadas no laboratório no CIMO.

3.2.3 –Análise serológica

Todos os soros disponíveis colhidos nos referidos intervalos de tempo foram submetidos a exame sorológico ELISA utilizando o kit ID Screen SARS-CoV-2 Double Antigen Multi-Species ELISA (ID VET, Montpellier, França) de acordo com as instruções do fabricante.

O método é baseado na técnica semi quantitativa ELISA que se destina à detecção de anticorpos dirigidos contra nucleocápside do SARS-CoV-2 em soro e plasma animal *in vitro* automatizado, a fim de detetar a presença de IgG anti-SARS-CoV- 2 nucleocapsídeo (N). Os poços são revestidos com antigénio da proteína (N) purificado, com a adição da peroxidase de rábano (HRP) aos poços, este fixa-se ao Fab livre dos anticorpos séricos anti SARS-COV-2 ligados e ao colocar o substrato,este vai interagir com o HPR e desenvolver uma substância cromogénea amarela e indicar positividade das amostras. A amostra a ser testada e os controlos são adicionados aos poços e caso haja anticorpos anti SARS-COV-2 é formado um complexo anticorpo-antígeno.

Com uma micropipeta de 100 µl foram dispensados 25 µl de Tampão de Diluição na placa e adicionados 25 µl de soro animal, juntamente com controles negativo e positivo em suas devidas posições atribuídas na placa. Após uma incubação de 45 min a 37°C, retirou-se o excesso dos poços e com uma pipeta multicanal de 200 µl foram lavados 5 vezes utilizando 300 µl de solução de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 µl de conjugado de peroxidase de rábano silvestre com antígeno recombinante de proteína N purificado diluído, com concentração final de 1X, incubados por 30 min a 21 °C, descarregados e lavados 5 vezes conforme mencionado acima. Finalmente, após a adição de 100 µl de Solução Substrato, com incubação de 20 min a 21 °C no escuro, foram adicionados 100 µl de Solução Stop para interromper a reação. A microplaca foi lida a 450 nm do aparelho SPECTROstar® ^{Nano} da BMG LABTECH (Anexo I).

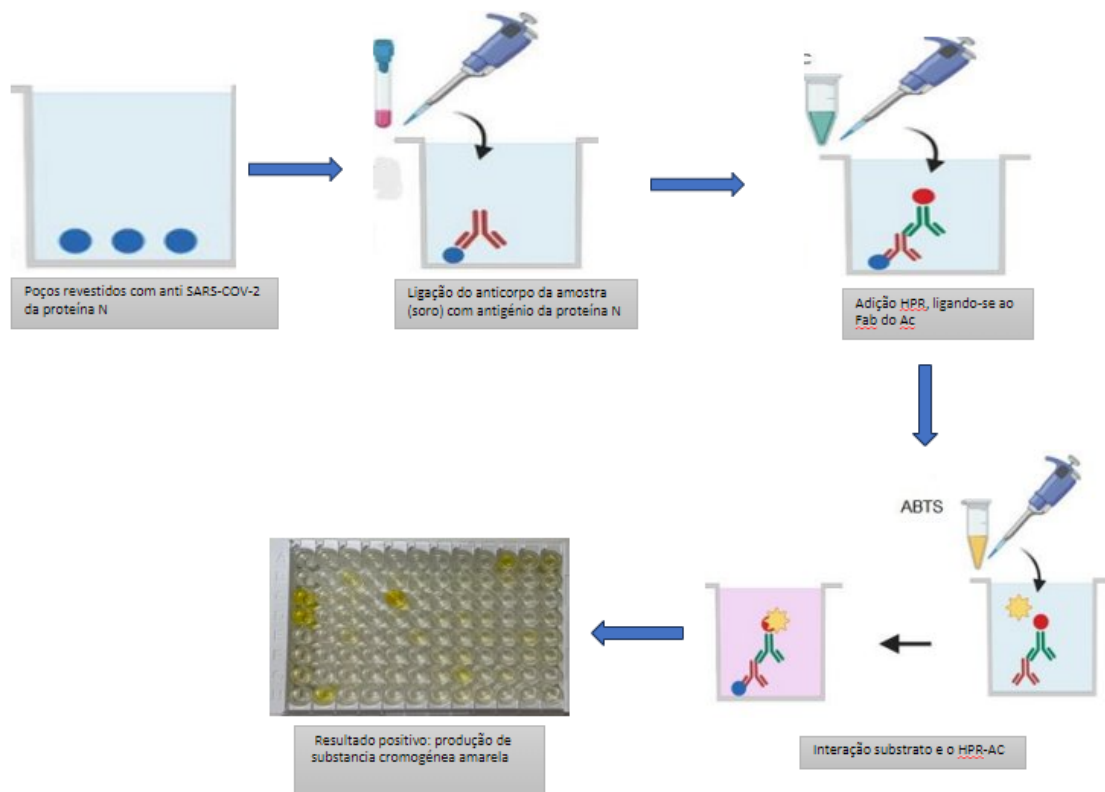


Fig.5: Método de detecção ELISA para anticorpos dirigidos contra nucleocápside do SARS-CoV-2

3.2.4 –Interpretação dos resultados

A presença de reatividade nos testes serológicos é definida por um ponto de corte estipulado pelo fabricante de acordo com a sensibilidade 98,31% (IC 95%: 90,91–99,96%) e especificidade 100,0% (IC 95%: 98,34–100,0%) do ensaio testada em animais. O teste foi considerado válido se o valor da densidade ótica (DO) do controle Positivo fosse 0,350 e a relação controle Positivo/Negativo fosse 3. Assim, seguindo as orientações da ficha técnica, as amostras que apresentavam S/P% 50% foram consideradas negativas, S/P% entre 50% e 60% foram consideradas duvidosas, enquanto amostras com S/P% 60% foram consideradas positivas.

3.3. Análise estatística

Foram avaliadas as características e distribuição dos animais recorrendo à estatística descritiva. A análise inferencial ficou condicionada dado o número reduzido de resultados positivos. Foi também determinada a prevalência pelo método Wilson: o número de resultados positivos nos testes e do número total de testes realizados. Este método calcula a prevalência a um nível de confiança de 95%, uma abordagem estatística para estimar a prevalência ao lidar com amostras de tamanho pequeno. Para determinar a Verdadeira Prevalência (TP) recorreu-se aos valores de sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) fornecidos na ficha técnica do Kit ELISA de Dupla Antigénio Multi-Espécies para SARS-CoV-2 da ID Screen.

Verdadeira Prevalência com a seguinte fórmula:

$$TP = (Prevalência \times Se) / [(Se \times Prevalência) + (1 - Sp) \times (1 - Prevalência)]$$

A sensibilidade (Se) é a proporção de resultados verdadeiramente positivos, e a especificidade (Sp) é a proporção de resultados verdadeiramente negativos com base no teste de diagnóstico. Todas as análises estatísticas foram o software online EpiTools.

3.4. Representação dos resultados no mapa

Através da plataforma MapChart foi representado as amostras soropositivos pelos diferentes concelhos de Bragança utilizando diferentes cores.

3.5. Considerações éticas

O estudo atendeu aos requisitos legais e éticos pertinentes de acordo com Decreto-Lei n.º 64/2000 de 22 de abril, alterado pelo Decreto-lei n.º 155/2008 de 7 de Agosto, estabelece as normas mínimas relativas à proteção dos animais nas explorações pecuárias, e define as responsabilidades do produtor quanto às condições dos alojamentos, equipamentos e necessidades desses animais, (DGAV – Direção-Geral Da Alimentação e Veterinária, n.d.).

