

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

CARLA REGINA COSTA FURLAN

Identificação molecular de coronavírus bovino em superfícies abióticas

Molecular identification of bovine coronavirus on abiotic surfaces

CURITIBA

2023

CARLA REGINA COSTA FURLAN

Identificação molecular de coronavírus bovino em superfícies abióticas

Molecular identification of bovine coronavirus on abiotic surfaces

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Santos Sotomaior

Coorientador: Prof. Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff

Coorientadora: Prof. Dra. Alais Maria Dall Agnol

CURITIBA

2023



Programa de
**PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA ANIMAL
PUCPR**

REQUISITOS APÓS DEFESA DE DISSERTAÇÃO/TESE

1º - Aprovação do Orientador para Impressão da Versão Final da Dissertação/Tese
Aluno: Carla Regina Costa Furlan
Título: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE CORONAVÍRUS BOVINO (BCoV) EM SUPERFÍCIES ABIÓTICAS
Orientador: Profa. Dra. Cristina Santos Sotomaior
Co-Orientador: Prof. Dr. Prof. Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff Prof. Dra. Alais Alais Maria Dall Agnol

Data da Defesa: 29/09 /2023 **Horário:** 8:00H

Autorizo a Impressão Final da Dissertação/tese e a retirada da Ata na Secretaria do PPGCA, pois o (a) aluno (a) atendeu a todas as exigências da banca examinadora.

Observações:

Orientador (a)

Documento assinado digitalmente
gov.br CARLA REGINA COSTA FURLAN
Data: 26/10/2023 09:50:14-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Aluno (a)

Co-orientador (a)

Coordenador (a) do PPGCA

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, e meus irmãos por tudo que sou e principalmente pelo amor e incentivo em todos os momentos.

Ao meu marido pelo apoio moral, paciência e acima de tudo ao amor dedicado a mim em todas as horas.

Ao meu filho, a Thamiris e a Laura que apoiaram meu trabalho, me dando força e incentivo.

À minha orientadora, Prof. Dra. Cristina Santos Sotomaior, pela atenção em todos os momentos, pelos ensinamentos e pela oportunidade e confiança depositada em mim durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff, por toda colaboração para a realização deste trabalho, pela gentileza e disposição em sempre me ajudar.

À Prof. Dra. Alais Maria Dall Agnol, pela colaboração e ensinamentos a mim dedicados.

Ao Prof. Dr. Saulo Henrique Weber, pela participação na banca e pelas valiosas contribuições dadas ao trabalho.

À Profa. Dra. Carla Ivane Ganz Vogel, pela parceria, por abrir as portas do laboratório para realização da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri, membro da banca, pelos ensinamentos e sugestões valiosas.

Ao Dr. Gustavo Seron Sanches, membro da banca, pelas sugestões.

À Ketriane, por toda ajuda com a biologia molecular durante a pesquisa no laboratório.

Aos colegas da turma, por vários momentos, pela amizade, companheirismo, pelas conversas e momentos divertidos.

A UNIFACVEST, pelo incentivo na realização do doutorado.

Ao laboratório de virologia da UEL e ao laboratório de Biologia Molecular do CAV-UDESC pela parceria.

A todos professores do curso do PPGCA, principalmente aos professores que nos ministraram aulas.

À Caroline do PPGCA, por ser sempre prestativa e simpática.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO GERAL	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS	6
CAPÍTULO 2	13
A systematic review of the presence of bovine coronavirus on environmental surfaces	13
1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
3. RESULTADOS	16
4. DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÃO	23
5. REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 3	30
Detecção molecular de coronavírus bovino (BCoV) em superfícies abióticas de uma propriedade de bovinos leiteiros naturalmente infectados.....	30
RESUMO	30
ABSTRACT	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 Seleção de uma propriedade para colheita de amostras	32
2.2.1 Colheita de amostras de fezes e de secreção nasal	33
2.2.2 Colheita de amostras em superfícies.....	33
2.3. Identificação Molecular de BCoV.....	33
2.3.1 Extração de RNA.....	33
2.3.2 Detecção molecular de BCoV.....	34

2.3.3 Análise dos Produtos Amplificados	35
2.3.4 Sequenciamento	36
3. RESULTADOS	37
3.1 Detecção Molecular de BCoV	37
3.3. Análise parcial do gene N	38
3.4. Análise parcial do gene S1	38
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS.....	45
Capítulo 4	52
Perspectivas Futuras	52
Anexo	53

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1	Lista das principais espécies de vírus pertencentes à família <i>Coronaviridae</i> que afetam bovinos, outros animais domésticos ou humanos, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus – ICTV (Miranda et al., 2021)	4
----------	---	---

Capítulo 2

Figura 1	Fluxograma da pesquisa e números de artigos identificados na revisão sistemática da presença do BCoV em superfícies do ambiente	17
----------	---	----

Capítulo 3

Figura 1	Localização geográfica do município de Castro-PR	33
Figura 2	Análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança do gene N parcial (285 nt) de cepas de coronavírus bovino	39
Figura 3	Análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança do gene S1 parcial (1621 nt) de cepas de coronavírus bovino ...	40

LISTA DE ABREVIATURAS

BCoV	<i>Bovine coronavirus (Coronavírus bovino)</i>
CoV	<i>Coronavirus (Coronavírus)</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum (Soro Fetal Bovino)</i>
pb	<i>base pairs (pares de bases)</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)</i>
RT-PCR	<i>Polymerase Chain Reaction with Reverse Transcription (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa)</i>
SN-RT-PCR	<i>semi-nested Polymerase Chain Reaction with Reverse Transcription</i>

FORMATO DA TESE

A presente tese é composta por 3 capítulos. No capítulo 1 é apresentada uma introdução geral, com a contextualização do tema e os objetivos da pesquisa. Os capítulos 2 e 3 são artigos científicos completos, formatados nas normas das revistas para as quais serão submetidos. O capítulo 4 finaliza esta tese com considerações finais, impacto e perspectivas do trabalho. As referências são apresentadas ao final de cada capítulo.

RESUMO GERAL

Coronavírus bovino (BCoV) estão entre os principais agentes etiológicos que afetam bovinos em todo o mundo, causando sintomatologia respiratória e entérica, com prejuízos econômicos significativos à pecuária. A principal forma de propagação é a transmissão direta entre os bovinos, podendo ocorrer também transmissão indireta. Considerando que para o delineamento de medidas profiláticas é necessário o conhecimento da presença do vírus em diferentes ambientes de criação dos bovinos, o presente trabalho teve como objetivos realizar uma revisão sistemática sobre a presença de BCoV em superfícies e identificar molecularmente a presença de BCoV em diferentes superfícies de uma propriedade com rebanho bovino positivo para BCoV. Para a revisão sistemática, seguindo o PRISMA, foram empregados os termos de busca “Bovine coronavírus” e “BCoV”, resultando em 867 artigos. Após aplicação dos critérios de exclusão, por título, resumo e metodologia, três artigos foram incluídos na revisão. Nestes artigos, foi identificada a presença de BCoV em diferentes tipos de superfície, sendo que a detecção foi possível até 81h após a contaminação, dependendo do tipo de superfície. Apesar do número limitado de estudos que investigaram a presença do BCoV em superfícies, os resultados sugerem o potencial de transmissão do BCoV por meio de superfícies contaminadas devido à capacidade do vírus permanecer infeccioso durante até 24 horas em fômites, como botas e relógios de pulso. Para o estudo de avaliação da disseminação de BCoV em superfícies, foram colhidas 61 amostras de fezes, secreção nasal e de superfícies do ambiente de uma propriedade produtora de leite, no município de Castro-PR, com circulação de BCoV previamente conhecida no rebanho bovino. A identificação molecular de BCoV foi realizada por meio de SN-RT-PCR e sequenciamento genético. O gene N do BCoV foi detectado em 6/13 (46,1%) das amostras de fezes, 4/11 (36,4%) das amostras de secreção nasal e 10/37 (27,0%) das amostras colhidas de diferentes superfícies do ambiente, como de bebedouros, comedouros e de paredes de madeira do bezerreiro. A análise da sequência do gene N e S1 evidenciou que a mesma cepa de BCoV está presente nos bovinos e nas superfícies da propriedade. Na análise filogenética do gene S1, as cepas de BCoV identificadas neste estudo agruparam-se com sequências brasileiras anteriormente identificadas em doença respiratória e entérica. Conclui-se que foi possível detectar molecularmente BCoV em diferentes superfícies de uma propriedade com rebanho bovino positivo para BCoV. Como, de acordo com a revisão sistemática, BCoV pode permanecer infeccioso em alguns tipos de superfície, é imprescindível aplicar medidas de higiene e desinfecção dos locais de criação dos bovinos para diminuir a contaminação e, conseqüentemente, a sua transmissão indireta.

Palavras-chave: BCoV; bovinos leiteiros; superfícies; ambiente.

ABSTRACT

Bovine coronavirus (BCoV) is among the major etiological agents affecting cattle worldwide, causing respiratory and enteric symptoms, with significant economic losses in the livestock industry. Direct transmission among cattle is the primary mode of propagation, but indirect transmission is also possible. Considering that knowledge of the virus's presence in different areas of a property is essential for designing preventive measures, this study aimed to conduct a systematic review of BCoV presence on surfaces and molecularly identify BCoV presence on different surfaces in a property with a BCoV-positive cattle herd. For the systematic review, following PRISMA recommendations, the search terms "Bovine coronavirus" and "BCoV" were employed, resulting in 867 articles. After applying exclusion criteria based on title, abstract, and methodology, three articles were included in the review. These articles identified the presence of BCoV on various types of surfaces, with detection possible up to 81 hours after contamination, depending on the type of surface. Despite the limited number of studies investigating of BCoV presence on surfaces, the results suggest the potential for BCoV transmission through contaminated surfaces due to the virus ability to remain infectious for up to 24 hours on fomites such as boots and wristwatches. For the study evaluating the spread of BCoV on surfaces, 61 samples of feces, bovine nasal secretion, and environmental surfaces were collected from a milk-producing property in Castro-PR, where BCoV circulation was previously known in the cattle herd. Molecular identification of BCoV was performed using RT-semi-nested-PCR and genetic sequencing. The BCoV N gene was detected in 6 out of 13 (46.1%) fecal samples, 4 out of 11 (36.4%) nasal secretion samples, and 10 out of 37 (27%) samples collected from different surfaces in the environment, such as water troughs, feeders, and wooden walls in the calf barn. Sequence analysis of the N and S1 genes revealed that the same BCoV strain was present in both cattle and on the surfaces of the property. In the phylogenetic analysis of the S1 gene, the BCoV strains identified in this study clustered with previously identified Brazilian sequences associated with respiratory and enteric diseases. In conclusion, it was possible to molecularly detect BCoV on various surfaces of a property with a BCoV-positive cattle herd. As indicated by the systematic review, since BCoV can remain infectious on certain surfaces, it is crucial to implement hygiene and disinfection measures in cattle breeding locations to reduce contamination and, consequently, indirect transmission.

Keywords: BCoV; dairy cattle; surfaces; environment.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de leite é uma atividade econômica com grande impacto na geração de emprego e renda (Rocha et al., 2020), sendo que dados do censo agropecuário indicam que há cerca de 2,47 milhões de pessoas empregadas na criação de bovinos de leite. Nos últimos anos, houve aumento da produção da pecuária leiteira brasileira, atingindo 35,3 bilhões de litros de leite em 2021 (IBGE, 2023), destacando o Brasil como um dos principais países produtores de leite do mundo.

O estado do Paraná é o segundo maior produtor nacional de leite, com 4,6 bilhões de litros ao ano, responsável por 13,09% da produção nacional, ficando somente atrás de Minas Gerais que produz 9,6 bilhões de litros ao ano, correspondendo a 27,34% da produção nacional (EMBRAPA, 2022). Das 39 microrregiões existentes no estado do Paraná, dez são classificadas como especializadas na produção de leite, com destaque para a região dos Campos Gerais, devido ao padrão elevado de tecnologia, genética, bem-estar animal, técnicas de manejo e normas sanitárias (Vilela et al., 2016).

Em sistemas de manejo intensivo, os problemas sanitários podem comprometer a produtividade da pecuária leiteira. Algumas doenças, embora não levem necessariamente à morte dos animais, podem ter efeitos diretos e indiretos sobre a produtividade dos rebanhos bovinos, principalmente em sistemas intensivos de produção de leite, por estarem mais expostos aos agentes causadores de doenças infectocontagiosas (Vilela et al., 2016). Consequentemente, há uma preocupação constante para os produtores, médicos veterinários e governantes, uma vez que os problemas sanitários têm um impacto significativo na saúde e bem-estar animal, meio ambiente, saúde pública e economia (Whatford et al., 2022).

Entre os principais problemas, destacam-se a diarreia neonatal e problemas respiratórios. Ambas as síndromes são recorrentes em rebanhos de bovinos de leite e corte, resultando em morbidade e mortalidade significativas, além de afetarem o bem-estar dos animais, principalmente os jovens, e causarem prejuízos econômicos para a indústria de produção de bovinos (Saif, 2010; Quigley e Drewry, 2016). Tanto a diarreia quanto os problemas respiratórios são considerados doenças

multifatoriais, cujas causas são complexas, incluindo exposição a patógenos, variação de cepas, condições ambientais e de manejo, estado nutricional e imunológico do animal (Barrington et al., 2002). Coronavírus bovino (*Bovine coronavirus* - BCoV) é considerado um dos mais importantes agentes etiológicos virais envolvidos em diarreias neonatais de bezerros mundialmente (Takiuchi et al., 2008; Lorenzetti et al., 2013; Bok et al., 2018), levando a importantes perdas econômicas para a indústria de carne e de laticínios.

BCoV é um vírus com duplo tropismo (entérico e respiratório), podendo causar diarreia neonatal em bezerros, disenteria de inverno em bovinos adultos e infecções respiratórias em bovinos de idades variadas (Saif, 2010). A primeira identificação do BCoV foi realizada por Stair et al. (1972), em um bezerro com diarreia neonatal nos Estados Unidos. No mesmo ano, o mesmo grupo de pesquisa reproduziu experimentalmente um quadro diarreico em bezerros e observaram partículas virais por microscopia eletrônica, que foram então denominadas de "*coronavirus-like*" (Mebus et al., 1972).

