

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Prevalência de *Coronavírus* e *Rotavírus* em dípteros capturados em ambientes de ordenha
de vacas

Amanda Bezerra Bertolini
Relatório de Pós-doutorado
Supervisor: Prof. Titular Márcio Garcia Ribeiro

BOTUCATU, SP
Novembro de 2022

RESUMO

São conhecidas mais de 150.000 espécies de Diptera (Insecta), que são potenciais portadores de aproximadamente 200 espécies de vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos a humanos e animais. Essa natureza de transmissão vetorial provavelmente está relacionada à alta capacidade proliferação de mosca, hábitos alimentares, adaptação a diferentes biomas e acesso de Diptera a uma ampla variedade de ambientes contaminados. O coronavírus e o rotavírus são patógenos bem conhecidos relacionados a distúrbios entéricos e respiratórios em animais e humanos. Apesar do potencial dos dípteros como vetores de um conjunto de diferentes patógenos, poucos estudos têm investigado a presença de vírus relacionados a doenças animais e humanas veiculadas por esses insetos, capturados no ambiente de ordenha de bovinos. Neste cenário, foram capturados 217 espécimes de dípteros (24 espécimes em nove fazendas leiteiras distintas), submetidos a classificação entomológica, RT-PCRs hemi-nested para identificação de Rotavírus A-RVA (gene VP1) e coronavírus bovino-BCoV (gene N) e confirmação de espécies de vírus com base em sequenciamento. Onze famílias de Diptera foram identificadas entomologicamente, com predominância de Muscidae (152/217=70%). Entre 14,7% (32/217) e 4,6% (10/217) dos dípteros, RVA e BCoV foram detectados por hemi-nested RT-PCRs, respectivamente; enquanto 11,5% (25/2017) e 0,5% (1/217) tiveram confirmação de rotavírus A e BCoV por sequenciamento, respectivamente. Nossos achados destacam o papel dos dípteros como portadores de RVA e BCoV em insetos que habitam o ambiente da pecuária leiteira, devido à relevância animal e humana desses patógenos.

Palavras-chave: Doenças transmitidas por vetores, insetos voadores, bovino leiteiro, vírus zoonótico.

ABSTRACT

More than 150,000 species of Diptera (Insecta) are known, which are potential carriers of approximately 200 species of viruses, bacteria, fungi, protozoa, and helminths to humans and animals. This vector-borne nature probably is related to high fly ability, prolificity, feeding habits, adaptation to different biomes around the world, and access of Diptera to a wide variety of contaminated environments. Coronavírus and rotavirus are well-known pathogens related to enteric and respiratory disorders in animals and humans. Despite the potential of Diptera as a vector-borne set of different pathogens, a lack of studies has investigated the presence of viruses related to animal and human diseases carried by these insects, captured surrounding the milking environment of cattle. In this scenario, we captured 217 Diptera specimens (24 specimens in nine distinct dairy farms) and subjected all the insects to entomological classification, Hemi-nested RT-PCRs to Rotavirus A-RVA (*VP1* gene), and Bovine coronavirus-BCoV (*N* gene) identification, and confirmation of virus species based on sequencing. Eleven families of Diptera were entomologically identified, with a predominance of Muscidae (152/217=70%). Among 14.7% (32/217) and 4.6% (10/217) of Diptera, RVA and BCoV were detected by Hemi-nested RT-PCRs, respectively; whereas 11.5% (25/2017) and 0.5% (1/217) had confirmation of rotavirus A and BCoV by sequencing, respectively. Our findings highlight the role of Diptera as carriers of RVA and BCoV in insects that inhabit the environment of dairy cattle, due to the animal and human relevance of these pathogens.

Keywords: Vector-borne diseases, flying insects, dairy cows, zoonotic virus.

1. INTRODUÇÃO

Insetos da ordem Díptera pertencem ao filo Arthropoda e classe Insecta. São conhecidas mais de 150 mil espécies pertencentes a mais de 160 famílias, representando de 10 a 15% de toda a biodiversidade mundial. Porém, acredita-se que este número de espécies seja maior do que o conhecido até o momento (CARVALHO et al., 2012). No Brasil, são conhecidas 8.700 espécies, número provavelmente subestimado, devido a elevada riqueza de biomas incluindo áreas inexploradas do país, estimando-se que possa atingir 60.000 espécies (RAFAEL et al. 2009).

Devido a grande área geográfica e riqueza linguística, os dípteros recebem grande variedade de nomes populares, como moscas, mosquitos, mutucas, pernilongos entre outros. Caracterizam-se por apresentarem um par de asas funcionais e membranosas situadas no mesonoto, além de antenas, aparelho bucal picador-sugador ou lambedor, cerdas nas fossetas antenais (denominadas vibrissas). Apresentam metamorfose completa (holometábolos), passando pelas fases de ovo, larva, pupa, imago e adulto (FORTES ELINOR, 2004).

Os dípteros se caracterizam pela alta capacidade de voo, atingindo até 22 km de distância a partir do ponto de origem. Esta peculiaridade, aliada a alta prolificidade e acesso a ambientes contaminados por micro-organismos, caracteriza os dípteros como potenciais veiculadores de mais de 200 patógenos, como vírus, bactérias, fungos, protozoários e ovos de helmintos, associados a mais de 65 doenças em humanos e animais (LEVINE e LEVINE, 1991; NAZNI et al., 2005; CASTRO et al., 2008), incluindo enterite, dermatite, conjuntivite e infecções mamárias (BRAVERMAN et al., 1999; FÖRSTER et al., 2009; ALMEIDA et al., 2014). Estima-se que, uma única mosca é capaz de transportar mais de 32 milhões de bactérias na superfícies do seu corpo ou 200 oocistos de *Cryptosporidium parvum* (JACQUES et al, 2017).