CAPÍTULO IV – RESULTADOS

4.1 Caracterização da amostra ruminantes e localização das clínicas veterinárias e explorações.

Em 600 amostras analisadas, as 140 amostras foram excluídas porque estavam hemolisadas, sendo 460 cumpriram os critérios de qualidade aceitáveis para realização do teste ELISA (Tabela 2)

Tabela 2. Características da amostra de pequenos ruminantes analisada neste estudo.

Característica	Número (%)
Espécie	
Caprinos	230 (50.0)
Ovinos	230 (50.0)
Sexo	
Fêmea	434 (94.3)
Macho	26 (5.7)
Idade	
< 6 m	18 (3.9)
6 m - 2 a	152 (33.0)
> 2 anos	290 (63.1)
Concelho	
Bragança	122 (26.5)
Chaves	14 (3.0)
Miranda do Douro	65 (14.1)
Mirandela	17 (3.7)
Mogadouro	72 (15.7)
Vimioso	52 (11.3)
Torre de Moncorvo	54 (11.7)
Vinhais	64 (13.9)
Ventilação adequada	
Com	230 (50.0)
Sem	230 (50.0)
Contato*	
Sem	163 (35.4)
Com	297 (64.6)
Distribuição no tempo	
T1	34 (7.4)
T2	108 (23.5)
T3	318 (69.1)

4.2. Resultados da análise serológica

A análise serológica com o teste ELISA evidenciou a presença de oito amostras positivas neste estudo, que correspondem a 1.7% (IC 95%:0.0082-0.0344%) do total da amostra sendo todas fêmeas (cinco caprinos e três ovinos). Dos animais com teste positivo, a maior parte situam-se no intervalo de idades 6 m a 2 anos (33,0%) (tabela 3)

Tabela 3: Características dos pequenos ruminantes seropositivos

Espécie	Localização	Sexo	Idade	*Contato	Ventilação	Período de colheita
Caprino	Torre de Moncorvo	Fêmea	> 2 anos	Sem contacto	Bom arejamento	T1
Caprino	Bragança	Fêmea	> 2 anos	Sem contacto	Bom arejamento	T1
Caprino	Vinhais	Fêmea	6m - 2anos	Com contacto	Bom arejamento	T2
Caprino	Mogadouro	Fêmea	6m- 2anos	Com contacto	Sem arejamento	T3
Caprino	Mogadouro	Fêmea	> 2 anos	Sem contacto	Bom arejamento	T3
Ovino	Vimioso	Fêmea	6m - 2anos	Com contacto	Sem arejamento	T2
Ovino	Vimioso	Fêmea	6m - 2anos	Com contacto	Sem arejamento	T2
Ovino	Vinhais	Fêmea	6m - 2anos	Com contacto	Sem arejamento	T2

Legenda: *contato com outros ruminantes; T1(variante alfa); T2(variante delta); T3(variante omicron).

As amostras analisadas neste rastreio serológico são de explorações que se localizam nos diferentes concelhos do distrito de Bragança (Fig.4).

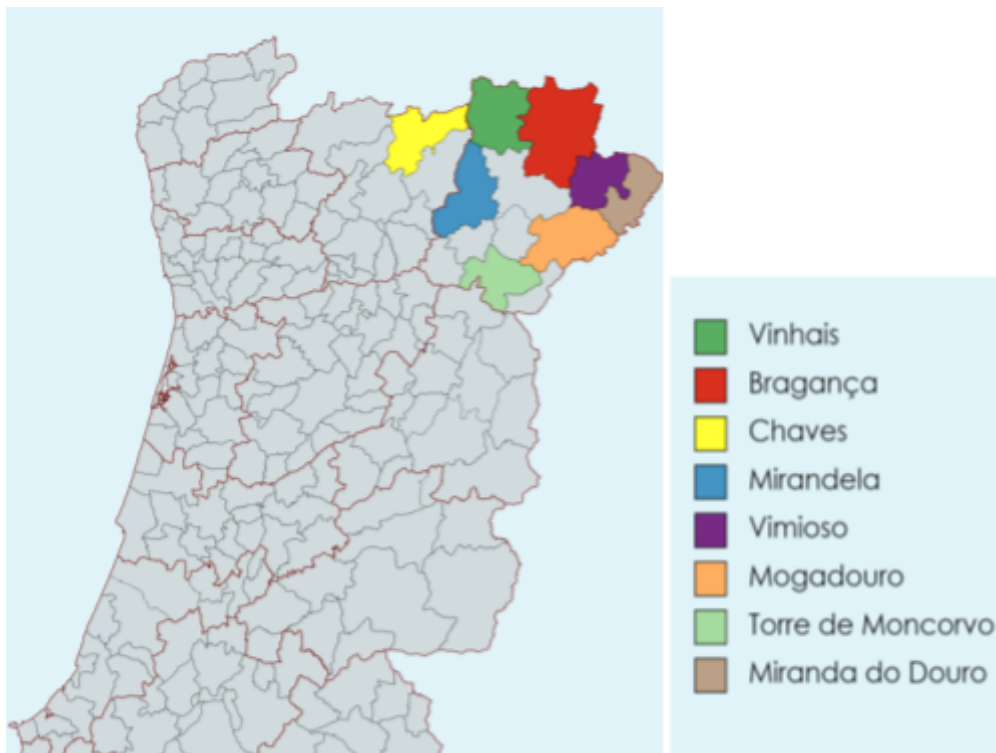


Fig.6: Mapa de Portugal com a representação dos concelhos de Bragança com as explorações do presente estudo.

As oito amostras positivas estão distribuídas por sete explorações, onde foram realizadas amostragens para rastreio sorológicos protocolados com a OPPs e com a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) da Região Norte no âmbito do plano de erradicação da brucelose onde as regiões que mais se observaram seropositivos foram Mogadouro, Vinhais e Vimioso, aos quais duas delas pertencentes á mesma exploração do concelho de Vimioso (Fig.5).

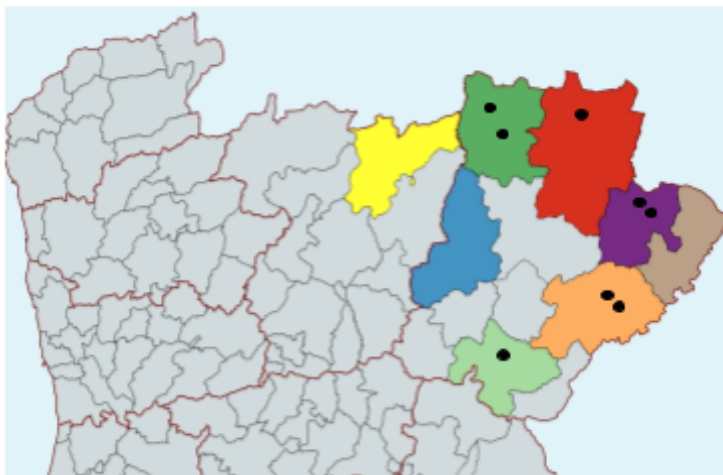


Fig.7: Representação dos concelhos com explorações que tem casos de pequenos ruminantes positivos o antigénio anti-N SARS-Cov-2.