Desde então, BCoV tem sido reconhecido como um importante patógeno para os bovinos em vários países. No Brasil, somente em 2002, BCoV foi descrito pela primeira vez no estado de São Paulo (Brandão et al., 2002). A partir dessa data, vários estudos têm sido realizados para investigar a presença do vírus em rebanhos bovinos, com registros de sua ocorrência em rebanhos de várias regiões do país (Brandão et al., 2002; Jerez et al., 2005; Takiuchi et al., 2008; Pavarini et al., 2008; Asano et al., 2009; Stipp et al., 2009; Lorenzetti et al., 2013; Ribeiro et al., 2016; Rocha et al., 2018; Frucchi et al., 2022). Porém, a maneira como a transmissão ocorre de fato nas fazendas não é bem conhecido, especialmente nas condições brasileiras.

Uma vez infectados pelo BCoV, bezerros podem excretar grande quantidade de partículas virais pelas fezes em poucas horas, e essa excreção pode persistir por até duas semanas (Saif, 2010). Animais gravemente afetados podem apresentar diarreia líquida e amarela com coágulos sanguíneos, além de desidratação, hipotermia, depressão, redução da ingestão de alimentos, perda de eletrólitos, acidose metabólica e hipoglicemia (Gomez e Weese, 2017), podendo evoluir para febre, decúbito e morte (Traven et al., 2001). O período de incubação do vírus pode variar de um a sete dias, e os sinais clínicos podem perdurar de três a seis dias (Hodnik et al., 2020).

A gravidade dos sinais causados por BCoV pode variar dependendo da condição de saúde do bovino, do ambiente em que o bovino é criado, seu estado imunológico, a temperatura do ambiente e coinfeções secundárias com outros patógenos (Boileau e Kapil, 2010). A doença é caracterizada por surtos em várias épocas, com maior frequência nas estações frias, devido à maior estabilidade do vírus em baixas temperaturas (Zhu et al., 2022). Contudo, Decaro et al. (2008) relataram um surto grave de infecção por BCoV em bovinos leiteiros durante a estação mais quente em um rebanho leiteiro no sul da Itália.

Vacas infectadas, mesmo sem diarreia, podem ter seu estado geral e apetite deprimidos, levando à queda na produção de leite (Traven et al., 2001). Em animais jovens e adultos podem ocorrer síndromes respiratórias. Os sinais clínicos podem variar de leve a grave, incluindo descarga nasal, dispneia, tosse, febre e desconforto respiratório (Saif, 2010). Os bovinos que tiveram a doença enquanto jovens, têm maior risco de mortalidade, baixo ganho de peso e menor produção de leite ao longo de toda a vida (Buczinski et al., 2021).

BCoV é um vírus de RNA pertencente à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae*, gênero *Betacoronavirus* e espécie *Betacoronavirus 1* (ICTV, 2023) junto com as demais espécies de coronavírus (CoVs) de seres humanos, suínos e cavalos (Figura 1). BCoV, por possuir uma estreita relação com outros CoVs, não é considerado uma espécie distinta e sim uma quase-espécie (Hodnik et al., 2020).

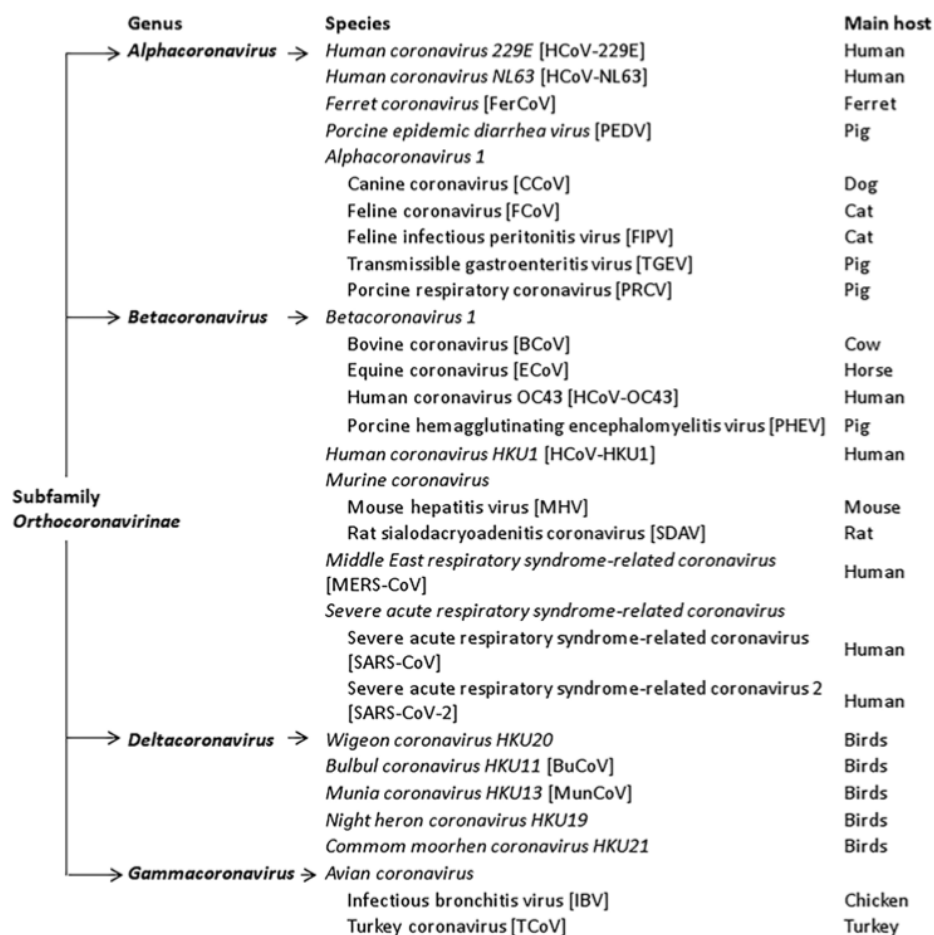


Figura 1. Principais espécies de vírus pertencentes à família *Coronaviridae* que afetam bovinos, outros animais domésticos ou humanos, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus – ICTV (Miranda et al., 2021).

O genoma de BCoV é constituído por uma única molécula de RNA linear, fita simples com polaridade positiva, tamanho variando de 27 até 32 kb. A partícula viral é constituída por cinco proteínas estruturais: a proteína E do envelope, a proteína M da membrana, a proteína S da espícula, a proteína HE da hemaglutinina-esterase e, internamente ao envelope, encontra-se a proteína N do nucleocapsídeo (Clark, 1993). A proteína S desempenha um papel fundamental na patogênese, evolução e transmissão viral (Huang et al., 2020). A porção periférica S1 pode ligar-se independentemente aos receptores, enquanto a porção S2 media a fusão de membranas virais e celulares (Gallagher e Buchmeiert, 2001). A proteína N exerce um papel importante na estrutura e função do vírus, pois está envolvida na

embalagem do material genético viral e na formação da cápsula viral. Por ser relativamente conservada entre diferentes cepas de coronavírus, a proteína N é muito utilizada em testes de diagnóstico molecular (Cho et al., 2001; Park et al., 2006).

O diagnóstico laboratorial da infecção por BCoV pode ser realizado pela detecção do vírus, do antígeno viral ou do RNA viral em tecidos ou em várias secreções/excreções do animal (Vlasova e Saif, 2021). Estudos epidemiológicos moleculares sobre a infecção por BCoV com base em todo o genoma viral têm sido realizados para detectar a presença do vírus nas fezes. A Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR) possui alta sensibilidade e especificidade em comparação com a técnica imunoenzimática ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Cho et al., 2001). Aliado à RT-PCR convencional, o método da *semi-nested* RT-PCR também é indicado, pois apresenta maior sensibilidade na detecção de BCoV (Takiuchi et al., 2006).

BCoV possui transmissão fecal-oral e respiratória. A transmissão entre rebanhos é possível via transmissão horizontal (Oma et al., 2016). Entretanto, Oma et al. (2018) relataram que a transmissão ao bovino pode ocorrer também indiretamente por meio de pessoas ou equipamentos contaminados.

No caso de CoVs humanos, estudos relatam a viabilidade do vírus por algumas horas em materiais como o plástico, metal, madeira e aço inoxidável (Duan et al., 2003; Rabenau et al., 2004; Chin et al., 2020; van Doremalen et al., 2020; Shivkumar et al., 2021; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2021). Entretanto, a viabilidade dos CoVs pode variar em temperaturas altas e diferentes superfícies (Rabenau et al., 2005). Em superfícies não porosas, o vírus foi detectado após 28 dias a 20 °C, reduzindo sua viabilidade comparada com as superfícies porosas. No mesmo experimento, a 40 °C, sua viabilidade foi significativamente reduzida (Riddell et al., 2020).

Diferentemente do que ocorre com CoVs humanos, não se conhece muito sobre a presença de BCoV em superfícies. Como a transmissão ocorre por via oral ou aerossóis nos bovinos (Clark, 1993), a presença de BCoV no ambiente pode estar relacionada a comedouros e bebedouros contaminados e por meio de outras superfícies e substâncias que os bovinos têm contato, como por exemplo, canzil, paredes, chão com fezes, urina e matéria orgânica. O vírus uma vez depositado em botas, casacos, estetoscópios pode permanecer infeccioso por 24 horas (Oma et al.

2018). Porém, como essa transmissão ocorre de fato nas fazendas não é bem conhecido, especialmente nas condições brasileiras.

A compreensão sobre a presença do BCoV em diferentes superfícies ambientais contribuirá para a implementação de medidas profiláticas e de controle da transmissão viral dentro de rebanhos bovinos. Essas informações seriam determinantes no acompanhamento dos surtos da doença, auxiliando nas investigações do perfil de transmissão, podendo ainda direcionar medidas a serem tomadas para o controle e a prevenção.

Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a presença de BCoV em diferentes superfícies.

Os objetivos específicos foram:

- Realizar uma revisão sistemática sobre a presença de BCoV em superfícies;
- Detectar, por metodologias moleculares, a presença de BCoV em fezes e secreções nasais de bovinos com sinais clínicos, em um rebanho bovino leiteiro positivo para BCoV;
- Detectar, por metodologias moleculares, a presença de BCoV em amostras colhidas em diferentes superfícies das instalações e dos equipamentos usados em propriedade positiva para BCoV;
- Sequenciar parcialmente o gene N e S1 de amostras positivas para BCoV;
- Realizar a caracterização molecular e análise filogenética a partir de sequências parciais dos genes N e S1 de cepas de BCoV identificadas neste estudo com outras cepas de BCoV descritas no Brasil e em outros países.

Referências

Amer, H. M. (2018). Bovine-like coronaviruses in domestic and wild ruminants. *Animal Health Research Reviews*, 19(2), 113–124. <https://doi.org/10.1017/S1466252318000117>

Asano, K. M., Souza, S. P., Silva, S. O. S., Richtzenhain, L. J., Brandão, P. E. (2009). Rapid detection of bovine coronavirus by a semi-nested, RT-PCR. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(11), 874–880. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2009001100001>

Barrington, G. M., Gay, J. M., Evermann, J. F. (2002). Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 18(1), 7–34. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00005-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00005-1)

Bell, D.; Roberton, S.; Hunter, P. H. Animal origins of SARS coronavirus: possible links with the international trade in small carnivores. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 2004; 359, 1107–1114.

Bidokhti, M. R. M., Trávén, M., Ohlson, A., Baule, C., Hakhverdyan, M., Belák, S., Liu, L., Alenius, S. (2012). Tracing the transmission of bovine coronavirus infections in cattle herds based on S gene diversity. *Veterinary Journal*, 193(2), 386–390. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.12.015>

Boileau, M. J., Kapil, S. (2010). Bovine Coronavirus Associated Syndromes. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 26(1), 123–146. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.003>

Bok, M., Alassia, M., Frank, F., Vega, C. G., Wigdorovitz, A., Parreño, V. (2018). Passive immunity to control Bovine coronavirus diarrhea in a dairy herd in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.03.007>

Brandão, P. E., Birgel Jr, E. H., Gregori, F., Rosales, C. A. R., Ruiz, V. L. A., Jerez, J. A. (2002). Bovine Coronavirus Detection in Adult Cows in Brazil. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 69(2), 103–104. http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V69_2/brandao.pdf

Buczinski S, Achard D, Timsit E. (2021). Effects of calfhooD respiratory disease on health and performance of dairy cattle: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science*. Jul;104(7):8214-8227. doi: 10.3168/jds.2020-19941. Epub 2021 Apr 23. PMID: 33896639.

Chan, A. J. F., Zhang, A. J., Yuan, S., Kwok, V. (2019). Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility Authors: Jasper Fuk-Woo Chan. 2019.

Chin A.W.H, Chu J.T.S, Perera M.R.A, Hui K.P.Y, Yen H.L, Chan M.C.W, Peiris M, Poon L.L.M. (2020) Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet Microbe*. May;1(1): e10. doi: 10.1016/S2666-5247(20)30003-3. Epub Apr 2. PMID: 32835322; PMCID: PMC7214863.

Cho, K. O., Hasoksuz, M., Nielsen, P. R., Chang, K. O., Lathrop, S., Saif, L. J. (2001) Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Archives of Virology*. ; 146, 2401–2419.

Chouljenko V.N, Lin X.Q, Storz J, Kousoulas K.G Gorbalenya A.E (2001) Comparison of genomic and predicted amino acid sequences of respiratory and enteric bovine coronaviruses isolated from the same animal with fatal shipping pneumonia. *Journal of General Virology* 82, 2927–2933.

Clark M.A.(1993). Bovine coronavirus. *British Veterinary Journal*. Jan-Feb;149(1):51-70. doi: 10.1016/S0007-1935(05)80210-6. PMID: 8382546; PMCID: PMC7130254.

Collins, J. K., Riegel, C. A., Olson, J. D. Fontain, A. (1987). Shedding of enteric coronavirus in adult cattle. American journal of veterinary research 48 (3): 361-5. PMID: 3032023.

Dahling, R.D. (1991) Detection and enumeration of enteric viruses in cell culture, Critical Reviews in Environmental Control, 21:3-4, 237-263, DOI: 10.1080/10643389109388417

Decaro, N., Mari, V., Desario, C., Campolo, M., Elia, G., Martella, V., Greco, G., Cirone, F., Colaianni, M. L., Cordioli, P., Buonavoglia, C. (2008). Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season. Veterinary Microbiology, 126(1–3), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.024>

Duan S.M., Zhao X.S., Wen R.F., Huang J.J., Pi G.H., Zhang S.X., Han J., Bi S.L., Ruan L., Dong X.P. and SARS Research Team, 2003. Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation, Biomedical and Environmental Sciences, 16, 3, 246–255.