Os dípteros se alimentam pelo menos duas a três vezes por dia. As fêmeas depositam ovos em material orgânico de qualquer origem animal ou vegetal, que também se constituem em locais de reprodução. A transmissão dos patógenos ocorre quando a mosca estabelece contato com pessoas, animais e alimentos. O contato dos humanos e animais geralmente é direto com as superfícies externas contaminadas dos dípteros ou os micro-organismos se

multiplicam no aparelho digestório e são expelidos pelo regurgitamento e defecação (SARWAR, 2015).

Nas fazendas destinadas a criação de vacas leiteiras, o esterco eliminado pelos animais constitui substrato adequado à proliferação de várias espécies de dípteros. O estrume produzido pelos animais é considerado fonte rentável de nutrientes para outras atividades agrícolas produzidas nas fazendas, mas podem servir de atrativo para os dípteros, que carregam grande quantidade de micro-organismos patogênicos relevantes para humanos e animais, incluindo: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., além de vírus como *Rotavírus* e *Coronavírus* bovino foram isolados a partir do estrume não tratado (ALEGBELEYE et al., 2018).

Os gêneros *Coronavírus* e *Rotavírus* têm a capacidade de causar doenças em humanos e animais, considerados vírus entéricos de relevância para a pecuária (ALFIERI et al., 2018). O coronavírus é conhecido amplamente por causar doenças entéricas e respiratórias em aves e mamíferos (BORUCKI et al., 2013). Representam grupo vasto e importante de grandes vírus de RNA que possuem mecanismos moleculares únicos de transcrição e recombinação, com potencial de causar epidemias emergentes de doenças humanas e animais (VLASOVA e SAIF., 2014 2021).

Os vírus RNA apresentam alta diversidade genética devido à baixa fidelidade de sua polimerase, genoma curto, altas taxas de replicação e grande tamanho populacional (ELENA et al 2006). Por esta razão, uma única população de vírus RNA pode resultar em elevada multiplicidade de genomas ligeiramente diferentes, por vezes denominados espectros mutantes (DOMINGO et al 2012). A alta taxa de mutação dos vírus RNA aumentam a capacidade desses vírus de se adaptar a diferentes hospedeiros (eventos de transmissão interespecíes) e o potencial de causar novas doenças zoonóticas (BORDERIA et al 2011.; VLASOVA e SAIF., 2014 2021).

Os coronavírus são particularmente hábeis em se adaptar a novos hospedeiros devido, em parte, à elevada capacidade de recombinação do genoma. Os coronavírus possuem o maior genoma de vírus de RNA, consistindo em RNA de fita simples de sentido positivo de 27 a 30 kb (BORUCKI Et al., 2013).

A família Coronaviridae, subfamília Coronavirinae, é composta por três gêneros baseados em características sorológicas e genéticas: Alfacoronavírus (anteriormente Grupo 1) inclui vírus que infectam suínos, cães, gatos e humanos; Betacoronavírus (anteriormente

Grupo 2) Agrupa vírus de bovinos, morcegos, humanos, cavalos, porcos, roedores e morcegos; e Gamacoronavírus (anteriormente Grupo 3) que consiste em vírus adaptados às aves (GONZALEZ et al 2003.; VIJGEN et al 2005). O coronavírus bovino (BCoV) é um betacoronavírus que está relacionado ao SARS-CoV causador de doenças em humanos, alguns pesquisadores inclusive consideram que tem sido negligenciado quanto sua capacidade de evolução como agente zoonótico (BORUCKI et al., 2013.; FRANZO et al., 2020.; ARENAS et al., 2021.; VLASOVA e SAIF., 2021).

Em bovinos, o coronavírus (BCoV) é reconhecido como causa de diarreia neonatal grave em bezerros (30% das diarreias neonatais), infecções do trato respiratório em bezerros e disenteria de inverno em bovinos adultos. A diarreia tem impacto negativo no bem-estar animal e causam perdas econômicas para a pecuária devido aos custos de tratamento e profilaxia, aumento da suscetibilidade a outras doenças, aumento da mortalidade e efeitos residuais de longo prazo, como taxas de crescimento reduzidas e produção de leite. A diarreia neonatal em bezerros é a principal causa de morte em novilhas não desmamadas (CASTELLS et al., 2019).

Os rotavírus são membros da família Reoviridae e representam a causa mais comum de diarreia em crianças menores de 5 anos de idade, sendo os responsáveis por 500 milhões de mortes anualmente no mundo, além de causar gastroenterite em ampla variedade de espécies animais, resultando em perdas econômicas significativas em animais de produção, incluindo particularmente suínos e bovinos (MIDGLEY et al 2012.; AHMED et al 2022). Os rotavírus são classificados em grupos (ou espécies) A–G, onde os grupos A–C podem infectar animais e humanos, enquanto os grupos D–G são detectados apenas em animais (DÓRÓ et al., 2015). Estudos conduzidos no Canadá com suínos e bovinos leiteiros enfatizou a necessidade de vigilância contínua em saúde pública para novas cepas de rotavírus em humanos e animais que poderiam afetar potencialmente a eficácia da vacina humana (LAMHOUEB et al., 2010). Relatos de casos de infecção em humanos revelaram a presença de segmentos de RNA derivados de bovinos, suínos, caninos ou felinos. As rotas potenciais de exposição humana podem incluir alimentos, água e contato com animais. Um método apropriado para avaliar o impacto potencial na saúde pública é identificar a importância comparativa das vias de transmissão relevantes e a avaliação de risco, como por exemplo a veiculação por dípteros. Embora a infecção pelo rotavírus seja responsável por infecções em humanos e animais em todo mundo, número restrito de estudos tem

investigado os dípteros como veiculadores de patógenos para animais e humanos (WILHELM et al 2015)

Estudo in vitro descreveu a possibilidade da *Musca domestica* como veiculador de *Coronavírus* de perus (CALIBEO-HAYES et al 2003). Como ainda mostraram *Coronavírus* e *Rotavírus* de animais permanecem viáveis na água e no esgoto por até um ano, dependendo das condições de temperatura e da umidade e em alface por até 15 dias (MULLIS et al., 2012.; AHMED et al 2022). Porém, não foram encontrados na literatura consultada estudos sobre a prevalência desses vírus em dípteros capturados próximo ao ambiente de ordenha de vacas.