4.3 Distribuição dos casos positivos no tempo

As oito amostras com resultados positivos para anticorpos IgGs anti-N foram colhidas em períodos diferentes, que correspondem a vagas com estirpes dominantes diferentes (alfa, delta e omicron). Duas das amostras positivas deste estudo, foram colhidas durante o período T1, quatro amostras positivas pertenciam ao grupo T2, enquanto que duas amostras positivas foram colhidas durante o período T3. A maior parte das amostras positivas corresponde ao período de infeção da variante delta (Fig.6).

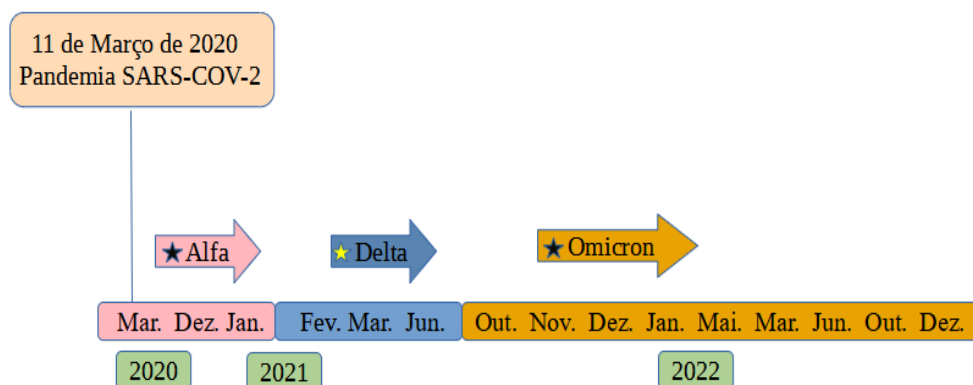


Fig.8:Representação da linha do tempo relativamente ao tempo das infeções por SARS-COV-2 segundo Serviço Nacional de Saúde (SNS)

4.4 Prevalência estimada pelo método de Wilson

Os valores da verdadeira prevalência são apresentados na (tabela 4) com os respectivos intervalos de confiança (IC95%).

Tabela 4: Verdadeira Prevalência de pequenos – ruminantes seropositivos para anticorpos

Grupo	Prevalência (%)	IC 95%
Caprinos (5)	0,0217	0,0086 – 0,0494
Ovinos (3)	0,013	0,0036 – 0,0382

anti-N

A Prevalência (%) indica a prevalência da condição em cada grupo e "IC 95%" fornece o intervalo de confiança de 95% para a prevalência, incluindo os valores mínimo e máximo do intervalo.

CAPÍTULO V – DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A vigilância serológica, quer em humanos, quer noutras espécies, desempenha um papel essencial no entendimento da epidemiologia e transmissão da infeção por SARS-CoV-2, fornecendo dados essenciais que auxiliam na identificação da disseminação do vírus em diferentes populações. (Alexandra & Cardoso, 2022). Permite ainda, rastrear possíveis reservatórios ou hospedeiros intermediários do vírus em espécies animais, o que é relevante para a saúde pública e a prevenção de futuras zoonoses, para além de permitir monitorizar a eficácia das medidas de controlo, como vacinação (*One Health-Uma Saúde*, n.d.)

Neste estudo, a realização do rastreio serológico em amostras armazenadas, colhidas durante períodos correspondentes a vagas anteriores de COVID-19, revestem-se de grande importância, uma vez que vai permitir pesquisar retrospectivamente, se estes animais de produção tiveram contato com as outras variantes do vírus mais prevalentes nesses períodos.

Transmissão SARS-CoV-2 em animais de produção

A maior parte da informação relativa a pequenos ruminantes, provém de infeções experimentais, onde foi demonstrado que os ovinos apresentam baixa suscetibilidade à infeção por SARS-CoV-2, e pelo contrário, foi verificada uma maior suscetibilidade em caprinos (Fusco et al. 2023). Apesar de existir expressão génica do gene ACE2 no trato respiratório de ovinos, foi descrita baixa suscetibilidade *in vivo* nesta espécie sugerindo pouco provável que seja um hospedeiro intermediário eficaz para a evolução do coronavírus (Fusco et al. 2023). Um outro estudo descreveu a baixa suscetibilidade *in vivo* de ovelhas, sugerindo que é improvável que esta espécie seja um hospedeiro intermediário eficaz para a evolução do coronavírus (Gaudreault et al., 2021). O fato de os caprinos serem mais suscetíveis foi, de certa forma, constatado neste presente realizado em que se verificou que o maior número de animais seropositivos identificados pertencem a esta espécie.

Contudo a análise do complexo da proteína S e ACE 2, devido a mutações específicas da espécie, bem como a afinidade químico-física devido a grupos

específicos, a afinidade de ligação energética da ACE2 de ovinos mostrou semelhança com a dos humanos, demonstrado que os ortólogos ACE2 de alguns pequenos ruminantes permitem a entrada do SARS-CoV-2 nas células, indicando que ovinos e caprinos podem igualmente abrigar e espalhar o vírus (Li et al., 2020). O mesmo se verificou num outro estudo, relativamente à proteína S in silicio, que evidenciou a suscetibilidade de ovelhas à infeção por SARS-CoV-2 (Li et al., 2020).

Resultados serológicos em pequenos ruminantes: o método utilizado

Os testes rRT-PCR, que detetam RNA viral e são atualmente os mais utilizados nos estudos de transmissão, são considerados como o padrão para o diagnóstico de COVID-19, indicam a infeção viral atual e são uma parte essencial do rastreio e teste de contactos (Trabucchi et al., 2022). Estes testes representam uma valiosa ferramenta de rastreio para pesquisar a exposição do vírus SARS-CoV-2 em diversas espécies animais (Fusco et al., 2023), uma vez que podem detetar eventuais contactos com o vírus que possam ter ocorrido há mais tempo (Trabucchi et al., 2022). Por outro lado, os ensaios sorológicos estão a ganhar importância, uma vez que podem ser utilizados por um longo período de tempo após a infeção. Os anticorpos normalmente podem ser detetados 2–3 semanas após a infeção e fornecem uma medição indireta da capacidade de resposta imunológica (Arun Krishnan et al., 2020; Sethuraman et al., 2020; Xu et al., 2020). Os testes de anticorpos requerem algum conhecimento das proteínas às quais o sistema imunológico responde, desencadeando a produção de anticorpos que sinalizam ou neutralizam o vírus. No caso do SARS-CoV-2, a proteína N e o domínio de ligação ao recetor (RBD) da subunidade S1 da glicoproteína S são os antígenos mais utilizados (Espejo et al., 2020). Estes métodos normalmente detetam IgM, e IgG ou anticorpos totais, sendo IgG a imunoglobulina mais comum medida em ensaios sorológicos para SARS-CoV-2 (Espejo et al., 2020).

Dos casos positivos detetados neste estudo, 4 são amostras que foram colhidas no período correspondente ao tempo T2, mais precisamente ao período em que a variante delta era a estirpe prevalente. Estudos realizados em humanos, sobre a cinética dos anticorpos anti-S e anti-N, mostram que estes anticorpos podem permanecer durante muito tempo no soro dos indivíduos que foram infetados (Dobaño et al., 2021; Gallais et al., 2021; Wang et al., 2021)

Os anticorpos anti-S podem ser detetáveis após um ano ou mais depois de uma infecção (Dobaño et al., 2021; Gallais et al., 2021; Wang et al., 2021). Permanecem na circulação sanguínea até surgir seronegatividade dos anticorpos anti-SARS-CoV-2, dependendo da classe de anticorpos e do alvo antigénico do teste, sendo que a classe IgG permanece positiva por um período mais longo do que a IgM e IgA (Zeng et al., 2021) e os anticorpos anti-S persistem por um período mais prolongado do que os anti-N (Chansaenroj et al., 2021; Lumley et al., 2021; Schulze-Wundling et al., 2023; Terpos et al., 2021). Assim, é difícil inferir sobre a estirpe que poderá ter desencadeado resposta no sistema imunitário nos animais seropositivos. No caso particular das 4 amostras colhidas no período T2, estas poderão corresponder a amostras de animais infetados com a primeira estirpe (alfa) ou com a estirpe delta. O mesmo acontece com as amostras positivas que foram colhidas em T3, em que qualquer uma das estirpes pode ter sido responsável pela infecção.