EMBRAPA. Anuário Leite 2022 - Pecuária leiteira de precisão. Juiz de Fora, Embrapa Gado de Leite, 114p. 2022. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1144110/1/Anuario-leite-2022.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2023.

Frucchi, A. P. S., Dall Agnol, A. M., Bronkhorst, D. E., Beuttemuller, E. A., Alfieri, A. A., Alfieri, A. F. (2022). Bovine Coronavirus Co-infection and Molecular Characterization in Dairy Calves With or Without Clinical Respiratory Disease. Frontiers in veterinary science, 9, 895492. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.895492>

Gallagher T.M, Buchmeier M.J. (2001) Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. Virology. Jan 20;279(2):371-4. doi: 10.1006/viro.2000.0757. PMID: 11162792; PMCID: PMC7133764.

Gomez D.E. and Weese J.S. (2017). Viral enteritis in calves, Canadian Veterinary Journal, 58, 12, 1267–1274

Hodnik, J. J., Ježek, J., Starič, J. (2020). Coronaviruses in cattle. Tropical Animal Health and Production. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02354-y>

Huang, Y., Yang, C., Xu, X. F., Xu, W., Liu, S. W. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. Acta pharmacologica Sinica, 41(9), 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>

IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal 2023. Tabela 3939: efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho, 2021. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy:2020 Release. Available online at: <https://talk.ictvonline.org/> (accessed August 29, 2023).

Jerez, J.A; Gregori, F; Brandão, P.E; Rosales, C.A.R; Ito, F.H; Buzinaro, M.G; Sakai, T. (2005). Isolation of bovine coronavirus (BCoV) in monolayers of HmLu-1 cells. Brazilian Journal of Microbiology, v.36, p.207-210.

Kanno, T., Ishihara, R., Hatama, S., Uchida, I. (2018). A long-term animal experiment indicating persistent infection of bovine coronavirus in cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(7), 1134–1137. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0050>

Lau, S. K., Lee, P., Tsang, A. K., Yip, C. C., Tse, H., Lee, R. A., So, L. Y., Lau, Y. L., Chan, K. H., Woo, P. C., Yuen, K. Y. (2011). Molecular epidemiology of human coronavirus OC43 reveals evolution of different genotypes over time and recent emergence of a novel genotype due to natural recombination. *Journal of virology*, 85(21), 11325–11337.

Lau, S. K., Woo, P. C., Yip, C. C., Fan, R. Y., Huang, Y., Wang, M., Guo, R., Lam, C. S., Tsang, A. K., Lai, K. K., Chan, K. H., Che, X. Y., Zheng, B. J., Yuen, K. Y. (2012). Isolation and characterization of a novel Betacoronavirus subgroup A coronavirus, rabbit coronavirus HKU14, from domestic rabbits. *Journal of virology*, 86(10),

Lima, J. A. (2020). *Pecuária leiteira: desafios e oportunidades*. *Revista Cafeicultura*, v. 17, n. 2, p. 14-17.

Lorenzetti, E., de Arruda Leme, R., Ribeiro, J., Almeida De Souza, V. R., Alfieri, A. F., Alfieri, A. A. (2013). Neonatal diarrhea by bovine coronavirus (BCoV) in beef cattle herds. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(6 SUPPL. 2), 3795–3800. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3795>.

Lu, S., Wang, Y., Chen, Y., Wu, B., Qin, K., Zhao, J., Lou, Y., Tan, W. (2017). Discovery of a novel canine respiratory coronavirus support genetic recombination among betacoronavirus1. *Virus research*, 237, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.05.006>

Mebus, C.A; Underdahl, N.R; Twiehaus, M.J. (1972) Isolation unit used in studies on neonatal calf diarrhea. *American journal of veterinary research*, v.33, p.2335-2340. 1972.

Oma, V. S., Klem, T., Tråvén, M., Alenius, S., Gjerset, B., Myrmel, M., Stokstad, M. (2018). Temporary carriage of bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus by fomites and human nasal mucosa after exposure to infected calves. *BMC veterinary research*, 14(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1335-1>

Oma, V.S., Tråvén, M., Alenius, S. Myrmel, M., Stokstad,M. (2016).Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the potential for transmission. *Virol J* 13, 100 <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0555-x>

Otter, J. A., Donskey, C., Yezli, S., Douthwaite, S., Goldenberg, S. D., & Weber, D. J. (2016). Transmission of SARS and MERS coronaviruses and influenza virus in healthcare settings: the possible role of dry surface contamination. *The Journal of hospital infection*, 92(3), 235–250. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.08.027>

Park S.J., Jeong C, Yoon S.S., Choy H.E., Saif L.J., Park S.H., Kim Y.J., Jeong J.H., Park S.I., Kim H.H., Lee B.J., Cho H.S., Kim S.K., Kang M.I. and Cho K.O. (2006). Detection and Characterization of Bovine Coronaviruses in Fecal Specimens of Adult Cattle with Diarrhea during the Warmer Seasons, *Journal Of Clinical Microbiology*, 44, 9, 3178–3188.

Pavarini, S. P., Bezerra Junior, P. S., Santos, A. da S., Pescador, C. A., Brandão, P. E., Souza, S. P. de Driemeier, D. (2008). Achados clínico patológicos durante um surto de disenteria de inverno em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28(12), 611–616. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2008001200009>

Quigley J.D., Drewry J.J. (2016). Nutritional management of diarrhea in calves. *Veterinary Clinics of North American: Food Animal Practice*;32(2): 377-89. doi: 10.1016/j.cvfa.2016.01.005.

Rabenau, H. F., Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Preiser, W., Doerr, H. W. (2005). Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Medical microbiology and immunology*, 194(1-2), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00430-004-0219-0>

Rabenau, H. F., Kampf, G., Cinatl, J., Doerr, H. W. (2005). Efficacy of various disinfectants against SARS coronavirus. *Journal of Hospital Infection*, 61(2), 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.12.023>

Ribeiro, J., Lorenzetti, E., Alfieri, A. F., Alfieri, A. A. (2016). Molecular detection of bovine coronavirus in a diarrhea outbreak in pasture-feeding Nellore steers in southern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 48(3), 649–653. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0975-4>

Riddell, S., Goldie, S., Hill, A., Eagles, D., Drew, T. W. (2020). The effect of temperature on persistence of SARS-CoV-2 on common surfaces. *Virology Journal*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01418-7>

Rocha, C.; Fornells, L. A.; Rojas, M.; Libetal, M.; Manchego, A.; Pezo, D.; Santos, N. (2018). Molecular epidemiology of coronavirus in faeces of Brazilian calves and Peruvian camelid herds. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v.12, p.037-042.

Rocha, D. T., Carvalho, G.R., Resende, J.C de (2020) Cadeia produtiva do leite no Brasil: produção primária. *Circular técnica* 123.

Saif, L.J. (2010). Bovine respiratory coronavirus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 26, n.2, p.349-364.

Shivkumar, M., Adkin, P., Owen, L., Laird, K. (2021). Investigation of the stability and risks of fomite transmission of human coronavirus OC43 on leather. *FEMS microbiology letters*, 368(16), fnab112. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab112>

Stair, E. L., Rhodes, M. B., Write, R. G. Mebus, C. A. (1972). Neonatal calf diarrhea: purification and electron microscopy of a coronavirus-like agent. *American Journal of Veterinary Research*. 33,1147-56.

Stipp, D. T., Barry, A. F., Alfieri, A. F., Bodnar, L., Alfieri, A. A. (2009). Isolation in HRT-18 cells and molecular analysis of a BCoV strain from diarrheic feces of naturally infected calves. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(SPL.ISS.), 51–56. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132009000700007>

Takiuchi, E., Stipp, D. T., Alfieri, A. F., Alfieri, A. A. (2006). Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. *Journal of virological methods*, 131(2), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.08.005>

Takiuchi, E., Alfieri, A. F., Alfieri, A. A. (2008). Molecular analysis of the bovine coronavirus S1 gene by direct sequencing of diarrheic fecal specimens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(4), 277–282. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008000400004>

Telles, T. S., Bacchi, M. D., Costa, G. V. D., & Schuntzemberger, A. M. S. (2020). Milk production systems in Southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 92(1), e20180852. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020180852>.

Traven, M., Naslund, K., Linde, N., Linde, B., Silvan, A., Fossum, C., Hedlund, K.O., Larsson, B. (2001). Experimental reproduction of winter dysentery in lactating cows using BCV – comparison with BCV infection in milk-fed calves. *Vet. Microbiol.* 81, 127–151.

van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D. H., Holbrook, M. G., Gamble, A., Williamson, B. N., Tamin, A., Harcourt, J. L., Thornburg, N. J., Gerber, S. I., Lloyd-Smith, J. O., de Wit, E., Munster, V. J. (2020). Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *New England Journal of Medicine*, 382(16), 1564–1567. <https://doi.org/10.1056/nejmc2004973>

Vijgen, L., Keyaerts, E., Lemey, P., Maes, P., van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M., van Ranst, M. (2006). Evolutionary History of the Closely Related Group 2 Coronaviruses: Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus, Bovine Coronavirus, and Human Coronavirus OC43. *Journal of Virology*, 80(14), 7270–7274. <https://doi.org/10.1128/jvi.02675-05>

Vilela, D.V, Ferreira, R. de P., Fernandes, E.N., Juntolli, F.V. *Pecuária de Leite no Brasil Cenários e avanços tecnológicos*. Brasília, DF: Embrapa, 2016. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164236/1/Pecuarria-de-leite-no-Brasil.pdf>

Vlasova, A. N., Saif, L. J. (2021). Bovine Coronavirus and the Associated Diseases. *Frontiers in veterinary science*, 8, 643220. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.643220>

Whatford, L., van Winden, S., & Häslar, B. (2022). A systematic literature review on the economic impact of endemic disease in UK sheep and cattle using a One Health conceptualisation. *Preventive veterinary medicine*, 209, 105756. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105756>

Wiktorczyk-Kapischke, N., Grudlewska-Buda, K., Walecka-Zacharska, E., Kwiecińska-Piróg, J., Radtke, L., Gospodarek-Komkowska, E., & Skowron, K. (2021). SARS-CoV-2 in the environment -Non-droplet spreading routes. *The Science of the total environment*, 770, 145260. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145260>

Woo, P.C.Y; Susanna, K. P; Carol, S. F; Lam, A.C.C.Y; Lau, A K. L; Tsang, A; Jonh, H. N; Jade, L. L; Teng,C. C. C; Wang, T.M; Zheng, B.J. (2012). Discovery of Seven

Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *J Virol*, v. 86, n. 7, p. 3995–4008.

Zhang, X. M., Herbst, W., Kousoulas, K. G., & Storz, J. (1994). Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child. *Journal of medical virology*, 44(2), 152–161. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890440207>.

Zhang F, Wang Y. (2023). HEV Cell Culture. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1417: 119-131. doi: 10.1007/978-981-99-1304-6_8. PMID: 37223862.

Zhu, Q., Li, B., Sun, D. (2022). Advances in Bovine Coronavirus Epidemiology. In *Viruses* (Vol. 14, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v14051109>

Artigo científico formatado e submetido à revista PlosOne
(<https://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines#loc-references>).

A systematic review of the presence of bovine coronavirus on environmental surfaces

Abstract

Bovine coronavirus (BCoV) is a pervasive pathogen in the global cattle population, leading to both enteric and respiratory infections. The primary mode of BCoV transmission among cattle is direct horizontal contact. However, indirect transmission through surface contamination, as previously reported for SARS-CoV-2 in humans, is also plausible. Given the recent extensive research on SARS-CoV-2, this study aims to evaluate the literature on the presence of BCoV on environmental surfaces through a systematic review adhering to PRISMA recommendations. The literature search was conducted in March and April 2023, without any temporal restrictions on the consulted literature. The databases utilized for this search were PubMed, Springer, and Science Direct. The search terms “Bovine coronavirus” and “BCoV” were employed, yielding 867 articles. After applying exclusion criteria, three articles were selected for comprehensive review. The primary information was recorded using an extraction form designed to organize methods for detecting BCoV presence, methods for assessing BCoV infectivity, types of surfaces evaluated, and the type of study. Despite the limited number of studies investigating the presence of BCoV on surfaces, the findings suggest the potential for BCoV transmission via contaminated surfaces owing to the ability of the virus to remain infectious for up to 24 hours on boots and watches. This review underscores the need for further research on BCoV transfer and persistence in farm environments, an area currently lacking in focused studies.

Introduction

Coronaviruses (CoVs) represent a substantial group of viruses with a high propensity for infecting a multitude of species, including humans [1]. These viruses are spherical in shape, with diameters ranging from 60 to 220 nm. They are composed of structural proteins such as the hemagglutinin esterase (HE) associated with the envelope, spike glycoprotein (S), matrix glycoprotein (M), envelope protein (E), and nucleocapsid phosphoprotein (N). Additionally, several ORFs encode non-structural proteins that are responsible for the replication of single-stranded RNA viruses. Notably, these viruses possess the largest genome among all known RNA viruses [2,3].

The *Coronaviridae* family is subdivided into the subfamily *Coronavirinae*. This subfamily is further divided into four genera of significant importance because of their role in causing diseases in humans and various animal species: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus*, and *Deltacoronavirus*. The *Betacoronavirus* genus encompasses bovine coronavirus (BCoV), along with other prevalent species such as equine coronavirus (ECoV), porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (PHEV), human coronavirus OC43 (HCoV-OC43), and severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV1 and SARS-CoV2) [4]. The close genetic relationship among different *Betacoronavirus* strains elucidates their potential for zoonotic infections [5].

BCoV, endemic in the cattle population, exhibits dual tropism for enteric and respiratory cells. It is associated with neonatal diarrhea in calves, winter dysentery in adults, and respiratory infections in cattle across various age groups [6]. Clinical infections due to BCoV can lead to diminished growth performance in confined cattle, a decrease in milk production, and elevated morbidity rates in calves [6–11].