Considerando a relevância de *Coronavírus* e *Rotavírus* no tocante a saúde animal e saúde pública além da importância do conhecimento das rotas de transmissão desses micro-organismos. Tendo em vista que os dípteros são conhecidos como veiculadores de patógenos, além dos ambientes de ordenha favorecerem a proliferação desses insetos que têm livre acesso ao ambiente dos animais e contato direto com matéria orgânica, o objetivo do estudo foi avaliar a prevalência de *Rotavírus* e *Coronavírus* nos dípteros capturados em ambientes de ordenha de vacas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar a prevalência de *Rotavírus* e *Coronavírus* em dípteros capturados em ambiente de ordenha de vacas.

2.2 Específicos

- ✓ Identificar as famílias e/ou espécies dos dípteros capturados;
- ✓ Identificar a prevalência de *Rotavírus* e *Coronavírus* nos dípteros capturados.
- ✓ Comparar a prevalência de *Rotavírus* e *Coronavírus* nos dípteros capturados e a classificação entomológica dos insetos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brasil (protocolo número 0136/2017).

3.1 Tamanho da amostra

Devido à ausência na literatura consultada da ocorrência de rotavirus e coronavírus em dípteros capturados no ambiente de ordenha de vacas, a estimativa do tamanho amostral foi baseada na prevalência de *E. coli*, bactéria mais frequentemente identificada em dípteros próximos a sala de ordenha de vacas (Alves e outros, 2018). Foi utilizada a prevalência de isolamento de *E. coli* de 17% (Nazni et al., 2005; Castro et al., 2013; Almeida et al., 2014) com margem de erro de 5% e intervalo de confiança de 95%. Portanto, foi estabelecido tamanho amostral mínimo de 217 dípteros para a proposta do presente estudo. O tamanho da amostra foi calculado usando o programa Open Epi (https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm) (Dean et al, 2013).

3.2 Fazendas

Foram utilizadas nove propriedades leiteiras, sendo seis localizadas na região sul do estado de Minas Gerais (A, B, C, F, G, I) e três na região sudoeste do estado de São Paulo (D, E, H) Brasil, onde a indústria de laticínios é comum (Figura 1). Os bovinos eram de fazendas de médio porte (aqui definidas como propriedades agrícolas entre 20-200 hectares). Todos os animais foram criados em condições similares de alimentação, facilidades de manejo, titulação técnica e condições sanitárias, inclusive vacinas obrigatórias. O clima das fazendas amostradas é caracterizado por temperaturas tropicais. A figura 1 mostra a distribuição geográfica das fazendas onde os dípteros foram capturados.

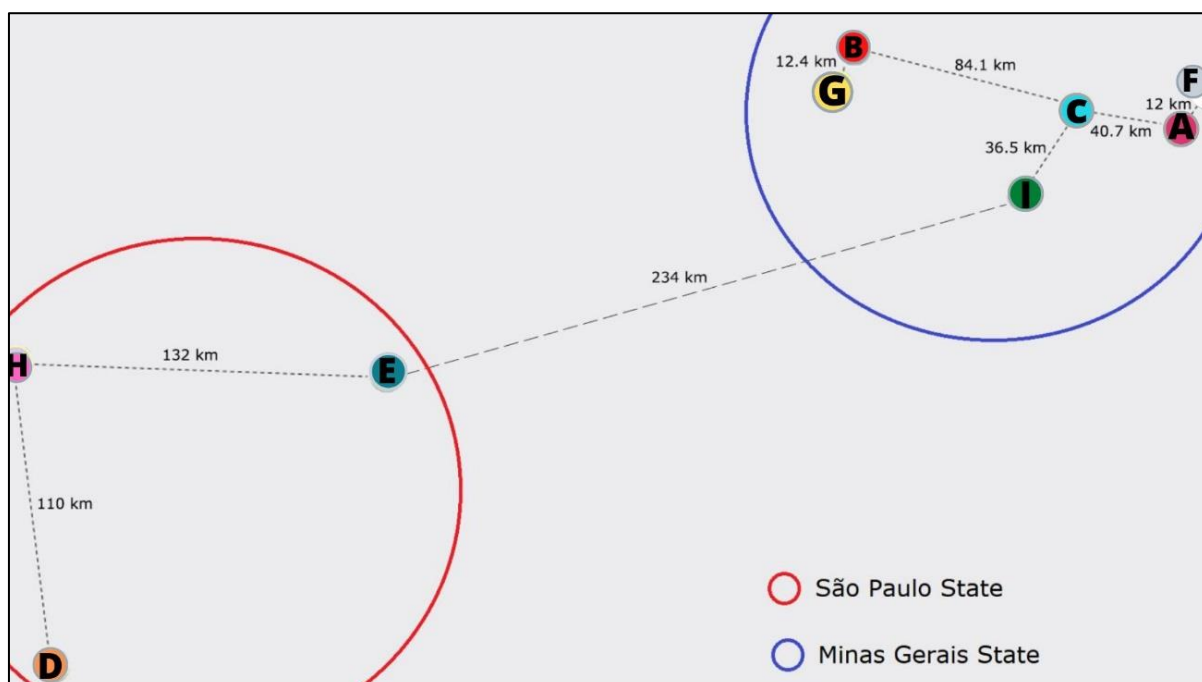


Fig. 1 Pontos de coleta de moscas onde cada marcador representa uma fazenda e as distâncias entre elas. Observe que no círculo vermelho as fazendas estão localizadas no estado de São Paulo, enquanto no azul no estado de Minas Gerais, Brasil.