Limitações do estudo

Qualquer rastreio serológico à presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em animais reveste-se de grande importância, fornecendo dados à comunidade científica sobre a transmissão do vírus SARS-CoV-2. No entanto este estudo apresenta algumas limitações. Uma das principais limitações está relacionada com o facto de não ter sido possível a realização de testes que estavam inicialmente destinados para estas amostras, tais como os testes de neutralização e testes serológicos que visam a proteína Spike (específicos para as 3 variantes do vírus alfa, delta e omicron).

Como mencionado anteriormente, a pesquisas sobre a dinâmica dos anticorpos anti-Nucleocápside e anti-Spike em humanos indica que os anticorpos anti-N têm uma janela de deteção mais limitada em comparação com os anticorpos anti-S (Figueira, 2021). Dado que este estudo serológico se baseou apenas na análise da presença de anticorpos anti-N, existe a possibilidade de que mais animais tenham entrado em contacto com o vírus, mas esses anticorpos gerados pela infecção podem já não ser detetáveis pelo teste ELISA, apresentando-se como seronegativos. A análise serológica visando os anticorpos anti-S poderia proporcionar uma visão mais alargada do histórico de exposição porque apresentam uma cinética diferente dos anticorpos anti-N, permanecem mais tempo em circulação no soro.

Não podemos descartar a possibilidade de que algumas amostras classificadas como seropositivas para anti-N neste estudo, sejam resultados de uma reação cruzada de anticorpos devido à exposição destes animais a outras estirpes de coronavírus. Isto porque os coronavírus partilham algumas semelhanças nas suas proteínas e podem desencadear respostas cruzadas em testes serológicos. Nesse contexto, poderá ser necessário realizar uma análise adicional, como um teste de neutralização (Figueira, 2021; Wernike et al. 2022 De Donno et al., 2021). O teste de neutralização permitiria determinar se os anticorpos presentes nas amostras seropositivas têm a capacidade de neutralizar especificamente o SARS-CoV-2, eliminando a possibilidade de uma reação cruzada com outros coronavírus (Figueira, 2021; Wernike et al. 2022; De Donno et al., 2021). A realização de análises serológicas e/ou aplicação de inquéritos aos tratadores destes animais, permitir-nos-ia ter um ponto de partida para posteriores estudos no sentido de confirmar a transmissão entre espécies.

É também importante referir que não foi assegurada uma amostragem probabilística, que fosse representativa das explorações que existem no distrito, uma vez que se trata de amostras de conveniência, utilizadas para o despiste de outras zoonoses.

CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Desde o início da pandemia de COVID-19, as inúmeras mutações do SARS-CoV-2 ao longo do tempo levaram ao surgimento de novas linhagens e à descoberta de novas espécies animais suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2. Os resultados que se apresentam neste estudo, revestem-se de grande importância, no sentido em que contribuem para o nosso entendimento sobre a disseminação do vírus e seu impacto nas espécies de pequenos ruminantes.

As amostras selecionadas e armazenadas durante a implementação do estudo, podem ser submetidas a novas análises serológicas e moleculares, abrindo caminho para um estudo retrospectivo das variantes mais prevalentes em diferentes vagas da pandemia, possibilitando a avaliação da transmissão para estas espécies.

Inicialmente, nosso projeto tinha como objetivo seguir uma abordagem “One Health”. O rastreio envolveria também a análise dos tratadores dos animais e através da aplicação de questionários determinar se estão infetados ou já se foram contaminados.

As entidades de saúde europeias dão importância à estreita colaboração entre os setores de saúde animal e pública, bem como com as autoridades de segurança ocupacional e saúde, dentro de uma abordagem “One Health”. Essa colaboração é crucial para identificar eventos de transmissão na interface entre seres humanos e animais e para evitar a propagação contínua do vírus. A implementação deste estudo perspectiva uma abordagem nesse sentido.

Não há evidências de que os animais desempenhem um papel significativo na disseminação do SARS-CoV-2 para humanos. É importante lembrar que todos nós temos maior probabilidade de contrair a COVID-19 de outras pessoas do que de animais. No entanto, há a possibilidade de o vírus vir a infetar estas e outras espécies de animais, sofrer mutação e uma nova estirpe emergir e disseminar-se e voltar a infetar os humanos. Mais estudos e vigilância são necessários para rastrear variantes e mutações e compreender como o SARS-CoV-2 se dissemina entre pessoas e animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

Abdel-Moneim, A. S., & Abdelwhab, E. M. (2020). Evidence for SARS-COV-2 infection of animal hosts. *Pathogens*, 9(7), 1–27. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070529>

Administração Central do Sistema de Saúde (2023). | ACSS.

Amer, H. M. (2018). Bovine-like coronaviruses in domestic and wild ruminants. *Animal Health Research Reviews*, 19(2), 113–124

Albuquerque, L. P. de, Silva, R. B. da, & Araújo, R. M. S. de. (2020). COVID-19: origem, patogênese, transmissão, aspectos clínicos e atuais estratégias terapêuticas. *Revista Prevenção de Infecção e Saúde*, 6(86), 1–16.

Alexandra, S., & Cardoso, C. (2022). Interface de Transmissão de SARS-COV-2 de humanos para animais.

Almeida, J. O. de, Oliveira, V. R. T. de, Avelar, J. L. dos S., & Bruna Simões Moita, L. M. L. (2020). COVID-19: Fisiopatologia e Alvos para Intervenção Terapêutica. *Revista Virtual de Química*, 12(6), 1–34. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200000>

Arun Krishnan, R., Elizabeth Thomas, R., Sukumaran, A., Paul, J. K., & Vasudevan, D. M. (2020). COVID-19: Current Trends in Invitro Diagnostics. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 35(3), 285–289. <https://doi.org/10.1007/s12291-020-00906-5>

Bosco-Lauth, A. M., Walker, A., Guilbert, L., Porter, S., Hartwig, A., McVicker, E., Bielefeldt-Ohmann, H., & Bowen, R. A. (2021). Susceptibility of livestock to SARS-CoV-2 infection. In *Emerging Microbes and Infections* (Vol. 10, Issue 1, pp. 2199–2201). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.2003724>