BCoV infection can occur through direct contact, either via the fecal-oral route or through aerosol inhalation [6]. Transmission between herds can occur directly via the transfer of live cattle [12]. Nevertheless, the potential for indirect transmission of BCoV should not be dismissed. Indirect transmission could occur through contamination by inert or inanimate surfaces. The risk factors for this indirect spread of the virus are contingent on the quantity of infectious virus present on these surfaces [13].

Similar to other CoVs [14–16], it is hypothesized that BCoV may retain its infectivity on abiotic surfaces and fomites for extended periods due to its genetic similarity with previously studied CoVs [3,17]. Comprehensive knowledge of all transmission routes is crucial for the prevention of infectious diseases. Given that the survival of BCoV on surfaces could directly impact clinical practices, such as hygiene guidelines and disinfection strategies, this study aimed to systematically review the presence of BCoV on various surfaces.

Materials and methods

A systematic literature review was conducted in March and April 2023, adhering to the revised Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines [18] (see S1 File for the checklist). The study protocol was not entered into any registry. The initial stage involved a preliminary search centered on the question: Does BCoV exist on environmental surfaces? Two independent, blinded reviewers executed comprehensive database searches using mesh search terms such as “survival”, “surface”, “environment”, “stability”, “contamination”, “infectivity”, “environment surface,” “inanimate surfaces,” and the obligatory term “Bovine coronavirus.” However, no specific BCoV studies could be identified using these terms, prompting us to broaden our search using only “Bovine coronavirus” or BCoV.

The databases utilized for this research included Elsevier (<https://www.sciencedirect.com>), Springer (<https://link.springer.com>), and PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Language did not serve as an exclusion criterion, and no restrictions regarding the time or type of publication were imposed.

Two reviewers (CRCF & SHW) independently and blindly performed the exclusion by title. This evaluation led to the exclusion of duplicate articles and those unrelated to the BCoV theme. Only original studies referencing BCoV were included, with review articles and short communications being excluded. Articles that did not investigate the presence of BCoV in the environment were also excluded. Any disagreements were addressed and resolved through consensus.

From the articles included in the systematic review, the authors of this paper extracted the following information using a pre-established form: detection methods for BCoV presence, BCoV infectivity identification methods, evaluated surface types, study type (experimental or observational), and the assessment of BCoV as a model for other CoVs.

A quality analysis was conducted to evaluate the risk of bias in the selected studies. For this step, two evaluators (SHW and CSS) independently rated the different studies and compared their results. Any disagreements on result were resolved by discussion and consensus. Three ratings for the quality were used: *low risk*, *some concern*, and *high risk*. *Low risk* indicates the study is judged to be at low risk of bias for all domains, *some concern* indicates the study is judged to raise some concerns

in at least one domain, but not to be at high risk of bias for any domain, and *high risk* indicates the study is judged to be at high risk of bias in at least one domain or the study is judged to have some concerns for multiple domains in a way that substantially lowers confidence in the result. To analyze the risk of bias, the revised Cochrane risk-of-bias tool for randomized trials (RoB 2) was used [19]. The RoB 2 included five bias domains: 1. Randomization process; 2. Deviations from intended interventions; 3. Missing data; 4. Measurement of the outcome; 5. Selection of the reported result.

Results

In the systematic literature search, 964 articles were identified for analysis (Fig 1). Of these, 249 (25.8%) were sourced from Springer, 243 (25.2%) from PubMed, and 472 (48.9%) from ScienceDirect. Upon removing 97 (10%) duplicate articles, 867 remained for further scrutiny. Based on the exclusion criteria by title, 733 articles were subsequently excluded. The primary reasons for these exclusions were: studies on mathematical and physical sciences (n = 131); studies focusing on the molecular aspects of BCoV (n = 103); studies involving species other than cattle (n = 107); treatment and vaccination studies (n = 38); and studies on other pathogens and viruses (n = 30). Of the remaining 91 studies subjected to abstract reading, 88 were excluded as they did not address the presence of BCoV in the environment. Consequently, three studies were selected for further investigation: Mullis, et al. [20]; Oma, et al. [13], and Watanabe, et al. [21]. In the overall risk-of-bias judgement, all the three included studies were judged as low risk of bias.

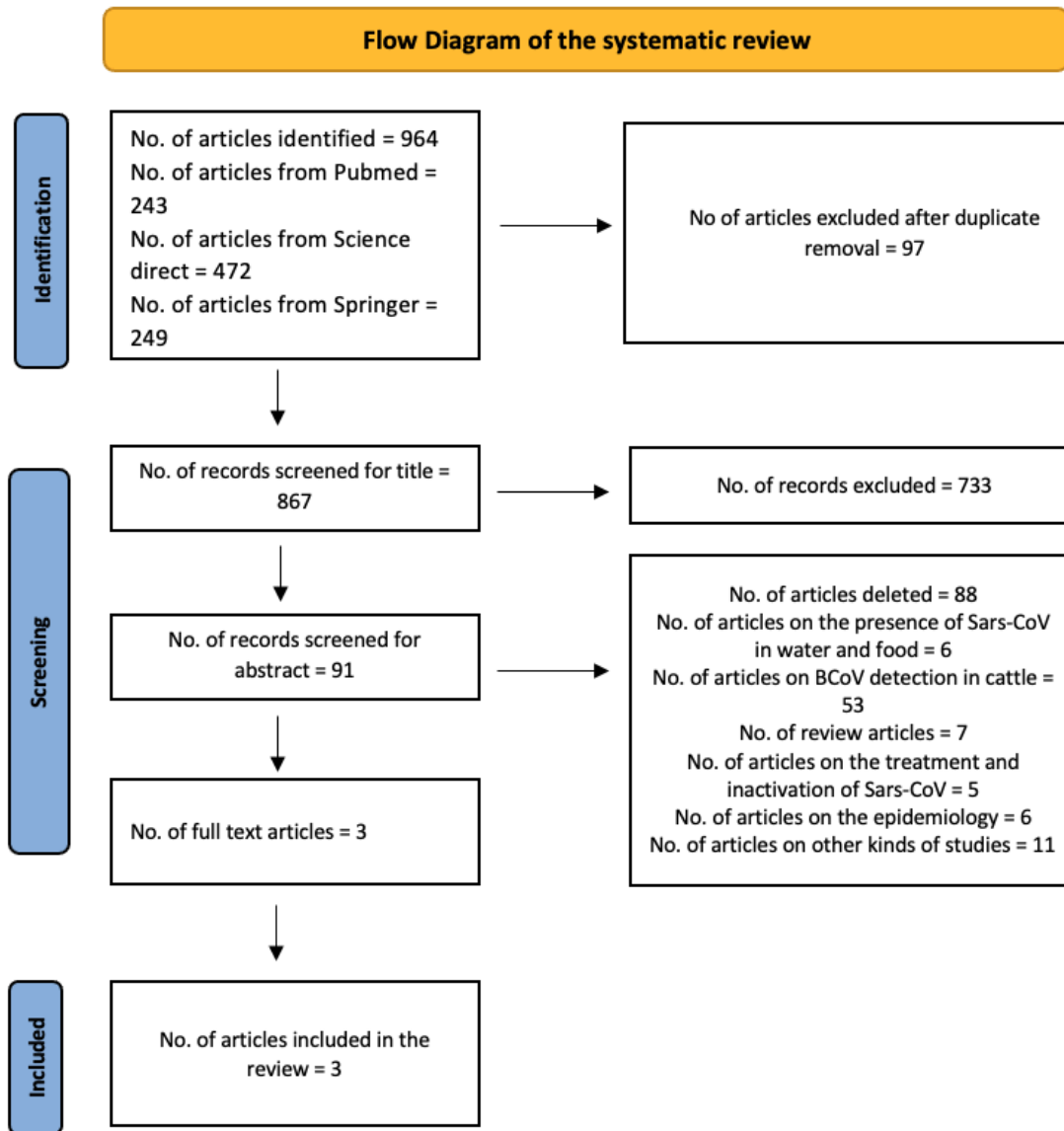


Fig 1. Flowchart of the research and number of articles identified in the systematic review of BCoV presence on environmental surfaces.

Mullis, et al. [20] aimed to utilize BCoV as a model to investigate the infectivity and potential transmission of CoV, with a particular focus on Severe acute respiratory syndrome (SARS) cases, due to the recent inclusion of SARS-CoVs in a list of viruses with potential for foodborne transmission [22]. To achieve this, the authors investigated the presence and infectivity of the BCoV 88 strain on romaine lettuce leaves' surface. Bovine fecal suspensions (0.1% and 10%) were created to mimic mild and heavy fecal contamination (1 ppm and 100 ppm), respectively. Additionally, minimum essential medium (MEM) was used to dilute the BCoV. Each lettuce piece was sprayed with 100 mL of the

virus preparations, left to dry for 2 hours in a biosafety cabinet, and subsequently frozen at 4°C until elution and virus presence analysis via qRT-PCR. Viral infectivity tests were conducted by culturing with a plaque assay on 3- to 5-day-old HRT-18 cell monolayers. These were rinsed and incubated with MEM without fetal bovine serum (FBS) for 3 hours at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The experiment revealed that viral RNA was present on the lettuce surface at all time points (up to 30 days), although RNA levels significantly fluctuated based on the suspension used. In terms of infectivity, BCoV retained its infectivity for a minimum of 14 days. The study concluded that vegetables contaminated with the virus could potentially serve as vehicles for the zoonotic transmission of coronaviruses to humans.

The study by Oma, et al. [13] determined the duration of viral RNA carriage and the infectivity of viral particles on fomites and human nasal mucosa after exposure to BCoV. In this study, the natural contamination of fomites by infectious BCoV was described for the first time. The experiment was conducted during an outbreak of BCoV infection in 10 calves aged 6 – 12 weeks. Human nasal mucosa samples from 16 persons as well as from 44 sources of fomites (such as clothes, boots, watches, and stethoscopes) were collected before and after exposure to the infected calves at different times to assess the presence of BCoV. Subsequently, the virus infectivity was tested on five of these samples that showed the highest levels of BCoV RNA, using cell culture integrated with RT-qPCR. After 30 minutes of exposure, the virus was detected in 46% (n = 80) of human nasal mucosa swabs by RT-qPCR. After two, four, and six hours, 15%, 5%, and 0% of swabs tested positive, respectively. Among the fomite samples, 97% (n = 44) carried a high viral RNA load (per log₁₀ copy numbers) 24 hours after exposure. Although no virus with infectivity was detected in the nasal mucosa, it was detected in 2 out of 3 fomite samples. Thence, the authors concluded that fomites (such as clothes, boots, watches, and stethoscopes) exposed to the virus represent a risky source of infection for cattle. In particular, fomites appeared to represent a high-risk source, as infective virus particles were detected even after 24 hours of exposure.

Watanabe, et al. [21] conducted a study to investigate the infectivity potential of SARS-CoV-2 on various porous and non-porous environmental surfaces. The CS5 strain of BCoV, propagated in HRT-18G cell culture in Dulbecco's modified Eagle's medium, was used as the model. The culture

was incubated for five days at 37°C in a 5% CO₂ environment, then purified and diluted tenfold. Following incubation, the cells were examined for a virus-induced cytopathic effect (CPE). Virus titers were determined using the Reed–Muench method. Subsequently, the virus was introduced to 15 different porous and non-porous surfaces to assess the recovery time and infectivity. BCoV was detectable after 4 hours on brass, 7 hours on soft polyvinyl chloride, 22 hours on ceramics, 25 hours on melamine resin, 29 hours on stainless steel, 35 hours on glass, 48 hours on polystyrene, 62 hours on polypropylene, 65 hours on polyethylene, and 81 hours on acrylic resin. In contrast, the recovery time for SARS-CoV-2 on non-porous substrates was 3 hours on soft polyvinyl chloride and 11 hours on ceramic tiles. On porous substrates, such as disposable masks, it took 19 hours. Surface roughness did not directly influence the survival capacity of BCoV. The levels of infectious BCoV recovery after surface fixation varied between substrates with similar physical characteristics. The study demonstrated the value of BCoV as a model virus for testing the recovery of infectious SARS-CoV-2 from surfaces.

Discussion

The enduring viability of enteric and respiratory viruses in the environment has been recognized for several years. Hanson and Schipper [23] demonstrated that a bovine herpesvirus could survive in river water for a minimum of 12 hours. Casanova, et al. [24] found that the mouse hepatitis beta-coronavirus (MHV) remained viable in water and sewage for 17 days. Furthermore, the Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV), an alpha-coronavirus in pigs, was viable for 22 days and persisted on steel surfaces for over 28 days [25].

In light of the recent Covid-19 pandemic, numerous studies have reported the detection of SARS-CoV-2 on various surfaces within hospital settings [26–29]. Furthermore, a series of controlled studies [14,30–34] have yielded significant insights into the infectivity of SARS-CoV-2 across diverse environmental surfaces.

Given the data and the close genetic relationship with human CoVs, it is plausible that indirect transmission plays a significant role in BCoV infection. However, our understanding of this topic

remains limited, and the pathways of BCoV's indirect transmission are yet to be clarified. In the articles included for this systematic review, Mullis, et al. [20], Oma, et al. [13], and Watanabe, et al. [21] employed RT-qPCR or RT-PCR to detect BCoV RNA on surfaces. These nucleic acid detection assays, considered among the most sensitive currently in use [6], are frequently employed in the diagnosis of BCoV infections. Decaro, et al. [35] analyzed 220 samples from cattle exhibiting enteric or respiratory symptoms using RT-qPCR, confirming that this method reduces processing time, minimizes contamination risk, and enhances specificity. Additional studies have also detected BCoV in fecal matter and nasal secretions using RT-PCR [36–40].

The presence of viral RNA alone is insufficient to ascertain its transmission potential; an assessment of the virus's infectivity is necessary. Consequently, virus isolation in cell culture can be conducted to demonstrate infectivity [28]. Mullis, et al. [20] and Watanabe, et al. [21] employed dilutions of samples containing BCoV to assess its viability on surfaces. These dilutions were prepared using viral cultures conducted in various cell culture media. Oma, et al. [13] suggested that although viral infectivity should be ideally studied in live animals, cell culture is utilized for practical, ethical, and economic considerations.