3.3 Coleta e identificação de insetos

Os insetos foram coletados entre abril de 2019 e janeiro de 2020 no ambiente de ordenha (sala de ordenha e arredores, em um perímetro máximo de 200 metros) de nove fazendas, preferencialmente nos locais mais próximos às vacas. As coletas foram realizadas com rede entomológica previamente desinfetada com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 10% por 30 minutos antes da visita às propriedades. Entre cada coleta, uma solução de álcool etílico 70% foi borrifada na rede entomológica para evitar a contaminação cruzada. Os espécimes foram armazenados individualmente em tubos Falcon, transportados em temperatura de refrigeração (4 a 8°C) em caixas isotérmicas e armazenadas a -80°C em laboratório (Alves et al, 2018). Para atingir a amostragem proposta, foram capturados 24 espécimes em cada fazenda, exceto em uma fazenda onde foram capturados 25 espécimes.

Durante o processo de identificação, os espécimes foram manipulados com pinças em placas de Petri previamente esterilizadas para exame final em estereomicroscópio. Chaves dicotômicas foram utilizadas para identificação tanto em nível de Ordem quanto para

família e espécie (Almeida e Mise, 2009; Carvalho e Ribeiro, 2000; Carvalho et al, 2002; Rafael et al, 2012).

3.4 Identificação de rotavírus e coronavírus

Moscas individuais foram submetidas ao diagnóstico de Rotavírus A (RVA) e coronavírus bovino (BCoV) usando RT-PCRs hemi-nested para os genes VP1 e N, respectivamente, conforme descrito por Asano et al. (2010) com Transcriptase Reversa M-MLV (LifeTechnologies) e GoTaq® DNA Polymerase (Promega) após extração total de RNA com PureLink™ RNA Mini Kit (LifeTechnologies) de acordo com as instruções do fabricante. A cepa BCoV Kakegawa e a cepa RVA NCDV foram usadas como controles positivos, respectivamente, enquanto a água ultrapura foi usada como controle negativo. Amplicons (228bp para RVA e 306bp para BCoV) foram purificados com ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent e sequenciados bidirecionalmente com BigDye 3.1 e um ABI 3500 Genetic Analyzer, todos da LifeTechnologies. As sequências de consenso foram montadas com o Bioedit 7.2.5 (Hall, 1999) e submetidas ao Blastn para confirmação de identificação em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. As sequências foram depositadas no GenBank sob os números de acesso OP375538-OP375563.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mais de 157.000 espécies de Diptera (Arthropoda, Insecta) são conhecidas mundialmente (Courtney et al, 2017). No Brasil, são conhecidas 8.700 espécies, número provavelmente subestimado, devido à elevada riqueza de biomas, incluindo áreas inexploradas do país, estimando-se que possam atingir 60.000 espécies (Rafael et al. 2009). Neste estudo, foi identificada uma variedade de famílias e espécies de Diptera, capturadas em ambiente de ordenha de bovinos no Brasil, achado que reforça a diversidade de Diptera ao redor do mundo (Courtney et al, 2017), inclusive em áreas de fazendas.

Dos 217 inseto espécimes coletados, 215 pertencem a ordem Diptera, enquanto dois pertencem a ordem Hymenoptera, família Apidae. Onze famílias de Diptera foram identificadas, com predominância de Muscidae ($N=152/215=70\%$). Este resultado pode ser atribuído à proximidade de algumas espécies com comportamento hematófago em relação aos animais domésticos, ou cujo hábito é coprófago na busca de matéria orgânica,

principalmente fezes e esterco (Rafael et al, 2009). Outros dípteros capturados foram Tachinidae (N=23;10,6%), Drosophilidae (N=11; 15%), Sphaeroceridae (N=9; 4,1%), Sepsidae (N=4; 1,8%), Ulidiidae (N=4; 1,8%), Syrphidae (N=4; 1,8%), Chloropidae (N=4; 1,8%), Calliphoridae (N=2; 0,9%), Sarcophagidae (N=1; 0,5%) e Piophilidae (N= 1; 0,5%), o que mostra a variedade de Diptera que pode ser encontrada no entorno de fazendas leiteiras.

Entre os espécimes que foram identificados em nível de espécie ou gênero como Muscidae, *Musca domestica* (N= 126; 83% do total de Diptera) foi o mais frequente, seguido por *Atherigona orientalis* (N= 8; 5,2%), *Brontaea* spp. (N= 8; 5,2%), *Stomoxys calcitrans* (N= 5; 3,3%), *Muscina stabulans* (N= 2; 1,3%) e *hematobia irritans* (N= 1; 0,6%); seguidos de Sepsidae (N= 4; 1,8%), *Euxesta* spp. (N= 4; 1,8%); Sarcophagidae (N= 1; 0,5%) e *Microcerella halli* (N= 1; 0,5%). *Musca domestica* foi a espécie predominante identificada entre as propriedades leiteiras amostradas. Esse achado é consistente com estudos semelhantes que também descreveram a predominância dessa mosca em ambientes leiteiros (Almeida et al, 2014; Arsenopoulos et al, 2018), provavelmente devido à sua alta natureza sinantrópica em comparação com outras espécies de dípteros (Castro et al, 2008), e devido aos hábitos alimentares e de consumo de matéria orgânica e alto potencial biótico e sua característica de sinantropismo (Rafael et al. 2009).