- Brito, S. B. P., Braga, I. O., Moraes, M. M., Cunha, C. C., Leão, S. C., & Takenami, I. (2020). Immunopathological mechanisms involved in SARS-CoV-2 infection. In *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* (Vol. 56). Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20200056>
- Chandler, J. C., Bevins, S. N., Ellis, J. W., Linder, T. J., Tell, R. M., Jenkins-Moore, M., Root, J. J., Lenocho, J. B., Robbe-Austerman, S., DeLiberto, T. J., Gidlewski, T., Torchetti, M. K., & Shriner, S. A. (2021b). SARS-CoV-2 exposure in wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(47). <https://doi.org/10.1073/pnas.2114828118>
- Chansaenroj, J., Yorsaeng, R., Posuwan, N., Puenpa, J., Wanlapakorn, N., Sudhinaraset, N., Sripramote, M., Chalongviriyalert, P., Jirajariyavej, S., Kiatpanabhikul, P., Saiyarin, J., Soudon, C., Thienfaidee, O., Palakawong Na Ayuthaya, T., Brukesawan, C., Chirathaworn, C., Intharasongkroh, D., Chaiwanichsiri, D., Issarasongkhram, M., ... Poovorawan, Y. (2021). Long-term specific IgG response to SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in recovered COVID-19 patients. *Scientific Reports*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02659-4>
- Cortés, M. E. (2021). The COVID-19 pandemic: The importance of being alert to zoonoses. *Revista de La Facultad de Medicina Humana*, 21(1), 136–141. <https://doi.org/10.25176/rfmh.v21i1.3451>
- Decaro, N., Mari, V., Elia, G., Addie, D. D., Camero, M., Lucente, M. S., Martella, V., & Buonavoglia, C. (2010). Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 41–47. <https://doi.org/10.3201/eid1601.090726>
- De Donno, A., Lobreglio, G., Panico, A., Grassi, T., Bagordo, F., Bozzetti, M. P., Massari, S., Siculella, L., Damiano, F., Guerra, F., Greco, M., Chicone, M., Lazzari, R., & Alifano, P. (2021). IgM and IgG Profiles Reveal Peculiar Features

of Humoral Immunity Response to SARS-CoV-2 Infection. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), 1–16.

Dessie G, Malik T. Role of serine proteases and host cell receptors involved in proteolytic activation, entry of SARS-CoV-2 and its current therapeutic options. *Infect Drug Resist.* 2021;14:1883–92.

DGAV – Direção-Geral da Alimentação e Veterinária.

Di Teodoro, G., Valleriani, F., Puglia, I., Monaco, F., Di Pancrazio, C., Luciani, M., Krasteva, I., Petrini, A., Marcacci, M., D'Alterio, N., Curini, V., Iorio, M., Migliorati, G., Di Domenico, M., Morelli, D., Calistri, P., Savini, G., Decaro, N., Holmes, E. C., & Lorusso, A. (2021). SARS-CoV-2 replicates in respiratory ex vivo organ cultures of domestic ruminant species. *Veterinary Microbiology*, 252, 108933. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108933>

Dobaño, C., Ramírez-Morros, A., Alonso, S., Vidal-Alaball, J., Ruiz-Olalla, G., Vidal, M., Rubio, R., Cascant, E., Parras, D., Rodrigo Melero, N., Serra, P., Carolis, C., Santamaria, P., Forcada, A., Mendioroz, J., Aguilar, R., Moncunill, G., & Ruiz-Comellas, A. (2021). Persistence and baseline determinants of seropositivity and reinfection rates in health care workers up to 12.5 months after COVID-19. *BMC Medicine*, 19(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S12916-021-02032-2/TABLES/2>

El Masry, I., Al Makhlati, S., Al Abdwany, M., Al Subhi, A., Eltahir, H., Cheng, S., Peiris, M., Gardner, E., Von Dobschuetz, S., Soumare, B., Dhingra, M., Sumption, K., & Tibbo, M. (2023). Serological evidence of SARS-CoV-2 infection in dromedary camels and domestic bovids in Oman. *Emerging Microbes and Infections*, 12(1), 3–5. <https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2220577>

Emmanuel, H., Arturo, V., Raúl, O., & Teódulo, Q. (2023). Revisão: Infecção natural por SARS-CoV-2 em animais Review : SARS-CoV-2 natural infection in animals INTRODUÇÃO Em dezembro de 2019 , em Wuhan , província de Hubei , China ,

os primeiros casos de pacientes doentes com pneumonia de origem desconhecida for. 1–26.<http://dx.doi.org/10.21929/abavet2023.14>

Espejo, A. P., Akgun, Y., Al Mana, A. F., Tjendra, Y., Millan, N. C., Gomez-Fernandez, C., & Cray, C. (2020). Review of current advances in serologic testing for COVID-19. *American Journal of Clinical Pathology*, 154(3), 293–304. <https://doi.org/10.1093/AJCP/AQAA112>

Figueira, A. F. (2021). Avaliação do perfil clínico do soro persistência de anticorpos em trabalhadores de saúde durante a resposta a infecção por Avaliação do perfil clínico do soro persistência de anticorpos em trabalhadores de saúde durante a resposta a infecção por SARS-CoV-.

Fusco, G., Cardillo, L., Levante, M., Brandi, S., Picazio, G., Napoletano, M., Martucciello, A., Fiorito, F., De Carlo, E., & de Martinis, C. (2023). First serological evidence of SARS-CoV-2 natural infection in small ruminants: Brief report. *Veterinary Research Communications*, 47(3), 1741–1748. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-10044-3>

Gallais, F., Gantner, P., Bruel, T., Velay, A., Planas, D., Wendling, M. J., Bayer, S., Solis, M., Laugel, E., Reix, N., Schneider, A., Glady, L., Panaget, B., Collongues, N., Partisani, M., Lessinger, J. M., Fontanet, A., Rey, D., Hansmann, Y., ... Fafi-Kremer, S. (2021). Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. *EBioMedicine*, 71. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103561>

Gao, J., & Quan, L. (2020). Current status of diagnostic testing for SARS-CoV-2 infection and future developments: A review. *Medical Science Monitor*, 26. <https://doi.org/10.12659/MSM.928552>

Goraichuk, I. V., Arefiev, V., Stegnyy, B. T., & Gerilovych, A. P. (2020). *Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19*

resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . January.

Granados-Riveron, J. T., & Aquino-Jarquín, G. (2021). Engineering of the current nucleoside-modified mRNA-LNP vaccines against SARS-CoV-2. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 142). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111953>

Gaudreault, N. N., Cool, K., Trujillo, J. D., Morozov, I., Meekins, D. A., McDowell, C., Bold, D., Carossino, M., Balaraman, V., Mitzel, D., Kwon, T., Madden, D. W., Libanori Artiaga, B., Pogranichniy, R. M., Roman-Sosa, G., Wilson, W. C., Balasuriya, U. B. R., García-Sastre, A., & Richt, J. A. (n.d.). *Susceptibility of sheep to experimental co-infection with the ancestral lineage of SARS-CoV-2 and its alpha variant*. <https://doi.org/10.1101/2021.11.15.468720>

Grifoni, A., Weiskopf, D., Ramirez, S. I., Mateus, J., Dan, J. M., Moderbacher, C. R., Rawlings, S. A., Sutherland, A., Premkumar, L., Jadi, R. S., Marrama, D., de Silva, A. M., Frazier, A., Carlin, A. F., Greenbaum, J. A., Peters, B., Krammer, F., Smith, D. M., Crotty, S., & Sette, A. (2020). Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*, *181*(7), 1489-1501.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>

Halabowski, D., & Rzymiski, P. (2021). Taking a lesson from the COVID-19 pandemic: Preventing the future outbreaks of viral zoonoses through a multi-faceted approach. *Science of the Total Environment*, *757*, 143723. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143723>