Clonal cell lines derived from HRT-18 cell cultures were utilized in these studies, typically employed for the isolation of BCoV from bovine enteric or respiratory samples [6]. Cell culture, a crucial research method in virology, is conducted to demonstrate virus viability [28,41]. This process necessitates the use of susceptible cell lines, within which viruses can propagate and produce observable cytopathic effects under microscopy [42], thereby indicating their viability. However, cultivating the viruses requires several days of incubation, potentially leading to variations in results based on the cell lines used. Additionally, a risk of reduced sensitivity exists in the presence of toxic compounds [43]. Furthermore, the use of specific virus concentrations in laboratory-simulated fecal suspensions may not accurately represent conditions in actual farm environments. Factors such as temperature and relative humidity significantly influence the duration of infectious virus presence on surfaces [44].

While the studies reviewed here did not evaluate temperature or relative humidity, it is crucial to note that lower temperatures and higher humidity generally promote the stability and infectivity of

human coronaviruses [44]. A study on canine coronavirus (CCV) revealed that the virus remains viable at temperatures below -20°C, but not above 4°C [45]. As for human CoVs, these factors have been investigated. Duan, et al. [46] examined the duration of Sars-CoV infectivity under simulated domestic conditions and discovered that the virus remained infectious at 4°C, 20°C, and 37°C for up to 120 minutes. Infectivity was eradicated after 90 minutes at 56°C, 60 minutes at 67°C, and 30 minutes at 75°C. However, low humidity did not significantly reduce infectivity for up to 72 hours. Chan, et al. [44] found that viruses dried on smooth surfaces maintained their viability for over five days at temperatures of 22–25°C and relative humidity of 40 to 50%. However, at temperatures of 38°C and relative humidity of 95%, this viability was rapidly lost.

Watanabe, et al. [21] conducted a comparative study on the viability of BCoV on porous and non-porous surfaces. They detected infectious BCoV on copy paper and polyester fabric for up to 18 hours, suggesting that BCoV could penetrate and become entrapped in the pores of porous surfaces such as soil or facility material, without losing its infectivity. Porous materials, including wood and cement, possess small spaces or pores that can capture and retain BCoV particles. These surfaces offer a conducive environment for the virus to survive and maintain its infectiousness over prolonged periods. For example, in a stable with a cement floor or wooden walls, BCoV particles could adhere to the surface and persist for several days, thereby escalating the risk of transmission to other animals. Furthermore, Boileau and Kapil [47] reported that BCoV could retain its infectiousness for up to 3 days in the presence of organic matter. They also found that BCoV could bind exceptionally well to clay, clay minerals, and coal *in vitro*, with an adsorption rate of 99%.

The correlation between decreased viral infectivity and moisture absorption by porous surfaces can be ascribed to desiccation processes. Desiccation, the removal of moisture from a surface, can lead to dehydration and potential damage to viral particles [48]. This phenomenon may also be associated with the diminished recovery of virions absorbed into the inner layers of the surface [49]. As stated by Chatterjee, et al. [48], porous surfaces possess a greater capacity for moisture absorption, thereby hastening the desiccation of the coronavirus. Conversely, impermeable surfaces retain more moisture, fostering an environment conducive to the prolonged survival of the virus.

Oma, et al. [13] suggested that fomites, including clothing, boots, watches, and stethoscopes, pose an infection risk for cattle when exposed to the virus. These fomites can become contaminated via direct contact with infected animals, thereby carrying and transmitting BCoV to susceptible hosts. Consequently, irrespective of the surface type, implementing appropriate cleaning and disinfection procedures is crucial to mitigate the risk of BCoV transmission.

Coronaviruses, such as BCoV, are enveloped viruses characterized by a lipid layer that encases their genetic material and structural proteins [5]. Exposure to high temperatures can lead to the denaturation of these structures, thereby inactivating the virus and inhibiting its ability to infect host cells [50]. The loss of infectivity can also result from the activity of lipases and proteases found in the bovine intestine. A study by Ren, et al. [51] reported a 10% decrease in BCoV infectivity in bovine fecal suspension compared to the suspension in FBS minimal medium. This suggests that the loss of the spike protein on the virus's surface or the envelope's loss could contribute to the reduction in BCoV infectivity. Consequently, it can be inferred that the fragility of the envelope in enveloped viruses may lead to a loss of infectivity, rendering them susceptible to inactivation by disinfection procedures. These procedures include the application of ethanol (62 and 71%), hydrogen peroxide (0.5%), or sodium hypochlorite (0.1%) on surfaces for 1 minute [52].

The reviewed articles generally derived the presence and infectivity of BCoV in environments from simulated experiments, which could have been influenced by numerous factors. Under natural conditions, the spread of BCoV in herds remains largely unknown. Given the high prevalence of morbidities caused by the infection [53], it is crucial to understand the virus's circulation within herds. The inter-herd movement of cattle is a significant transmission route. Additionally, indirect dissemination may occur through individuals moving between herds, potentially carrying the virus on their clothing or equipment [13,54].

The interpretation of these results carries significant implications for BCoV transmission, indicating that indirect transmission via contaminated surfaces could be plausible, thereby posing a threat to both animals and humans. This highlights the necessity for biosafety precautions to inhibit BCoV propagation. One such precaution involves the utilization of personal protective equipment (PPE) by veterinarians and other individuals who interact with infected animals and potentially

contaminated environments. The consistent use and replacement of PPE when transitioning between properties can aid in diminishing the transmission risk. This encompasses the use of gloves, masks, and gowns that can obstruct direct contact with surfaces potentially contaminated with BCoV. Regular replacement and appropriate disposal of PPE are crucial to ensure the removal of any potential viral particles, thereby eliminating any transmission risk.

In constructing cattle facilities, it is advisable to prioritize less porous materials. Surfaces that are smooth and non-absorbent, such as metal, treated wood, tiles and vitrified cement, are beneficial due to their ease of cleaning and disinfection. Given that the virus retains viability in damp environments, it is crucial to ensure that cattle housing areas remain covered and dry. The use of straw to cover earthen floors can help prevent direct contact between the cattle and the ground.

Limited data exists regarding the transfer and persistence of BCoV in farm environments. The virus may be present in various locations such as corrals, as well as on different fomites within the cattle breeding environment. Answering these questions could prove beneficial in developing prevention protocols against the indirect spread of the virus in bovine farms.

Conclusion

This systematic review reveals that BCoV can endure on fomites, thereby suggesting the possibility of indirect transmission via contaminated surfaces. Despite the abundance of studies focusing on the direct detection of the virus in cattle, there is a notable scarcity of research investigating its presence and viability in the environment. Consequently, further research is imperative to comprehensively understand the dynamics of indirect transmission on farms, considering the intricate interplay among the virus, environment, and management practices.

References

1. Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res.* 2006;66: 193-292. doi: [10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3), PMID: [16877062](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16877062/), PMCID: [PMC7112330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7112330/).
2. Lai MM, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res.* 1997;48: 1-100. doi: [10.1016/S0065-3527\(08\)60286-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60286-9), PMID: [9233431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9233431/), PMCID: [PMC7130985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7130985/).

3. Vijgen L, Keyaerts E, Moës E, Thoelen I, Wollants E, Lemey P, et al. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. *J Virol*. 2005;79: 1595-1604. doi: [10.1128/JVI.79.3.1595-1604.2005](https://doi.org/10.1128/JVI.79.3.1595-1604.2005).
4. Miranda C, Silva V, Igrejas G, Poeta P. Genomic evolution of the human and animal coronavirus diseases. In: *Mol Biol Rep* (Vol. 48, Issue 9, pp. 6645–6653). Springer Science and Business Media B.V. 2021;48: 6645–6653. doi: [10.1007/s11033-021-06632-2](https://doi.org/10.1007/s11033-021-06632-2).
5. Hodnik JJ, Ježek J, Starič J. Coronaviruses in cattle. *Trop Anim Health Prod*. 2020;52: 2809-2816. doi: [10.1007/s11250-020-02354-y](https://doi.org/10.1007/s11250-020-02354-y). [Epub 2020 Jul 17]. PMID: [32681447](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32681447/), PMCID: [PMC7367658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7367658/).
6. Saif LJ. Bovine respiratory coronavirus. In: *Vet Clin North Am Food Anim Pract* (Vol. 26, Issue 2, pp. 349–364). 2010;26: 349–364. doi: [10.1016/j.cvfa.2010.04.005](https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.005).
7. Takiuchi E, Alfieri AF, Alfieri AA. Molecular analysis of the bovine coronavirus S1 gene by direct sequencing of diarrheic fecal specimens. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41: 277–282. doi: [10.1590/S0100-879X2008000400004](https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008000400004).
8. Lorenzetti E, Leme RDA, Ribeiro J, Souza VR, Alfieri AF, Alfieri AA. Neonatal diarrhea by bovine coronavirus (BCoV) in beef cattle herds. *Sem Ci Agr*. 2013;34(6 suppl. 2): 3795–3800. doi: [10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3795](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3795).
9. Ribeiro J, Lorenzetti E, Alfieri AF, Alfieri AA. Molecular detection of bovine coronavirus in a diarrhea outbreak in pasture-feeding Nellore steers in southern Brazil. *Trop Anim Health Prod*. 2016;48: 649–653. doi: [10.1007/s11250-015-0975-4](https://doi.org/10.1007/s11250-015-0975-4).
10. Bok M, Alassia M, Frank F, Vega CG, Wigdorovitz A, Parreño V. Passive immunity to control Bovine coronavirus diarrhea in a dairy herd in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2018;50: 23–30. doi: [10.1016/j.ram.2017.03.007](https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.03.007).
11. Brunauer M, Roch FF, Conrady B. Prevalence of worldwide neonatal calf diarrhoea caused by bovine rotavirus in combination with bovine coronavirus, *Escherichia coli* K99 and *Cryptosporidium* spp.: a Meta-Analysis and *Cryptosporidium* spp.: A Meta-Analysis. *Animals* (Basel). 2021;11: 11(4):1014. doi: [10.3390/ani11041014](https://doi.org/10.3390/ani11041014), PMID: [33916839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33916839/), PMCID: [PMC8066230](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC8066230/).

12. Oma VS, Tråvén M, Alenius S, Myrmel M, Stokstad M. Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the potential for transmission. *Virol J.* 2016;13: 100. doi: [10.1186/s12985-016-0555-x](https://doi.org/10.1186/s12985-016-0555-x).
13. Oma VS, Klem T, Tråvén M, Alenius S, Gjerset B, Myrmel M, et al. Temporary carriage of bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus by fomites and human nasal mucosa after exposure to infected calves. *BMC Vet Res.* 2018;14: 22. doi: [10.1186/s12917-018-1335-1](https://doi.org/10.1186/s12917-018-1335-1), PMID: [29357935](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29357935/), PMCID: [PMC5778652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5778652/).
14. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med.* 2020;382: 1564–1567. doi: [10.1056/NEJMc2004973](https://doi.org/10.1056/NEJMc2004973).
15. Riddell S, Goldie S, Hill A, Eagles D, Drew TW. The effect of temperature on persistence of SARS-CoV-2 on common surfaces. *Virol J.* 2020;17: 145. doi: [10.1186/s12985-020-01418-7](https://doi.org/10.1186/s12985-020-01418-7), PMID: [33028356](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33028356/), PMCID: [PMC7538848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7538848/).
16. Liu Y, Li T, Deng Y, Liu S, Zhang D, Li H, et al. Stability of SARS-CoV-2 on environmental surfaces and in human excreta. *J Hosp Infect.* 2021;107: 105-107. doi: [10.1016/j.jhin.2020.10.021](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.10.021). [Epub 2020 Nov 1]. PMID: [33137445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33137445/), PMCID: [PMC7603996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7603996/).
17. Bidokhti MRM, Tråvén M, Ohlson A, Baule C, Hakhverdyan M, Belák S, et al. Tracing the transmission of bovine coronavirus infections in cattle herds based on S gene diversity. *Vet J.* 2012;193: 386–390. doi: [10.1016/j.tvjl.2011.12.015](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.12.015).
18. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt, PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ.* 2021;372: n71. doi: [10.1136/bmj.n71](https://doi.org/10.1136/bmj.n71).
19. Sterne JAC, Savovic J, Page MJ, et al. Rob 2: A revised tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ* 2019; 366:l4898. <https://doi.org/10.1136/bmj.l4898> PMID: 31462531
20. Mullis L, Saif LJ, Zhang Y, Zhang X, Azevedo MS. Stability of bovine coronavirus on lettuce surfaces under household refrigeration conditions. *Food Microbiol.* 2012;30: 180-186. doi: [10.1016/j.fm.2011.12.009](https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.009). [Epub 2011 Dec 13]. PMID: [22265299](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22265299/), PMCID: [PMC4980993](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4980993/).

21. Watanabe M, Ohnishi T, Arai S, Kawakami T, Hayashi K, Ohya K, et al. Survival of SARS-CoV-2 and bovine coronavirus on common surfaces of living environments. *Sci Rep.* 2022;12: 10624. doi: [10.1038/s41598-022-14552-9](https://doi.org/10.1038/s41598-022-14552-9), PMID: [35739204](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35739204/), PMCID: [PMC9218704](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC9218704/).
22. FAO/WHO. Viruses in food: scientific advice to support risk management activities: meeting Report; 2008.
23. Hanson BR, Schipper IA. Retention and recovery of a herpesvirus from North Dakota natural waters. *Proceedings of the North Dakota Academy of Science.* 1975;29: 12.
24. Casanova L, Rutala WA, Weber DJ, Sobsey MD. Survival of surrogate coronaviruses in water. *Water Res.* 2009;43: 1893–1898. doi: [10.1016/j.watres.2009.02.002](https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.02.002). PMID: **19246070**, PMCID: [PMC7112071](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7112071/)
25. Casanova LM, Jeon S, Rutala WA, Weber DJ, Sobsey MD. Effects of air temperature and relative humidity on coronavirus survival on surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76: 2712-2717. doi: [10.1128/AEM.02291-09](https://doi.org/10.1128/AEM.02291-09). [Epub 2010 Mar 12]. PMID: [20228108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20228108/), PMCID: [PMC2863430](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2863430/).
26. Guo ZD, Wang Z-Y, Zhang SF, Li X, Li L, Li C, et al. Aerosol and surface distribution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in hospital wards, Wuhan, China, 2020. *Emerg Infect Dis.* 2020;26: 2607.200885. doi: [10.3201/eid](https://doi.org/10.3201/eid).
27. Ryu BH, Cho Y, Cho OH, Hong SI, Kim S, Lee S. Environmental contamination of SARS-CoV-2 during the COVID-19 outbreak in South Korea. *Am J Infect Control.* 2020;48: 875–879. doi: [10.1016/j.ajic.2020.05.027](https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.05.027).
28. Razzini K, Castrica M, Menchetti L, Maggi L, Negroni L, Orfeo NV, et al. SARS-CoV-2 RNA detection in the air and on surfaces in the COVID-19 ward of a hospital in Milan, Italy. *Sci Total Environ.* 2020;742: 140540. doi: [10.1016/j.scitotenv.2020.140540](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140540). [Epub 2020 Jun 26]. PMID: [32619843](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32619843/), PMCID: [PMC7319646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7319646/).
29. Santarpia JL, Rivera DN, Herrera V, Morwitzer MJ, Creager H, Santarpia GW, et al. Transmission potential of SARS-CoV-2. In: *Viral Shedding Observed Univ Nebr Med Cent medRxiv.* 2020.03.23.20039446. doi: [10.1101/2020.03.23.20039446](https://doi.org/10.1101/2020.03.23.20039446).