Apesar da grande diversidade de díptera descritos mundialmente (Courtney e outros, 2017), apenas oito gêneros/espécies de Díptera e uma espécie não-Díptera pertencentes a 11 famílias foram entomologicamente classificadas no presente estudo. Esse resultado pode ser atribuído à alta complexidade das características anatômicas necessárias para a classificação desses insetos (Carvalho et al, 2002; Rafael et al, 2012), bem como à falta de reconhecimento de vários gêneros/espécies.

Espécies de dípteros são conhecidas por sua alta capacidade de voo e proliferação, adaptação a hábitos alimentares e diferentes biomas, e acesso a uma grande variedade de ambientes contaminados. Essas características podem favorecer o comportamento de

carreamento e transmissão de patógenos de origem bacteriana, parasitária, viral ou ovos de parasitas, que são capazes de infectar animais domésticos e humanos (Nazni et al, 2005; Bertolini et al., 2022).

Todos os 217 dípteros foram admitidos a PCR de rotavírus de coronavírus e as amostras positivas foram selecionadas ao sequenciamento genético. Entre 14,7% (32/217) e 4,6% (10/217) dos dípteros, rotavírus A e betacoronavírus foram detectados por hemi-nested RT-PCRs, respectivamente; enquanto 11,5% (25/2017) e 0,5% (1/217) tiveram confirmação de RVA e BCoV com base no sequenciamento, respectivamente (Tabela 1). Apenas as fazendas “F” e “G” não apresentaram Dípteros carreadores dos dois gêneros pesquisados, enquanto os demais tiveram insetos com PCR-positivo e/ou sequenciamento confirmado para rotavírus ou coronavírus.

Os rotavírus são membros da família Reoviridae que abrigam 11 segmentos gênicos de RNA de fita dupla. Está relacionado a doenças entéricas em gado, animais de companhia e animais selvagens, e esse patógeno é considerado a principal causa de mortalidade neonatal de crianças (Lamhoujeb et al., 2010; Midgley et al 2012; Ahmed et al 2022). O rotavírus é subdividido em grupos A-G, que mostraram diferenças na suscetibilidade de infecções humanas e animais (Midgley et al. 2012).

Dos dípteros capturados no presente estudo 15% foram identificados como carreadores de rotavírus pela PCR, dos quais a maioria dos espécimes coletados eram originários das fazendas “E” 5,5% (12/217) e da fazenda “I” 5,9% (13/217) (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de Rotavírus e Coronavírus identificados por *PCR e sequenciamento de DNA em dípteros capturados no ambiente de ordem de férias, Brasil 2019-2022

Fazenda	Família Díptero	Espécie de Díptero	PCR positivo RVA	RVA confirmado sequenciamento	PCR positivo para BCoV	BCoV confirmado por sequenciamento
A	Muscidae	<i>Musca domestica</i>	1/24 (4%)	1/24 (4%)	3/24 (12%)	1/24 (4%)
B	Muscidae	<i>Musca domestica</i>	--	--	1/24 (4%)	--
	Muscidae	<i>Atherigona orientalis</i>	--	--	1/24 (4%)	--
	Tachinidae	--	--	--	5/24 (21%)	--
C	Muscidae	<i>Musca domestica</i>	1/24 (4%)	--	--	--
	Muscidae	<i>Brontaea normata</i>	3/24 (12,5%)	1/24 (4%)	--	--
D	Sarcophagidae	<i>Microcerella halli</i>	1/24 (4%)	--	--	--
E	Muscidae	<i>Musca domestica</i>	12/24 (50%)	11/24 (46%)	--	--
H	Muscidae	<i>Musca domestica</i>	1/24 (4%)	--	--	--
I	Muscidae	<i>Musca domestica</i>	12/24 (50%)	12/24 (50%)	--	--
	Drosophilidae		1/24 (4%)	--	--	--
Total de positivos/ N total de espécimes de dípteros 217 (%)			32/217 (14,7%)	25/217 (11,5%)	10/217 (4,6%)	1/217 (0,5%)

*Polymerase Chain Reaction

N = número de espécimes de Dípteros

Fazendas F e G não tiveram amostras positivas para *Rotavírus* ou *Coronavirus*.

RVA= *ROTAVIRUS A*

BCoV= *Betacoron*

A maior prevalência de rotavírus se comparada ao coronavírus no presente estudo poderia estar relacionada a alta resistência do rotavírus em ambientes de água e solo, inclusive em fazendas leiteiras (Midgley et al 2012; Ahmed et al 2022), que poderia ser creditada a ausência do envelope, que confere maior resistência ao coronavírus em condições ambientais e aos desinfetantes comuns (Geletu et al., 2021).

Os rotavírus são classificados nos grupos A–G, dos quais os grupos A–C podem infectar animais e humanos, enquanto os grupos D–G são relacionados principalmente à hospitalidade em animais (DÓRÓ et al., 2015). Baseado no sequenciamento genético, 11,5% (25/217) dos Dípteros capturados foram confirmados como Rotavirus A. Tal resultado apresenta presença de vírus de importância em saúde animal e humana, posto que rotavírus do grupo A são causas frequentes de infecções entéricas e respiratórias em bovinos

(Lamhoujeb e outros, 2010), bem como podem infectar os humanos, fato preocupante em fazendas de leite, devido a possibilidade de contato com os ordenhadores no ambiente de ordenha (Midgley et al., 2012).