Hale, V. L., Dennis, P. M., McBride, D. S., Nolting, J. M., Madden, C., Huey, D., Ehrlich, M., Grieser, J., Winston, J., Lombardi, D., Gibson, S., Saif, L., Killian, M. L., Lantz, K., Tell, M., Torchetti, M., Robbe-austerman, S., Nelson, M. I., Faith, S. A., & Bowman, A. S. (2022). SARS-CoV-2 infection in free-ranging white-tailed deer. *602*(7897), 481–486. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04353-x.SARS-CoV-2>

- Hidalgo, P., Valdés, M., & González, R. A. (2021). Molecular biology of coronaviruses: An overview of virus-host interactions and pathogenesis. In *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* (Vol. 78, Issue 1). <https://doi.org/10.24875/BMHIM.20000249>
- Hidayat fahrul, D. (2023). Desenvolvimento de Sensores amperométricos para detecção de imunoglobulinas contra a proteína nucleocapsídeo de SARS-CoV-2. 31–41.
- Hobbs, E. C., & Reid, T. J. (2021). Animals and SARS-CoV-2: Species susceptibility and viral transmission in experimental and natural conditions, and the potential implications for community transmission. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(4), 1850–1867. <https://doi.org/10.1111/tbed.13885>
- Hosie, M. J., Hofmann-Lehmann, R., Hartmann, K., Egberink, H., Truyen, U., Addie, D. D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Frymus, T., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Tasker, S., Thiry, E., & Möstl, K. (2021). Anthropogenic infection of cats during the 2020 covid-19 pandemic. *Viruses*, 13(2), 1–13. <https://doi.org/10.3390/v13020185>
- Jarrom, D., Elston, L., Washington, J., Prettyjohns, M., Cann, K., Myles, S., & Groves, P. (2022). Effectiveness of tests to detect the presence of SARS-CoV-2 virus, and antibodies to SARS-CoV-2, to inform COVID-19 diagnosis: A rapid systematic review. *BMJ Evidence-Based Medicine*, 27(1), 33–45. <https://doi.org/10.1136/bmjebm-2020-111511>
- Keyt, B. A., Baliga, R., Sinclair, A. M., Carroll, S. F., & Peterson, M. S. (2020). Structure, function, and therapeutic use of IgM antibodies. In *Antibodies* (Vol. 9, Issue 4, pp. 1–35). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antib9040053>
- Kreuty, L. C., Flores, E. F., Cargnelutti, J., Henzel, A., Anziliero, D., Brum, M. C. S., LIMA, M., Torres, F., Franco, D., Oliveira, S. A. M., & Silva, A. M. (2021). SARS-CoV-2/COVID/19 EM Animais de Companhia. *Ars Veterinaria*, 37(1).
- Kuchipudi, S. V., Surendran-Nair, M., Ruden, R. M., Yon, M., Nissly, R. H., Vandegrift, K. J., Nelli, R. K., Li, L., Jayarao, B. M., Maranas, C. D., Levine, N., Willgert, K., Conlan, A. J. K., Olsen, R. J., Davis, J. J., Musser, J. M., Hudson, P. J., & Kapur, V. (2022). Multiple spillovers from humans and onward transmission of SARS-CoV-2

- in white-tailed deer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(6), 1–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.2121644119>
- Li, Q., Wang, Y., Sun, Q., Knopf, J., Herrmann, M., Lin, L., Jiang, J., Shao, C., Li, P., He, X., Hua, F., Niu, Z., Ma, C., Zhu, Y., Ippolito, G., Piacentini, M., Estaquier, J., Melino, S., Weiss, F. D., ... Shi, Y. (2022). Immune response in COVID-19: what is next? *Cell Death and Differentiation*, 29(6), 1107–1122. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01015-x>
- Liu, R., Han, H., Liu, F., Lv, Z., Wu, K., Liu, Y., Feng, Y., & Zhu, C. (2020). Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clinica Chimica Acta*, 505, 172–175. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.009>
- Lumley, S. F., Wei, J., O'Donnell, D., Stoesser, N. E., Matthews, P. C., Howarth, A., Hatch, S. B., Marsden, B. D., Cox, S., James, T., Peck, L. J., Ritter, T. G., de Toledo, Z., Cornall, R. J., Jones, E. Y., Stuart, D. I., Screaton, G., Ebner, D., Hoosdally, S., ... Wright, S. (2021). The Duration, Dynamics, and Determinants of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Antibody Responses in Individual Healthcare Workers. *Clinical Infectious Diseases*, 73(3), e699–e709. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab004>
- Marques, A. D., Sherrill-Mix, S., Everett, J. K., Adhikari, H., Reddy, S., Ellis, J. C., Zeliff, H., Greening, S. S., Cannuscio, C. C., Strelau, K. M., Collman, R. G., Kelly, B. J., Rodino, K. G., Bushman, F. D., Gagne, R. B., & Anis, E. (2022). Multiple Introductions of SARS-CoV-2 Alpha and Delta Variants into White-Tailed Deer in Pennsylvania. *MBio*, 13(5), 1–12. <https://doi.org/10.1128/mbio.02101-22>
- Molinero, F. C. de A., Guimarães, F. P. da S., Goes, G. G. M., Costa, M. C. N., Araújo, P. C. de, Santiago, T. S. F., Pacheco, V. C. G., Oliveira, M. A. S. de, & Pereira, V. dos S. (2022). As Propriedades Da Fisiopatologia Da Covid-19 E Os Impactos No Sistema Cardiovascular. *Revista Multidisciplinar Em Saúde*, 3, 1–16. <https://doi.org/10.51161/rem/3589>

- Nielsen, S. S., Alvarez, J., Bicout, D. J., Calistri, P., Canali, E., Drewe, J. A., Garin-Bastuji, B., Gonzales Rojas, J. L., Gortázar, C., Herskin, M., Michel, V., Miranda Chueca, M. Á., Padalino, B., Pasquali, P., Roberts, H. C., Spooler, H., Velarde, A., Viltrop, A., Winckler, C., ... Ståhl, K. (2023). SARS-CoV-2 in animals: susceptibility of animal species, risk for animal and public health, monitoring, prevention and control. *EFSA Journal*, 21(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7822>
- Ochani, R. K., Asad, A., Yasmin, F., Shaikh, S., Khalid, H., Batra, S., Sohail, M. R., Mahmood, S. F., Ochani, R., Arshad, M. H., Kumar, A., & Surani, S. (2021). Covid-19 pandemic: From origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. In *Infezioni in Medicina* (Vol. 29, Issue 1).
- One Health-Uma Saúde.* (n.d.). <https://onehealth.icbas.up.pt/descricao-do-conceito-uma-saude-one-health/>
- Palermo, P. M., Orbegozo, J., Watts, D. M., & Morrill, J. C. (2022). SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies in White-Tailed Deer from Texas. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 22(1), 62–64. <https://doi.org/10.1089/vbz.2021.0094>
- Palmer, M. V., Martins, M., Falkenberg, S., Buckley, A., Caserta, L. C., Mitchell, P. K., Cassmann, E. D., Rollins, A., Zylich, N. C., Renshaw, R. W., Guarino, C., Wagner, B., Lager, K., & Diel, D. G. (2021). Susceptibility of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) to SARS-CoV-2. *Journal of Virology*, 95(11).
- Pickering, B., Lung, O., Maguire, F., Kruczkiewicz, P., Kotwa, J. D., Buchanan, T., Gagnier, M., Guthrie, J. L., Jardine, C. M., Marchand-Austin, A., Massé, A., McClinchey, H., Nirmalarajah, K., Aftanas, P., Blais-Savoie, J., Chee, H. Y., Chien, E., Yim, W., Banete, A., ... Bowman, J. (2022). Divergent SARS-CoV-2 variant emerges in white-tailed deer with deer-to-human transmission. *Nature Microbiology*, 7(12), 2011–2024. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01268-9>
- Rai, P., Kumar, B. K., Deekshit, V. K., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2021). Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19

infection. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 105, Issue 2)

Schulze-Wundling, K., Ottensmeyer, P. F., Meyer-Schlinkmann, K. M., Deckena, M., Krüger, S., Schlinkert, S., Budde, A., Münstermann, D., Töpfner, N., Petersmann, A., Nauck, M., Karch, A., Lange, B., Blaschke, S., Tiemann, C., & Streeck, H. (2023). Immunity Against SARS-CoV-2 in the German Population. *Deutsches Arzteblatt International*, 120(19), 337–344. <https://doi.org/10.3238/arztebl.m2023.0072>

Serviço Nacional de Saúde. (2023). | SNS24. *Serviço Nacional de Saúde*.