30. Biryukov J, Boydston JA, Dunning RA, Yeager JJ, Wood S, Reese AL, et al. Increasing temperature and relative humidity accelerates inactivation of SARS-CoV-2 on surfaces. *mSphere*. 2020;5: e00441-20. doi: [10.1128/mSphere.00441-20](https://doi.org/10.1128/mSphere.00441-20), PMID: [32611701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32611701/), PMCID: [PMC7333574](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7333574/).
31. Chin A, Chu J, Perera M, Hui K, Yen H, Chan M, et al. Stability of SARS CoV-2 in different environments. *Lancet Microbe*. 2020;1: e10. doi: [10.1016/S2666-5247\(20\)30003-3](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30003-3).
32. Colaneri M, Seminari E, Novati S, Asperges E, Biscarini S, Piralla, A, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 RNA contamination of inanimate surfaces and virus viability in a health care emergency unit. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020, 26, 1094.e1–1094.e5.
33. Morris DH, Yinda KC, Gamble A, Rossine FW, Huang Q, Bushmaker T, et al. The effect of temperature and humidity on the stability of SARS-CoV-2 and other enveloped viruses. *Biol Res*. 2020;XIV. doi: [10.1101/2020.10.16.341883](https://doi.org/10.1101/2020.10.16.341883), 10.16.341883.
34. Carraturo F, Del Giudice C, Morelli M, Cerullo V, Libralato G, Galdiero E, Guida M. Persistence of SARS-CoV-2 in the environment and COVID-19 transmission risk from environmental matrices and surfaces. *Environ. Pollut.* 2020;265: 115010. doi: [10.1016/j.envpol.2020.115010](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115010)
35. Decaro N, Elia G, Campolo M, Desario C, Mari V, Radogna A, et al. Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. *J Virol Methods*. 2008;151: 167-171. doi: [10.1016/j.jviromet.2008.05.016](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.05.016). [Epub 2008 Jun 24]. PMID: [18579223](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18579223/), PMCID: [PMC7112840](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7112840/).
36. Cho KO, Hasoksuz M, Nielsen PR, Chang KO, Lathrop S, Saif LJ. Cross- protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Arch Virol*. 2001;146: 2401–19. doi: [10.1007/s007050170011](https://doi.org/10.1007/s007050170011) PMID: [11811688](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11811688/), PMCID: [PMC7087283](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7087283/).
37. Kanno T, Ishihara R, Hatama S, Uchida I, A. long-term animal experiment indicating persistent infection of bovine coronavirus in cattle. *J Vet Med Sci*. 2018; 80: 1134–7. doi: [10.1292/jvms.18-0050](https://doi.org/10.1292/jvms.18-0050). PMID: [29780039](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29780039/), PMCID: [PMC6068295](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6068295/).
38. Castells M, Giannitti F, Caffarena RD, Casaux ML, Schild C, Castells D, et al. Bovine coronavirus in Uruguay: genetic diversity, risk factors and transboundary introductions from neighboring countries. *Arch Virol*. 2019;164: 2715–2724. doi: [10.1007/s00705-019-04384-w](https://doi.org/10.1007/s00705-019-04384-w).

39. Singh S, Singh R, Singh KP, Singh V, Malik YPS, Kamdi B, et al. Prevalence of bovine coronavirus infection in organized dairy farms of Central and North regions, India. *Biol Rhythm Res*. 2019;22: 1–7. doi: [10.1080/09291016.2019.1629093](https://doi.org/10.1080/09291016.2019.1629093).
40. Lotfollahzadeh S, Madadgar O, Reza Mohebbi M, Reza Mokhber Dezfouli M, George Watson D. Bovine coronavirus in neonatal calf diarrhoea in Iran. *Vet Med Sci*. 2020;6: 686-694. doi: [10.1002/vms3.277](https://doi.org/10.1002/vms3.277). [Epub 2020 Apr 29]. PMID: [32349194](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32349194/), PMCID: [PMC7267123](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7267123/).
41. Zhang F, Wang Y. HEV cell culture. *Adv Exp Med Biol*. 2023;1417: 119-131. doi: [10.1007/978-981-99-1304-6_8](https://doi.org/10.1007/978-981-99-1304-6_8), PMID: [37223862](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37223862/).
42. Dahling DR. Detection and enumeration of enteric viruses in cell culture. *CRC Rev Environ Contam*. 1991;21: 237-263. doi: [10.1080/10643389109388417](https://doi.org/10.1080/10643389109388417).
43. Rodríguez RA, Pepper IL, Gerba CP. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75: 297–307. doi: [10.1128/AEM.01150-08](https://doi.org/10.1128/AEM.01150-08). [Epub 2008 Nov 14]. PMID: [19011062](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19011062/), PMCID: [PMC2620694](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2620694/).
44. Chan KH, Peiris JSM, Lam SY, Poon LLM, Yuen KY, Seto WH. The effects of temperature and relative humidity on the viability of the SARS coronavirus. *Adv Virol*. 2011;2011: 734690. doi: [10.1155/2011/734690](https://doi.org/10.1155/2011/734690).
45. Tennant BJ, Gaskell RM, Gaskell CJ. Studies on the survival of canine coronavirus under different environmental conditions. *Vet Microbiol*. 1994;42: 255-9. doi: [10.1016/0378-1135\(94\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90024-8). PMID: [7886936](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7886936/), PMCID: [PMC7117527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7117527/).
46. Duan SM, Zhao XS, Wen RF, Huang JJ, Pi GH, Zhang SX, et al. Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. *Biomed Environ Sci*. 2003;16: 246–255.
47. Boileau MJ, Kapil S. Bovine coronavirus associated syndromes. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2010;26: 123-146, table of contents. doi: [10.1016/j.cvfa.2009.10.003](https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.003), PMID: [20117547](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20117547/), PMCID: [PMC7125561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7125561/).
48. Chatterjee S, Murallidharan JS, Agrawal A, Bhardwaj R. Why coronavirus survives longer on impermeable than porous surfaces. *Phys Fluids (1994)*. 2021;33: 021701. doi: [10.1063/5.0037924](https://doi.org/10.1063/5.0037924).

49. Shivkumar M, Adkin P, Owen L, Laird K. Investigation of the stability and risks of fomite transmission of human coronavirus OC43 on leather. *FEMS Microbiol Lett.* 2021;368: fnab112. doi: [10.1093/femsle/fnab112](https://doi.org/10.1093/femsle/fnab112), PMID: [34459482](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34459482/), PMCID: [PMC8499771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC8499771/).
50. Aboubakr HA, Sharafeldin TA, Goyal SM. Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: a review. *Transbound Emerg Dis.* 2021;68: 296-312. doi: [10.1111/tbed.13707](https://doi.org/10.1111/tbed.13707). [Epub 2020 Jul 14]. PMID: [32603505](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32603505/), PMCID: [PMC7361302](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7361302/).
51. Ren SY, Wang WB, Hao YG, Zhang HR, Wang ZC, Chen YL, et al. Stability and infectivity of coronaviruses in inanimate environments. *World J Clin Cases.* 2020;8: 1391–1399. doi: [10.12998/wjcc.v8.i8.1391](https://doi.org/10.12998/wjcc.v8.i8.1391).
52. Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect.* 2020;104: 246–251. doi: [10.1016/j.jhin.2020.01.022](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022).
53. Hägglund S, Svensson C, Emanuelson U, Valarcher JF, Alenius S. Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. *Vet J.* 2006;172: 320-328. doi: [10.1016/j.tvjl.2005.04.029](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.04.029). [Epub 2005 Jun 17]. PMID: [15964774](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15964774/), PMCID: [PMC7110557](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7110557/).
54. Toftaker I, Holmøy I, Nødtvedt A, Østerås O, Stokstad M. A cohort study of the effect of winter dysentery on herd-level milk production. *J Dairy Sci.* 2017; 100(8): 6483-6493. doi: [10.3168/jds.2017-12605](https://doi.org/10.3168/jds.2017-12605). [Epub 2017 Jun 7]. PMID: [28601443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28601443/), PMCID: [PMC7094253](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7094253/).

CAPÍTULO 3

Deteccção molecular de coronavírus bovino (BCoV) em superfícies abióticas de uma propriedade de bovinos leiteiros naturalmente infectados

Resumo

Coronavírus bovino (BCoV) é um vírus que afeta bovinos, causando diarreia neonatal e doenças respiratórias. O objetivo desse estudo foi investigar a presença do BCoV em diferentes superfícies de uma propriedade de bovinos leiteiros positivos para BCoV. Foram colhidas 61 amostras, incluindo fezes, secreção nasal e superfícies do ambiente (madeira, cimento, azulejo, comedouro, bebedouro, canzil, mamadeira) de diferentes lotes. A identificação molecular de BCoV foi realizada por meio da técnica de RT-semi-nested-PCR e confirmada por sequenciamento dos genes N e S1. Os resultados mostraram a presença do gene N do BCoV em 6/13 (46,1%) das amostras de fezes, 4/11 (36,4%) das amostras de secreção nasal. Das 37 amostras do ambiente, superfícies como bebedouros, comedouros e parede de madeira do bezerreiro foram positivas para BCoV, totalizando 27,0% de amostras de superfícies positivas. A análise entre as cepas identificadas nas amostras nasais, ambientais e fecais, respectivamente BRA/PR-45A, BRA/PR-37A e BRA/PR-8, revelou 99,7 a 99,8% de similaridade entre si. A mesma cepa de BCoV foi detectada nos bovinos e nas superfícies avaliadas. Estas cepas são ancestralmente diferentes das cepas protótipos, contudo foram agrupadas no mesmo cluster juntamente com outras cepas do Brasil. Conclui-se que BCoV está presente nos bovinos e em diferentes superfícies do ambiente de criação dos bovinos leiteiros avaliados, indicando a necessidade de estratégias de gestão abrangentes para controlar e mitigar a propagação do vírus em ambientes de produção leiteira.

Palavras-chave: BCoV; vaca leiteira; contaminação ambiental.

Abstract

Bovine Coronavirus (BCoV) is a virus that affects cattle, causing neonatal diarrhea and respiratory diseases. The aim of this study was to investigate the presence of BCoV on different surfaces of a dairy cattle farm that tested positive for BCoV. A total of 61 samples were collected, including feces, nasal secretion, and environmental surfaces (wood, cement, tile, feeding trough, water trough, stall, bottle) from different lots. The molecular identification of BCoV was carried out using the RT-semi-nested-PCR technique and confirmed by sequencing the N and S1 genes. The results showed the presence of the BCoV N gene in 6/13 (46.1%) fecal samples and 4/11 (36.4%) nasal secretion samples. Out of the 37 environmental samples, surfaces such as water troughs, feeding troughs, and the wooden wall of the calf pen were positive for BCoV, totaling 27.0% positive surface samples. The analysis of strains

identified in nasal, environmental, and fecal samples, nominees BRA/PR-45A, BRA/PR-37A, and BRA/PR-8, revealed 99.7 to 99.8% similarity among them. The same BCoV strain was detected in cattle and the evaluated surfaces. These strains are ancestrally different from prototype strains but were grouped in the same cluster along with other strains from Brazil. In conclusion, BCoV is present in cattle and on different surfaces within the environment of the evaluated dairy cattle farm, indicating the need for comprehensive management strategies to control and mitigate the spread of the virus in dairy production settings.

Keywords: BCoV; dairy cow; environmental contamination.

INTRODUÇÃO

Coronavírus bovino (BCoV) tem associação com doenças em bovinos de todas as idades. É um vírus pneumoentérico que infecta o trato respiratório e intestinal, ocasionando síndromes clínicas distintas em bovinos (Saif, 2010).

A diarreia neonatal causada pelo BCoV é altamente contagiosa e geralmente se manifesta nos primeiros dias de vida (Hodnik et al., 2020). Embora a diarreia neonatal seja a principal manifestação clínica associada a BCoV, o vírus também pode causar disenteria de inverno em bovinos adultos. A disenteria de inverno ocorre como um surto epidêmico, caracterizado pelo início súbito de diarreia com presença de sangue. Apesar da doença apresentar alta morbidade, a mortalidade é geralmente baixa (Natsuaki et al., 2007) ou nula (Brandão et al., 2007).

Doenças respiratórias em bovinos são frequentemente atribuídas ao BCoV (Vlasova e Saif, 2021). Quando o vírus atinge o trato respiratório, os locais primários da infecção são as células epiteliais da cavidade nasal e da traqueia (Clark, 1993). A infecção é caracterizada por tosse, dificuldade respiratória e secreção nasal (Saif, 2010).

BCoV é um vírus envelopado e pleomórfico, com diâmetro médio de 120 nm. O tamanho do genoma é de 27,6-32 kb e possui cinco proteínas estruturais principais: proteína do nucleocapsídeo - N, proteína da membrana - M, proteína do envelope - E, glicoproteína hemaglutinina esterase - HE e glicoproteína *spike* - S (Clark, 1993). A proteína N fica interna ao envelope e está associada ao RNA viral e, por ser altamente conservada, sua detecção é facilitada durante o diagnóstico (Vlasova e Saif, 2021). A glicoproteína S é responsável pela adsorção do vírus na célula hospedeira e frequentemente é utilizada para realizar a caracterização de diferentes cepas (Hasoksuz et al., 2002). As variações antigênicas na glicoproteína

S são provavelmente responsáveis pelo tropismo e especificidade do hospedeiro (Gallagher e Buchmeier, 2001).