Um estudo *in vitro* relatou a capacidade de *Musca domestica* transportar rotavírus nas pernas e asas (Tan et al., 1997). No entanto, até onde sabemos, Diptera capturados no ambiente de ordenha de fazendas leiteiras, onde a detecção de rotavírus foi avaliada por sequenciamento é descrito pela primeira vez.

RVA mostra grande diversidade genética, e estudos revelam que cepas humanas desenvolveram características genéticas e antigênicas comuns com isolados de origem animal, incluindo suínos, bovinos, cães e felinos (Lamhoujeb et al., 2010; Wilhelm et al 2015) e animais selvagens (Martella et al., 2010). Estes medicamentos sugerem que as interespecies transmitidas podem se constituir no mecanismo de evolução do rotavírus, esperançosamente para a diversidade de cepas de RVA que infectam os humanos (Dóro et al., 2015), bem como poderiam limitar a eficácia da vacina utilizada na profilaxia da rotavirose em humanos (Lamhoujeb et al., 2010).

Os potenciais vias de exposição humana ao rotavírus podem incluir desde alimentação e água, bem como contato direto com gado, animais de companhia, vida selvagem e seu ambiente (Wilhelm et al 2015). Nesse contexto, estudos voltados para a presença de moscas, mutucas e mosquitos no ambiente comum de animais e humanos poderiam contribuir para o impacto desses insetos como vetores de patógenos zoonóticos, incluindo os dípteros que habitam o ambiente de fazendas leiteiras.

Os coronavírus são um grupo complexo de vírus de RNA de sentido positivo envelopados, relacionados principalmente a infecções do trato entérico e respiratório em animais domésticos (Borucki et al., 2013). O BCoV causa diarreia neonatal grave e infecções do trato respiratório em bezerros, e enterite em bovinos adultos, com altas taxas de letalidade e perdas significativas nas fazendas (Castells et al., 2019).

Com base na técnica de PCR, 4,6% dos dípteros das fazendas leiteiras A e B tinham insetos portadores de coronavírus, enquanto apenas 0,5% foram confirmados como BCoV usando o método de sequenciamento (Tabela 1). Ao contrário do rotavírus investigado no

presente estudo, o coronavírus é um vírus envelopado, o que reduz a resistência ambiental e contra desinfetantes comuns (Desselberger., 2014; Vlasova e Saif., 2014 2021). Assim, a presença do envelope pode ter influenciado na baixa frequência de recuperação desse patógeno entre os dípteros estudados. Além disso, além do coronavírus infectar bovinos de todas as idades, a doença é mais frequente entre bezerros de até 30 dias de idade (Alfieri et al., 2018) devido à alta eliminação fecal do patógeno nas fezes (Gomez et al., 2017), fato que também pode ter influenciado uma menor ocorrência desse patógeno em insetos capturados em ambiente de ordenha de vacas.

Estudo in vitro descreveu que *Musca domestica* pode atuar como portador mecânico do coronavírus de peru (Tan et al., 1997). No entanto, o presente estudo descreveu pela primeira vez a presença de coronavírus em Dípteras capturados em ambiente de ordenha de bovinos.

O impacto zoonótico das infecções por betacoronavírus não permanece totalmente compreendido (Vlasova e Saif, 2014 2021), embora o BCoV esteja intimamente relacionado ao SARS-CoV-2, o agente causal dos coronavírus pandêmicos humanos emergentes em todo o mundo (Borucki et al., 2013.; Franzo et al., 2020.; Arenas et al., 2021.; Vlasova e Saif., 2021). No presente estudo, o diagnóstico de BCoV foi confirmado por sequenciamento em apenas um díptero (0,5%). A transmissão interespecie de betacoronavírus parece ser possível, mesmo entre entes geneticamente distintos, como bovinos e humanos (Vlasova e Saif, 2013). A esse respeito, um estudo realizado com 156 *Musca domestica* capturado em dois hospitais que atendem pacientes humanos com COVID-19, revelou que 75% das lavagens corporais de Diptera apresentaram a presença de SARS-CoV-2, sugerindo que essas moscas podem atuar como vetores do SARS-CoV-2 (Soltani et al., 2021). Além disso, um estudo semelhante observou que moscas domésticas abrigam SARS-CoV-2 até 24 h após a exposição ao vírus, concluindo que esses insetos podem transmitir mecanicamente o RNA genômico do vírus para o ambiente (Balaraman et al., 2021).

Dado o potencial de rotavírus e coronavírus veiculadores de dípteros aqui observados, identificados entre insetos capturados no ambiente de fazendas leiteiras, além da relevância humana desses patógenos virais, é necessário adotar algumas medidas entre as fazendas amostradas, incluindo a remoção diária de fezes e esterco de ordenha e

ambientes próximos, evitar umidade nas áreas de ordenha, uso de armadilhas e produtos químicos para controle de insetos e remoção de dejetos próximos à área de ordenha; visando o controle desses insetos em fazendas leiteiras que podem abrigar patógenos de risco para o homem e animais (Bertolini et al., 2022).

No geral, estudos focados na presença de moscas, mutucas e mosquitos no ambiente comum de animais e humanos podem contribuir para investigar o impacto desses insetos como vetores de patógenos zoonóticos, como rotavírus e coronavírus, incluindo os dípteros que habitam o ambiente de vacas leiteiras.

5. CONCLUSÃO

Uma variedade de famílias/espécies de Diptera foi entomologicamente identificada em Diptera capturados nas fazendas amostradas, com predominância de Muscidae, onde o diagnóstico de RVA e BCoV foi avaliado com base em RT-PCRs hemi-nest e de sequenciamento, indicando que esses insetos podem atuar como vetores desses vírus patogênicos para humanos e animais, inclusive na ordenha ambiente do gado.