Sethuraman, N., Jeremiah, S. S., & Ryo, A. (2020). Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323(22), 2249–2251. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.8259>

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(7831), 776–778. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2334-5>

Sofia, C., & Galhano, M. (2021). *SARS-CoV-2 As evidências genéticas da sua origem Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas*.

Sousa, M. A. De. (2020). Origem e diagnóstico do SARS-CoV-2. 12.

Sharun, K., Dhama, K., Pawde, A. M., Gortázar, C., Tiwari, R., Bonilla-Aldana, D. K., Rodriguez-Morales, A. J., de la Fuente, J., Michalak, I., & Attia, Y. A. (2021). SARS-CoV-2 in animals: potential for unknown reservoir hosts and public health implications. *Veterinary Quarterly*, 41(1), 181–201. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1921311>

Shi, Y., Wang, Y., Shao, C., Huang, J., Gan, J., Huang, X., Bucci, E., Piacentini, M., Ippolito, G., & Melino, G. (2020). COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 27, Issue 5).

Terpos, E., Stellas, D., Rosati, M., Sergeantanis, T. N., Hu, X., Politou, M., Pappa, V., Ntanasis-Stathopoulos, I., Karaliota, S., Bear, J., Donohue, D., Pagoni, M., Grouzi,

- E., Korompoki, E., Pavlakis, G. N., Felber, B. K., & Dimopoulos, M. A. (2021). SARS-CoV-2 antibody kinetics eight months from COVID-19 onset: Persistence of spike antibodies but loss of neutralizing antibodies in 24% of convalescent plasma donors. *European Journal of Internal Medicine*, 89(April), 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2021.05.010>
- Trabucchi, A., Bombicino, S. S., Marfia, J. I., Sabljic, A. V., Iacono, R. F., Smith, I., McCallum, G. J., Targovnik, A. M., Wolman, F. J., Fingermann, M., Alonso, L. G., Miranda, M. V., & Valdez, S. N. (2022). Novel bridge multi-species ELISA for detection of SARS-CoV-2 antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 511(October). <https://doi.org/10.1016/j.jim.2022.113365>
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veerler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Wang, H., Li, X., Li, T., Zhang, S., Wang, L., Wu, X., & Liu, J. (n.d.). *The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2*. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03899-4/Published>
- Wang, H., Wiredja, D., Yang, L., Bulterys, P. L., Costales, C., Röltgen, K., Manalac, J., Yee, J., Zehnder, J., Shi, R. Z., Boyd, S. D., & Pinsky, B. A. (2021). Case-Control Study of Individuals with Discrepant Nucleocapsid and Spike Protein SARS-CoV-2 IgG Results. *Clinical Chemistry*, 67(7), 977–986. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab045>
- Wang, Z., Muecksch, F., Schaefer-Babajew, D., Finkin, S., Viant, C., Gaebler, C., Hoffmann, H. H., Barnes, C. O., Cipolla, M., Ramos, V., Oliveira, T. Y., Cho, A., Schmidt, F., Da Silva, J., Bednarski, E., Aguado, L., Yee, J., Daga, M., Turroja, M., ... Nussenzweig, M. C. (2021). Naturally enhanced neutralizing breadth against

SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature*, 595(7867), 426–431.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03696-9>

Wernike, K., Böttcher, J., Amelung, S., Albrecht, K., Gärtner, T., Donat, K., & Beer, M. (2022). Antibodies against SARS-CoV-2 Suggestive of Single Events of Spillover to Cattle, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 28(9), 1916–1918.
<https://doi.org/10.3201/eid2809.220125>

World Organisation for Animal Health. Events in Animal. COVID-19 - WOAHA - World Organisation for Animal Health. Accessed April 19, 2022. (n.d.).

Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2019). *Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation*. <https://www.science.org>

Xia, X. (2021). Domains and functions of spike protein in sars-cov-2 in the context of vaccine design. In *Viruses* (Vol. 13, Issue 1). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/v13010109>

Xu, X. W., Wu, X. X., Jiang, X. G., Xu, K. J., Ying, L. J., Ma, C. L., Li, S. B., Wang, H. Y., Zhang, S., Gao, H. N., Sheng, J. F., Cai, H. L., Qiu, Y. Q., & Li, L. J. (2020). Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus (SARS-Cov-2) outside of Wuhan, China: Retrospective case series. *The BMJ*, 368(January), 1–7. <https://doi.org/10.1136/bmj.m606>





Yüce, M., Filiztekin, E., & Özkaya, K. G. (2021). COVID-19 diagnosis —A review of current methods. *Biosensors & Bioelectronics*, 172, 112752.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2020.112752>





Zeng, F., Wu, M., Wang, J., Li, J., Hu, G., & Wang, L. (2021). Over 1-year duration and age difference of SARS-CoV-2 antibodies in convalescent COVID-19 patients. *Journal of Medical Virology*, 93(12), 6506–6511.
<https://doi.org/10.1002/jmv.27152>





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. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>





ANEXO

Anexo I





 		Microplaca: n°1		<table border="1"> <tr> <th colspan="2">Resultado</th> </tr> <tr> <td>Negativo</td> <td>≤50%</td> </tr> <tr> <td>Duvidoso</td> <td>entre 50% a 60%</td> </tr> <tr> <td>Positivo</td> <td>≥60%</td> </tr> </table>		Resultado		Negativo	≤50%	Duvidoso	entre 50% a 60%	Positivo	≥60%
Resultado													
Negativo	≤50%												
Duvidoso	entre 50% a 60%												
Positivo	≥60%												
Instituto Politécnico de Bragança - IPB		Espécie:  											
Data: 9/27/2023		T:92 51 41											
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CTR-	B1/5	B1/13	B1/21	B1/29	B1/37	B1/45	B1/53	B1/61	B1/69	B1/77	B1/85	
B	CTR-	B1/6	B1/14	B1/22	B1/30	B1/38	B1/46	B1/54	B1/62	B1/70	B1/78	B1/86	
C	CTR+	B1/7	B1/15	B1/23	B1/31	B1/39	B1/47	B1/55	B1/63	B1/71	B1/79	B1/87	
D	CTR+	B1/8	B1/16	B1/24	B1/32	B1/40	B1/48	B1/56	B1/64	B1/72	B1/80	B1/88	
E	B1/1	B1/9	B1/17	B1/25	B1/33	B1/41	B1/49	B1/57	B1/65	B1/73	B1/81	B1/89	
F	B1/2	B1/10	B1/18	B1/26	B1/34	B1/42	B1/50	B1/58	B1/66	B1/74	B1/82	B1/90	
G	B1/3	B1/11	B1/19	B1/27	B1/35	B1/43	B1/51	B1/59	B1/67	B1/75	B1/83	B1/91	
H	B1/4	B1/12	B1/20	B1/28	B1/36	B1/44	B1/52	B1/60	B1/68	B1/76	B1/84	B1/92	