A infecção por BCoV em bovinos ocorre por via fecal-oral ou pela inalação de aerossóis contendo o vírus, ocorrendo transmissão de forma direta (Saif, 2010). Há poucos relatos da possibilidade de transmissão por meio de fômites ou superfícies contaminadas com BCoV (Oma et al., 2016; Oma et al., 2018). Coronavírus (CoVs) humanos podem persistir viáveis em superfícies inertes/inanimadas por horas ou até mesmo dias (Sizun et al., 2000; Duan et al., 2003; Rabenau et al., 2005; van Doremalen et al., 2013; Warnes et al., 2015; Kampf et al., 2020). Devido à relação genética (Vijgen et al., 2006; Bidokhiti et al., 2012), BCoV pode apresentar um tempo de viabilidade em superfícies semelhantes aos CoVs humanos, como demonstrado experimentalmente em laboratório por Watanabe et al. (2022). Atualmente, as rotas potenciais de transmissão indiretas de BCoV nas fazendas ainda não estão claras; há poucas informações a respeito da presença do vírus no ambiente de criação dos bovinos.

Visando contribuir no conhecimento das fontes de infecção e possíveis rotas de transmissão, esse estudo teve como objetivo investigar a presença de BCoV em diferentes superfícies de uma propriedade de bovino leiteiros positivo para BCoV.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob no. 02226 (Anexo 1).

2.1 Seleção de uma propriedade para colheita de amostras

Inicialmente, para identificação de rebanhos positivos para BCoV, entre janeiro e junho de 2020, foram colhidas 200 amostras de fezes diarreicas e não diarreicas de bezerras lactentes confinadas, do nascimento até 40 dias de idade. Essas amostras foram provenientes de 33 propriedades leiteiras, localizadas na região dos Campos Gerais (municípios de Palmeira, Carambeí, Ponta Grossa, Castro, Arapoti, Fazenda Rio Grande), do estado do Paraná. As análises

moleculares foram realizadas no Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, conforme as técnicas descritas no item 2.3.

A partir dos resultados de rebanhos positivos para BCoV, uma das propriedades avaliadas foi selecionada, por conveniência, para a segunda parte do estudo e, assim investigar a presença do vírus no ambiente. A propriedade selecionada era localizada no município de Castro, região Centro-Leste do Estado do Paraná (Figura 1), situado a 996 metros de altitude, temperaturas máximas oscilando de 23 a 25°C e as mínimas de 11 a 13 °C. A propriedade possuía um total de 510 vacas em lactação, com produção diária total de 18 mil litros de leite. As bezerras eram mantidas em baias individuais do nascimento até o desmame. As baias possuíam parede de madeira não tratada com piso de terra.

Amostras foram colhidas de superfícies do ambiente das instalações onde havia diferentes categorias de bovinos (bezerras lactentes, bezerras em desmame, novilhas e vacas em lactação). Adicionalmente, para confirmar que BCoV continuava circulando nos animais do rebanho selecionado foram realizadas novas colheitas de amostras de fezes e secreção nasal.



Figura 1. Localização geográfica do município de Castro-PR

2.2.1 Colheita de amostras de fezes e de secreção nasal

A colheita das amostras de fezes individuais ($n = 10$) foi realizada diretamente do reto de bezerras e de vacas adultas que apresentavam diarreia e, em pool, foram colhidas na instalação das bezerras lactentes ($n = 1$), bezerras desmamadas ($n = 1$)

e novilhas (n = 1), sendo posteriormente acondicionadas em frascos esterilizados de 1,5 mL e armazenadas no freezer -20 °C. As amostras nasais individuais (n = 10) foram colhidas com *swab* estéril de 10 cm de comprimento, aproximadamente 5 cm foi inserido dentro de uma das narinas, rotacionado e deixando absorver as secreções. Também foram colhidas amostras de seis bezerras desmamadas e foi feito um pool (n = 1). Posteriormente, os *swabs* foram armazenados em 1 mL de PBS 10mM (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 15 mM KH₂HPO₄), pH 7.2, refrigerados a 4 °C durante o transporte e, posteriormente, e armazenadas a - 80 °C até o processamento.

2.2.2 Colheita de amostras em superfícies ambientais

A fim de investigar a presença de BCoV no ambiente, foram colhidas 37 amostras de superfícies e de fômites das instalações das bezerras lactentes, bezerras desmamadas, novilhas e vacas em lactação. Os locais amostrados foram selecionados de acordo com o maior contato dos bovinos com as superfícies. As amostras foram colhidas de superfícies de madeira (n = 6), cimento e azulejo (n = 8), canzil (n = 4), escovão (n = 2), comedouro (n = 5), bebedouro (n = 6), mamadeira (n = 3), pool do comedouro (n = 1), pool do bebedouro (n = 1), pool do canzil (n = 1). As amostras em pool, foram colhidas de todos os comedouros, bebedouros e canzil da instalação das bezerras. A colheita foi realizada com *swab* com ponta de algodão e haste de plástico, umedecendo a ponta com PBS 10mM antes de friccionar na área a ser avaliada. Posteriormente os *swabs* foram acondicionados em 1 mL de PBS 10mM a 4 °C durante o transporte e, posteriormente, a -80 °C até o processamento.

2.3 Identificação molecular de BCoV

2.3.1 Extração de RNA

Para a extração do RNA das fezes, em uma alíquota de 100 mg de fezes foi adicionado 1000 µL de PBS 10mM e homogeneizadas em vórtex. As amostras colhidas por *swab* (secreção nasal e ambiente) foram somente homogeneizadas, uma vez que estavam acondicionadas em PBS. Em seguida, foi realizada a clarificação de todas as amostras por centrifugação a 2000 RPM por 10 min e, após, foi realizada a extração de RNA a partir de uma alíquota de 200 µL do sobrenadante

pelo kit comercial Extracta 32 (Loccus®), conforme as recomendações do fabricante. O RNA extraído foi estocado a - 80 °C até o processamento.

2.3.2 Detecção molecular de BCoV

Para detecção da presença de RNA de BCoV no ambiente, utilizou-se a técnica de *semi-nested* RT-PCR tendo como alvo um fragmento de 251 pares de bases do gene N, conforme previamente descrito por Takiuchi et al. (2006). Adicionalmente, três amostras positivas para BCoV foram selecionadas (amostras de *swab* nasal, fezes e ambiente) para amplificação do gene S1 por RT-PCR conforme descrito por Takiuchi et al. (2008). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritos no Quadro 1. A cepa protótipo Mebus (código de acesso do Genbank U00735) foi utilizada como controle positivo. Alíquotas de água ultrapura estéril tratada com dietilpirocarbonato foram incluídas como controles negativos em todas as reações.

2.3.3. Análise dos produtos amplificados

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM bórico ácido; EDTA 2 mM), sob voltagem constante (100V) durante aproximadamente 60 minutos. O gel foi corado com GelRed® (0,5 g/ml) para posterior visualização dos amplicons em transiluminador UV.

Quadro 1- Oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do produto amplificado e ensaio molecular utilizados para detecção do gene N e S1 de coronavírus bovino (BCoV) descritos por Takiuchi et al. (2006) e Takiuchi et al. (2008), respectivamente.

Nome do Oligonucleotideo iniciador	Sequência (5´-3´)	Tamanho <i>amplicon</i> (bp)	Ensaio
BCoV1	CGATGAGGCTATTCCGAC	454	RT-PCR
BCoV2	TGTGGGTGCGAGTTCTGC	251	semi-nested- RT-PCR
BCoV3	TTGCTAGTCTTGTTCTGGC		
SPK1_F	ATGTTTTTGATACTTTTAATT	438	RT-PCR
SPK1-R	ATTGGTAGTATGTGGTTGT		
SPK2-F	TATGGCACTGAAGGGAAC	531	
SPK2-R	CTATTACAAGTCAAAGGCA		
SPK3-F	TGGCATTGGGATACAGGT	572	
SPK3-R	CAAGTAAATGAGTCTGCCT		
SPK4-F	GCAGATGTTTACCGACGT	537	
SPK4-R	TACACACAAAGACCCATCC		
SPK5-F	GAATTGATACTACTGCTAC	649	
SPK5-R	TCATAATTAACACAAACACC		
SPK6-F	GTAATCCTTGTACTIONGCC	1223	
SPK6-R	TAGTAAACCGATAACCAGT		
SPK7-F	TAACCTTCCGAACCAGCA	635	
SPK7-R	AATCGCTTCCTAAACAACC		

Obs.: bp – pares de bases

2.3.4. Sequenciamento

Das amostras positivas, 3 foram escolhidas para sequenciamento, uma amostra de fezes (BRA/PR-8), uma amostra de secreção nasal (BRA/PR-37A) e uma amostra do ambiente (BRA/PR-45A) para análises de sequenciamento de

nucleotídeo (nt). Os *amplicons* foram purificados usando *PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit* (Invitrogen® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e quantificados usando *Qubit Fluorometer* (Invitrogen® Life Technologies, Eugene, OR, USA). O sequenciamento direto foi realizado usando *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) com o *primers forward* e *reverse* no sequenciador 3500 *Genetic Analyzer*.

Análises de qualidade da sequência e as sequências consenso foram obtidas usando o *software* Phred e CAP3 ([//asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/](http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/)), respectivamente. Pesquisas de similaridade foram realizadas com sequências nt depositadas no banco de dados do GenBank, usando o *software Basic Local Alignment Search Tool* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Alinhamentos múltiplos e emparelhados foram realizados com cepas disponíveis no GenBank com o *software MEGA* versão 7.0.26 (Kumar e Tamura, 2016), e as matrizes de identidade de sequências de nt foram construídas usando o *Software BioEdit* versão 7.2.5 (Hall, 1999). Árvores filogenéticas baseadas em sequências nt dos genes N e S1 de BCoV foram obtidas usando o método de máxima verossimilhança com o tempo geral modelo reversível (Nei e Kumar, 2000) usando o *software MEGA* versão 7.0.26 (Kumar e Tamura, 2016). As probabilidades de *bootstrapping* foram calculadas usando 1000 réplicas.

3. RESULTADOS

3.1. Detecção molecular de BCoV

Dentre as amostras colhidas para o estudo, o gene N de BCoV foi identificado em 6/13 (46,1%), 4/11 (36,4%) e 10/37 (27%) das amostras de fezes, secreção nasal e superfícies ambientais avaliadas, respectivamente. Das amostras ambientais positivas, o gene N de BCoV foi detectado nas superfícies de madeira (3/6 – 50%), cimento e azulejo (1/8 – 12,5%), do comedouro (1/5 – 20%), bebedouro (2/6 – 33,3%), da mamadeira (1/3 – 33,3%), pool do comedouro (1/1 – 100%) e pool do bebedouro (1/1 – 100%).

3.2. Análise parcial do gene N

A análise de sequenciamento confirmou a especificidade dos *amplicons* de BCoV obtidos das amostras de fezes (BRA/PR-8), secreção nasal (BRA/PR-37A) e do ambiente (BRA/PR-45A). As sequências parciais do gene N das três amostras de BCoV descritas neste estudo foram comparadas com 42 cepas de BCoV disponíveis no GenBank, incluindo cepas brasileiras, norte-americanas, europeias e asiáticas. A análise comparativa entre as cepas de BCoV identificadas neste estudo revelou 100% de identidade de nt entre si. Além disso, as cepas do BCoV exibiram 98,5 a 99,6% de similaridade com outras cepas respiratórias brasileiras de BCoV (Números de acesso do GenBank: MT350497 e MT350498, e MT350500 a MT350505) e 98,5% de similaridade com as cepas protótipo Mebus, Quebec e Kakegawa (números de acesso do GenBank: U00735, AF20295 e AB354579, respectivamente).

A análise filogenética revelou três grupos principais (clusters I, II e III) (Figura 1) de sequências de BCoV. O cluster I consiste em cepas históricas de BCoV, incluindo as cepas de referência Mebus, Quebec e Kakegawa (números de acesso GenBank U00735, AF20295 e AB354579, respectivamente). As três cepas de BCoV identificadas neste estudo foram agrupadas no cluster II juntamente com cepas descritas na Ásia e no EUA e outras cepas brasileiras do Paraná. Finalmente, o cluster III é formado por cepas europeias de BCoV e outras cepas respiratórias brasileiras de BCoV.

3.3. Análise parcial do gene S1

A análise entre as cepas identificadas neste estudo (BRA/PR-45A, BRA/PR-37A e BRA/PR-8) revelou 99,7 a 99,8% de similaridade entre si. Adicionalmente, essas cepas de BCoV demonstraram 98,6 a 99,6% de similaridade com outras cepas brasileiras de BCoV e 96,5, a 96,8% de similaridade com as cepas protótipo Mebus, Quebec e Kakegawa (números de acesso GenBank U00735, AF20295 e AB354579, respectivamente).

Na análise filogenética do gene S1, as cepas de BCoV identificadas neste agruparam-se com cepas brasileiras anteriormente identificadas em doença respiratória e entérica (Figura 2).