6. REFERÊNCIAS

- Alfieri, A.A.; Ribeiro, J.; Balbo, L.C.; Lorenzetti, E.; Alfieri, A.F. Dairy calf rearing unit and infectious diseases: diarrhea outbreak by bovine coronavirus as a model for the dispersion of pathogenic microorganisms *Tropical Animal Health and Production* V50(8) p1937-1940, 2018.
- Ahmed, N.U.; Khair, A.; Hassan, J.; Khan, M.A.H.N.A.; Rahmani, M.A.H.N.A.; Hoque, W.; Rahman, M.; Kobayashi, N.; Ward, M.P.; Alam, M.M*. Risk factors for bovine rotavirus infection and genotyping of bovine rotavirus in diarrheic calves in Bangladesh, *PLOS ONE* 17(2): e0264577, 2022.
- Alegbeleye, O.O.; Singleton, I.; Sant'ana, A.S; Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology*, v.73, p177-203, 2018.
- Almeida, L. M, and Mise, K. M. (2009). Diagnosis and key of the main families and species of South American Coleoptera of forensic importance. *Revist Brasil de Ento* 53, 227-244.
- Almeida, J.L., Giuffrida, R., Andrade, R.A.P, and Chaves, M.P. (2014). Muscoid Diptera as potential vectors of bacterial agents on dairy farms in the northern region of Paraná, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias* 35, 3127-3138.
- Alves, T.S., Lara, G.H.B., Maluna, R.P., Ribeiro, M.G, and Leite, D.S. (2018). Carrier flies of multidrug-resistance *Escherichia coli* as potential dissemination agents in dairy farm environment. *Science of the total environment* 633,1354-1351.
- Arenas, A.; Borge, C.; Carbonero, A.C.; Garcia-Bocanegra, I.; Cano-Terriza, D.; Caballero, J.; Arenas-Montes, A. Bovine Coronavirus Immune Milk Against COVID-19 *Front. Immunol.*, 23 March 2021.
- Arsenopoulos, K.V., Triantafyllou, E., Filioussis, G., Papadopoulos, E. (2018). Fly repellency using deltamethrin may reduce intramammary infections of dairy cows under intensive management. *Comparative Immunology, Microbiol infect Dis* 61, 16-23.
- Asano KM, de Souza SP, de Barros IN, Ayres GR, Silva SO, Richtzenhain LJ, Brandão PE. Multiplex semi-nested RT-PCR with exogenous internal control for simultaneous detection of

bovine coronavirus and group A rotavirus. *J Virol Methods*. 2010 Nov;169(2):375-9. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.08.008.

Balaraman V, Drolet BS, Mitzel DN, Wilson WC, Owens J, Gaudreault NN, Meekins DA, Bold D, Trujillo JD, Noronha LE, Richt JA, Nayduch D. Mechanical transmission of SARS-CoV-2 by house flies. *Parasit Vectors*. 2021 Apr 20;14(1):214. doi: 10.1186/s13071-021-04703-8.

Bertolini, A.B., Prado, A.M., MThyssen, P.J., Mioni, M.S.R., Gouvea, F.L.R., Leite, D.S., Langoni, H., Pantoja, J.C.F., Rall, V.M., Guimaraes, F.F., Joaquim, S.F., Guerra S., Hernandes, R.T., Lucheis, S.B, Ribeiro, M.G. Prevalence of bovine mastitis-related pathogens, identified by mass spectrometry in flies (Insecta, Diptera) captured in the milking environment. *Lett Appl Microbiol*. 2022 Jul 24. doi: 10.1111/lam.13791.

Borucki, M.K.; Allen, J.E.; Chen-Harris, H.; Zemla, A.; Vanier, G.; Mabery, S.; Torres, C.; Hullinger, P.; Slezak, T. The Role of Viral Population Diversity in Adaptation of Bovine Coronavirus to New Host Environments. *PLOS ONE*, January, Volume 8 | Issue 1 | e52752 2013.

Calibeo-Hayes, D.; Denning, S.S.; Stringham, S.M.; Guy, J.S.; Smith, L.G.; Watson, D.W. Mechanical Transmission of Turkey Coronavirus by Domestic Houseflies (*Musca domestica* Linnaeus) *AVIAN DISEASES* 47:149–153, 2003.

Carvalho, C.J.B, and Ribeiro, P.B. (2000). Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do Sul do Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet* 9, 169-173.

Carvalho, C.J.B., Moura, M.O, and Ribeiro, P.B (2002). Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. *J Brasil Entomol* 46, 107-144.

Castro, B.G., Souza, M.M.S, and Bittencourt, A.J. (2008). Isolamento de espécies enterobacterianas em *Stomoxys calcitrans*. *Ciência Rural* 38, 1.

Castro, B. G., Souza, M. M. S., Regua, A. H., Regua M, A.H, and Bittencourt, A. J. (2013). Occurrence of Shiga toxigenic *Escherichia coli* in *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *J Bras de Parasitol Vet* 22, 318.

Castells, M., Giannitti, F., Cafarena, R,D., Casaux, M.L. Schild, C., Castells, D., Riet Correa, F., Victoria, M., Parreño, V., Colina, R. Bovine coronavirus in Uruguay: genetic diversity, risk

factors and transboundary introductions from neighboring countries. *Archives of Virology* (2019) 164:2715–2724.

Courtney, G.W., Pape, T., Skevington, J.H, and Sinclair, B.J. (2017). Biodiversity of Diptera. In: Footitt, R.G. And P.H. Adler (eds.). *Insect Biodiversity: Science and Society*. 2nd. USA: Wiley-Blackwell 229-278.