 		Microplaca: n°2		<table border="1"> <tr> <th colspan="2">Resultado</th> </tr> <tr> <td>Negativo</td> <td>≤50%</td> </tr> <tr> <td>Duvidoso</td> <td>entre 50% a 60%</td> </tr> <tr> <td>Positivo</td> <td>≥60%</td> </tr> </table>		Resultado		Negativo	≤50%	Duvidoso	entre 50% a 60%	Positivo	≥60%
Resultado													
Negativo	≤50%												
Duvidoso	entre 50% a 60%												
Positivo	≥60%												
Instituto Politécnico de Bragança - IPB		Espécie:  											
Data: 9/28/2023		T:92 36 56											
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CTR-	B3/41	B3/49	B7/15	B7/23	B7/31	B7/39	B7/47	B7/55	B7/63	B7/71	B7/79	
B	CTR-	B3/42	B3/50	B7/16	B7/24	B7/32	B7/40	B7/48	B7/56	B7/64	B7/72	B9/32	
C	CTR+	B3/43	B3/51	B7/17	B7/25	B7/33	B7/41	B7/49	B7/57	B7/65	B7/73	B9/33	
D	CTR+	B3/44	B3/52	B7/18	B7/26	B7/34	B7/42	B7/50	B7/58	B7/66	B7/74	B9/34	
E	B3/37	B3/45	B3/53	B7/19	B7/27	B7/35	B7/43	B7/51	B7/59	B7/67	B7/75	B9/35	
F	B3/38	B3/46	B3/54	B7/20	B7/28	B7/36	B7/44	B7/52	B7/60	B7/68	B7/76	B9/36	
G	B3/39	B3/47	B3/55	B7/21	B7/29	B7/37	B7/45	B7/53	B7/61	B7/69	B7/77	B9/37	
H	B3/40	B3/48	B7/14	B7/22	B7/30	B7/38	B7/46	B7/54	B7/62	B7/70	B7/78	B9/38	

 		Microplaca: n°3		<table border="1"> <tr> <th colspan="2">Resultado</th> </tr> <tr> <td>Negativo</td> <td>≤50%</td> </tr> <tr> <td>Duvidoso</td> <td>entre 50% a 60%</td> </tr> <tr> <td>Positivo</td> <td>≥60%</td> </tr> </table>		Resultado		Negativo	≤50%	Duvidoso	entre 50% a 60%	Positivo	≥60%
Resultado													
Negativo	≤50%												
Duvidoso	entre 50% a 60%												
Positivo	≥60%												
Instituto Politécnico de Bragança - IPB		Espécie:  											
Data: 10/10/2023		T:92 68 24											
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CTR-	B9/43	B9/51	B9/59	B11/8	B11/16	B11/24	B11/32	B11/40	B11/48	B11/56	B11/64	
B	CTR-	B9/44	B9/52	B9/60	B11/9	B11/17	B11/25	B11/33	B11/41	B11/49	B11/57	B11/65	
C	CTR+	B9/45	B9/53	B9/61	B11/10	B11/18	B11/26	B11/34	B11/42	B11/50	B11/58	B11/66	
D	CTR+	B9/46	B9/54	B9/62	B11/11	B11/19	B11/27	B11/35	B11/43	B11/51	B11/59	B11/67	
E	B9/39	B9/47	B9/55	B9/63	B11/12	B11/20	B11/28	B11/36	B11/44	B11/52	B11/60	B11/68	
F	B9/40	B9/48	B9/56	B9/64	B11/13	B11/21	B11/29	B11/37	B11/45	B11/53	B11/61	B11/69	
G	B9/41	B9/49	B9/57	B11/7	B11/14	B11/22	B11/30	B11/38	B11/46	B11/54	B11/62	B11/70	
H	B9/42	B9/50	B9/58	B11/6	B11/15	B11/23	B11/31	B11/39	B11/47	B11/55	B11/63	B11/71	

 		Microplaca: n°4		Resultado									
Instituto Politécnico de Bragança - IPB		Espécie: Ovinos Caprinos		Negativo ≤ 50%									
Data: 10/11/2023		 		Duvidoso entre 50% a 60%									
		T:92 68 24		Positivo ≥ 60 %									
Posição		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CTR -	B13/21	B13/29	B13/37	B13/45	B13/53	B13/61	B13/69	B13/77	B13/85	B14/1	B14/9	
B	CTR -	B13/22	B13/30	B13/38	B13/46	B13/54	B13/62	B13/70	B13/78	B13/86	B14/2	B14/10	
C	CTR +	B13/23	B13/31	B13/39	B13/47	B13/55	B13/63	B13/71	B13/79	B13/87	B14/3	B14/11	
D	CTR +	B13/24	B13/32	B13/40	B13/48	B13/56	B13/64	B13/72	B13/80	B13/88	B14/4	B14/12	
E		B11/72	B13/25	B13/33	B13/41	B13/49	B13/57	B13/65	B13/73	B13/81	B13/89	B14/5	B14/13
F		B11/73	B13/26	B13/34	B13/42	B13/50	B13/58	B13/66	B13/74	B13/82	B13/90	B14/6	B14/14
G		B11/74	B13/27	B13/35	B13/43	B13/51	B13/59	B13/67	B13/75	B13/83	B13/91	B14/7	B14/15
H		B13/20	B13/28	B13/36	B13/44	B13/52	B13/60	B13/68	B13/76	B13/84	B13/92	B14/8	B14/16

Anotações: Tres amostras (B) positivas para anti-N SARS-CoV-2 (B13/50, B13/54 e B13/79 TEMPO II) 2 ovinos e 1 caprino

 		Microplaca: n°5		Resultado									
Instituto Politécnico de Bragança - IPB		Espécie: Ovinos Caprinos		Negativo ≤ 50%									
Data: 10/12/2023		 		Duvidoso entre 50% a 60%									
		T:92 8 84		Positivo ≥ 60 %									
Posição		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CTR -	B14/21	B17/9	B17/17	B17/25	B17/33	B17/41	B17/49	B18/62	B18/70	B18/78	B18/86	
B	CTR -	B14/22	B17/10	B17/18	B17/26	B17/34	B17/42	B17/50	B18/63	B18/71	B18/79	B18/87	
C	CTR +	B14/23	B17/11	B17/19	B17/27	B17/35	B17/43	B17/51	B18/64	B18/72	B18/80	B18/88	
D	CTR +	B14/24	B17/12	B17/20	B17/28	B17/36	B17/44	B17/52	B18/65	B18/73	B18/81	B18/89	
E		B14/17	B17/5	B17/13	B17/21	B17/29	B17/37	B17/45	B17/53	B18/66	B18/74	B18/82	B18/90
F		B14/18	B17/6	B17/14	B17/22	B17/30	B17/38	B17/46	B17/54	B18/67	B18/75	B18/83	B18/91
G		B14/19	B17/7	B17/15	B17/23	B17/31	B17/39	B17/47	B17/55	B18/68	B18/76	B18/84	B18/92
H		B14/20	B17/8	B17/16	B17/24	B17/32	B17/40	B17/48	B18/61	B18/69	B18/77	B18/85	B19/1