Dean, A.G., Sullivan, K.M, and Soe M.M. Openepi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versão. <https://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm>, updated 2013/04/06, accessed 2019/02/25.

Desselberger, U. Rotaviruses. *Virus Research* 190 (2014) 75–96.

Dóró, R.; Farkas, S.L.; Martella, V.; Bányai, K. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 13(11), 1337–1350, 2015.

Franzo, G.; Drigo, M.; Legnardi, M.; Grassi, L.; Pasotto, D.; Menandro, M.L.; Cecchinato, M.; Tucciarone, C.M. Bovine Coronavirus: Variability, Evolution, and Dispersal Patterns of a No Longer Neglected Betacoronavirus *Viruses*, 12, 1285, 2020.

Förster, M., Sievert, K., Messler, S., Klimpel, S, and Pfeffer, K. (2009). Comprehensive study on the occurrence and distribution of pathogenic microorganisms carried by synanthropic flies caught at different rural locations in Germany. *J Med Entomol* 46, 1164-1666.

Geletu, U.S., Usmael, M.A., Bari, F.D. Rotavirus in Calves and Its Zoonotic Importance. *Veterinary Medicine International Volume* 2021, Article ID 6639701, 18 pages

Gomez, D.E., Arroyo, L.G., Poljak, Z., Viel, L., Weese, J.S. Detection of Bovine Coronavirus in Healthy and Diarrheic Dairy Calves. *J Vet Intern Med* 2017;31:1884–1891.

Gonzalez, J.M.; Gomez-Puertas, P.; Cavanagh, D.; Gorbalenya, A.E.; Enjuanes, L. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Archives of Virology* 148: 2207–2235. 9, 2003.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Lamhoujeb, S., Cook, A., Pollari, F., Bidawid, S., Farber, J., Mattison, K. Rotaviruses from Canadian farm samples. *Arch. Virol* 155, 1127–1137, 2010.

Martella V, Bányai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol.* 2010 Jan 27;140(3-4):246-55. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.08.028. Epub 2009 Aug 28. PMID: 19781872.

Marcondes, C.B, and Thyssen, P.J. (2017) Flies. In: Marcondes, C.B. (Ed.), *Arthropod Borne Diseases*. Springer Int. Publish., Switzerland 475–502.

Midgley, S.E., Bányai, K., Buesa, J., Halaihel, N. Hjulsgaard, C.K., Jakab, F., Kaplon, J., Larsen, L.E., Monini, Prijatelj, M.M.P., Pothier, P., Ruggeri, F.M., Steyer, A., Koopmans, M., Boettiger, B. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Veterinary Microbiology* 156 (2012) 238–245

Moriya, K.; Fujibayashi, T.; Yoshihara, T.; Matsuda, A.; Sumi, N.; Umezaki, N. Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 carried by the housefly in Japan. *Med. Vet. Entomol*, v13, p214-216, 1999.

Mullis L., Saif, L.J., Zhang Y, Zhang X, Marli S.P. Stability of bovine coronavirus on lettuce surfaces under household refrigeration conditions Azevedo a, *Food Microbiology* V.30, Issue 1, Pages 180-186, 2012.

Nazni, W.A., Luke, H., Wan Rozita, W.M., Abdullah, A.G., Sa'diyah., Azahari, A.H., Zamree, I., Tan, S.B., Lee, H.L, and Sofian, M.A (2005). Determination of the flight range and dispersal of the house fly, *Musca domestica* (L.) using mark release recapture technique. *Trop Biomed* 22, 53–61.

Rafael, J.A., Pimentel; F.S.P, and Godoi, R.J.P. (2009). The enigmatic genus *Ctenostylum* Macquart with the description of a new species from the Brazilian Amazon Basin and a checklist of world *Ctenostylidae* species (Diptera). *Zootaxa* 20, 63-68.

Rafael, J. A., Melo, G. A. R., Carvalho, C.J.B., Casari, A.S., Constantino, R (2012). Chave Para Ordens - Adultos. In: Rafael, J.A.; Melo, G.A.R.; Carvalho, C.J.B.; Casari, S.A.; Constantino, R. (Eds.); *Insetos do Brasil. Diversidade e taxonomia*. 2012, Editora Holos 191-197 and 701-745.

Soltani A, Jamalidoust M, Hosseinpour A, Vahedi M, Ashraf H, Yousefinejad S. First molecular-based detection of SARS-CoV-2 virus in the field-collected houseflies. *Sci Rep.* 2021 Jul 6;11(1):13884. doi: 10.1038/s41598-021-93439-7.

Tan, S.W., Yap, k.l., Lee.H.L. Mechanical transport of Rotavirus by the legs and wings of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *J. med. Entomol.* 34(5): 527-531. 1997.

Doremalen V.N, Bushmaker T, Karesh WB, Munster VJ. Stability of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Milk. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(7):1263-1264. <https://doi.org/10.3201/eid2007.140500>

Vijgen, L.; Keyaerts, E.; Moes, E.; Thoelen, I.; Wollants, E. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. *J Virol* 79: 1595–1604. 8, 2005.

Vlasova, A.N.; Saif, L.J. BIOLOGICAL aspects of the interspecies transmission of selected coronaviruses. *Viral Infections and Global Change, First Edition.* 393- 418, 2013.

Vlasova, A.N.; Saif, L.J. BOVINE. Coronavirus and the Associated Diseases *Front. Vet. Sci.*, 31 March 2021.

Wilhelma, B.; Waddell, L.; Greig, J.; Rajic, A.; Houde, A.; Ewena, S.A.M. A scoping review of the evidence for public health risks of three emerging potentially zoonotic viruses: hepatitis E virus, norovirus, and rotavirus. *Preventive Veterinary Medicine* 119, 61–79, 2015.