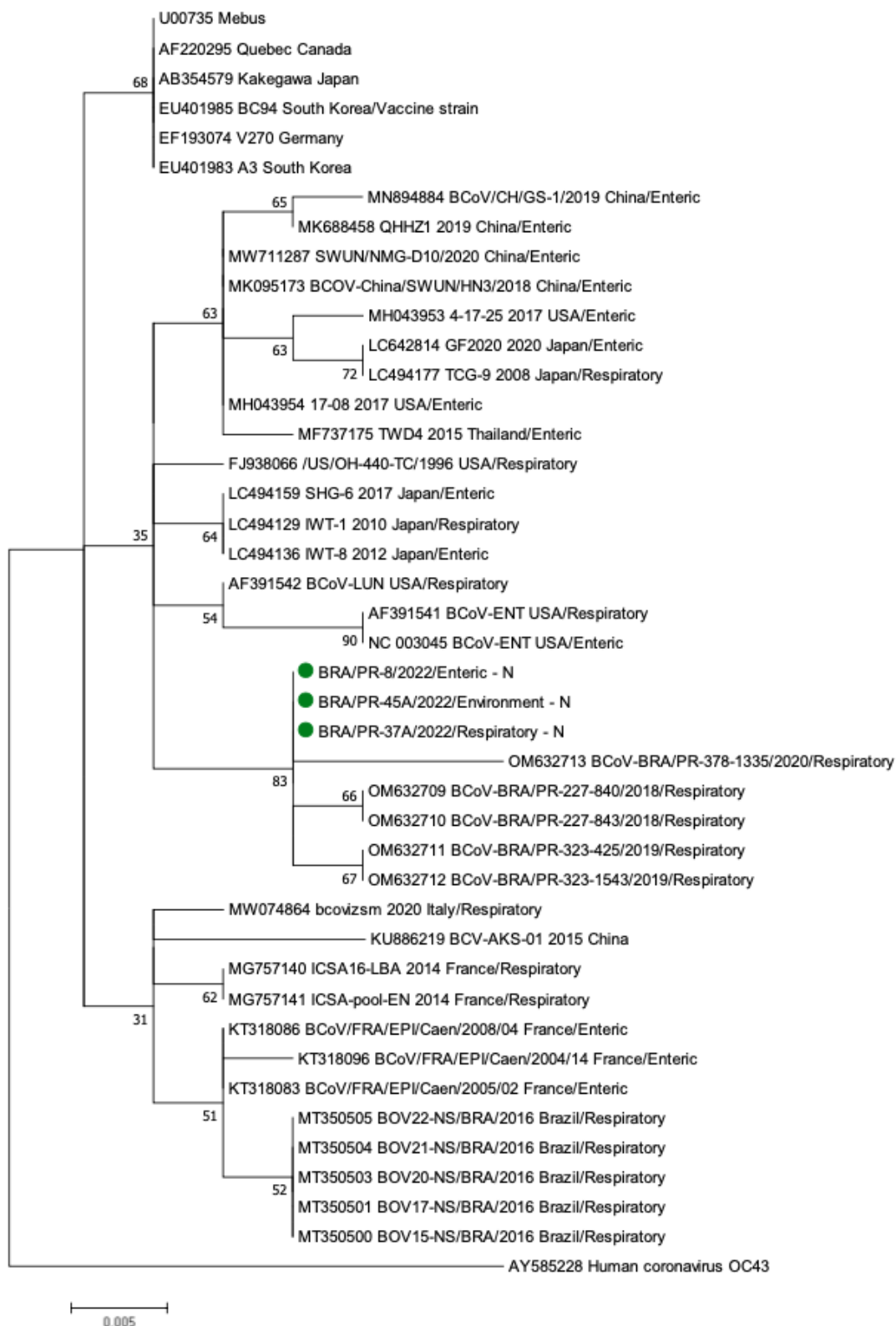


Figura 2. Análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança do gene N parcial (285 nt) de cepas de coronavírus bovino. A história evolutiva foi inferida usando o método de máxima verossimilhança baseado no modelo geral reversível no tempo. A porcentagem de árvores nas quais os táxons associados estão agrupados é mostrada ao lado dos galhos. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos medidos no número de substituições por local. A análise envolveu 42 sequências de nucleotídeos do coronavírus bovino. Uma sequência OC43 de coronavírus humano foi usada como grupo externo. Análises evolutivas foram realizadas no MEGA7. As cepas de BCoV identificadas neste estudo estão marcadas com círculos preenchidos em verde.

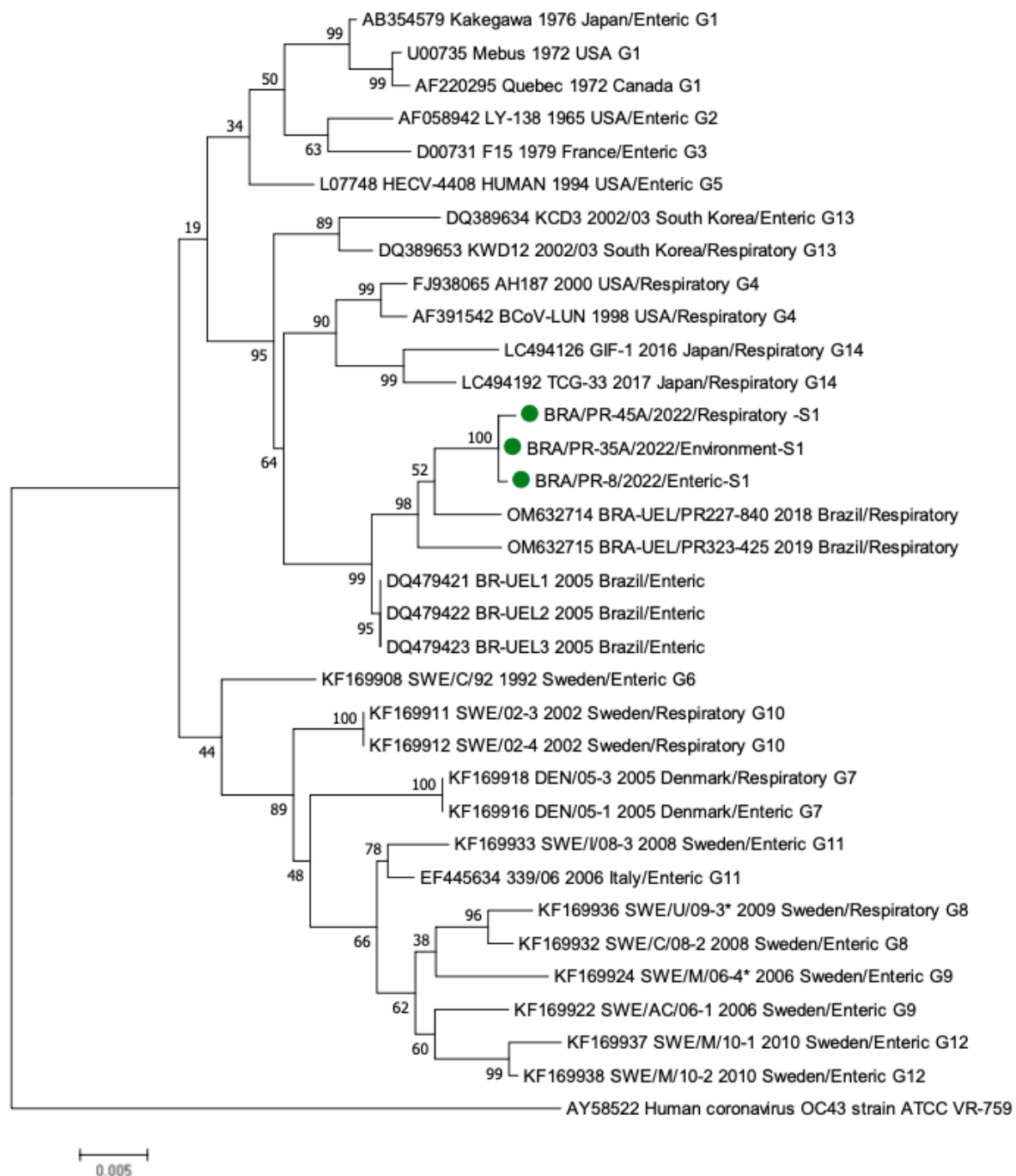


Figura 3. Análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança do gene S1 parcial (1621 nt) de cepas de coronavírus bovino. A história evolutiva foi inferida por usando o método de máxima verossimilhança baseado no modelo geral reversível no tempo. A porcentagem de árvores nas quais os táxons associados estão agrupados é mostrada ao lado dos galhos. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos medidos no número de substituições por local. A análise envolveu 30 sequências de nucleotídeos do coronavírus bovino. Uma sequência OC43 de coronavírus humano foi usada como grupo externo. Análises evolutivas foram realizadas no MEGA7. As cepas de BCoV identificadas neste estudo estão marcadas com círculos preenchidos em verde.

Discussão

Nesse estudo foram encontrados resultados positivos para a presença de coronavírus bovino nas superfícies da propriedade avaliada. Ainda que se conheça o potencial de infecção do BCoV em rebanhos bovinos, e existam muitos trabalhos de detecção molecular para doenças entéricas e respiratórias (Hasoksuz et al., 2002; Asano et al., 2009; Saif, 2010; Lorenzetti et al., 2013) não há trabalhos que relatem a presença do BCoV em superfícies.

BCoV foi encontrado na madeira das instalações do bezerreiro, das bezerras desmamadas e das novilhas. A madeira utilizada na propriedade possuía material poroso, sem tratamento e com vários anos de uso. Alguns estudos avaliaram a presença de CoVs em superfícies de madeira, como Chin et al. (2020) que observaram a presença do Sars-CoV-2 viável durante 24 horas em superfície de madeira e Duan et al. (2003), com Sars-CoV, durante 4 dias. Diante desses dados, pode-se sugerir que a madeira sem tratamento deve ser evitada nas instalações dos bovinos.

BCoV foi detectado na superfície do bebedouro e do comedouro. O material do bebedouro e do comedouro era de plástico e, apesar de a composição do plástico não ter sido avaliada, estes achados se relacionam com os estudos de Duan et al. (2003) que verificaram a presença de Sars-CoV viável na superfície de plástico durante 4 dias e van Doremalen et al. (2020), durante 3 dias, respectivamente. Com Sars-CoV-2, Kasloff et al. (2021) encontraram o vírus viável durante 21 dias, Chin et al. (2020) durante 4 dias e van Doremalen et al. (2020) durante 3 dias. Essas diferenças podem estar relacionadas com as metodologias utilizadas pelos autores em relação ao número de vírus e o volume de inoculação do vírus nessas superfícies (Owen et al., 2021; Liu et al., 2021).

Neste trabalho, BCoV foi encontrado no azulejo do bebedouro. Em semelhante material, com baixas concentrações do inóculo coronavírus humano 229E (HuCoV-229E) manteve sua infectividade por cinco dias em superfície de cerâmica (Warnes, 2015). Em outro estudo, Sars-CoV-2 foi encontrado em superfícies de cerâmica permanecendo viável por sete dias (Liu et al., 2021). Portanto, mesmo com poucas partículas de coronavírus, a contaminação natural nessa superfície pode representar um risco considerável de propagação de infecção.

BCoV foi encontrado em diferentes superfícies ambientais da propriedade e, como existe a possibilidade desses vírus permanecerem infecciosos, como comprovado em contaminações experimentais (Mullis et al., 2012; Watanabe et al., 2022) e em condições naturais (Oma et al., 2018) é importante medidas de biossegurança, incluindo a desinfecção frequente das instalações. Na fazenda avaliada foi observado que não se fazia desinfecções das instalações de bezerras desmamadas ou das vacas. A limpeza pode ser realizada de forma seca, através de varreduras, e de forma úmida, com o uso de jatos de água e detergentes. Com isso, a matéria orgânica acumulada, como as fezes e a urina, que podem servir de substrato para a permanência do vírus viável, podem ser eliminadas.

Os achados mostraram que, tanto em superfícies mais passíveis de contaminação por fezes como outras que são menos propensas (mamadeira, bebedouro e azulejo do comedouro), BCoV foi detectado. Entretanto, por mais que essas superfícies não entrem em contato com as fezes, elas podem estar contaminadas a partir do contato com as secreções nasais e orais.

Um estudo realizado por Geller et al. (2012) mostrou que CoVs humanos têm capacidade de agregação e isso pode ser potencializado pela presença de matéria orgânica, tornando-os ainda mais resistentes à ação dos antissépticos e desinfetantes. Sattar et al. (1989) citam que BCoV é suscetível aos detergentes e desinfetantes como hipoclorito de sódio, cloramina T, iodopovidona, etanol 70%, glutaraldeído e compostos fenólicos. Porém, devido à toxicidade, produtos baseados apenas em amônios quaternários ou compostos fenólicos devem ser evitados. Dessa forma, alguns desinfetantes antissépticos amplamente utilizados, como etanol ou água sanitária, mostraram uma atividade significativa em CoVs humanos (Geller et al., 2012). A eficiência da iodopovidona para o MERS-CoV foi investigada por Eggers et al. (2015) mostrando 99,99% de eficácia, com inativação do vírus em segundos.

A ausência de iluminação solar direta nas instalações das vacas adultas e bezerras é outro fator importante que pode contribuir com a possibilidade de uma transmissão indireta do vírus para os bovinos. Em baixas temperaturas e com menor intensidade da luz UV, o ambiente torna-se mais estável para a permanência de vírus viável (Saif, 1990; Clarck, 1993). As condições de luz podem alterar significativamente a estabilidade dos coronavírus. Em estudos simulados, a

exposição à luz solar durante o verão reduziu a carga viral do Sars-CoV-2 em aproximadamente 7 minutos comparadas à luz solar do inverno (Ratnesar-Shumate, 2020). Além disso, como BCoV é um vírus envelopado, é moderadamente sensível ao calor (Clark, 1993).

Considerando as pessoas que atuam diretamente na atividade de manejo e ordenha, deve fazer parte da rotina dessas pessoas o uso de roupas e calçados adequados com a atividade realizada logo ao adentrar a propriedade. Quanto ao ingresso de pessoas na propriedade, os principais equipamentos de proteção individual (EPIs) são botas, macacões e aventais, que devem ser utilizados somente no local, além de que devem ser sempre higienizados e substituídos periodicamente ou sempre que houver necessidade. Dessa forma evitaria a disseminação do vírus na propriedade e entre propriedades distintas, pois os EPIs são grandes aliados da biossegurança, tanto externa quanto interna, nas propriedades (Pegoraro et al., 2018).

A entrada de pessoas externas, como por exemplo, técnicos que visitam vários locais sem os cuidados sanitários, ou mesmo visitantes, é um risco a ser considerado, pois essas pessoas podem facilitar a entrada de BCoV nas fazendas. Ohlson et al. (2010) relataram a existência de casos com aumento de soropositividade para o BCoV em rebanhos que não forneciam botas aos visitantes. Oma et al. (2018) também indicaram que estetoscópios e relógios de pulso de pessoas podem servir como veículos de transmissão do BCoV. Boileau e Kapil (2010) também citam a possibilidade de transmissão por cães que circulam na propriedade.

BCoV foi identificado em diferentes locais, materiais e instalações da propriedade e em todas as categorias de animais (bezerras, novilhas e vacas). Isso suscita a possibilidade de contaminação cruzada. A transmissão de BCoV pode estar ocorrendo entre os bovinos por meio de animais infectados de diferentes categorias, pelo contato direto ou indiretamente por aerossóis e contaminação das instalações e dos equipamentos. Sabe-se também que uma via comum de transmissão é da mãe para o bezerro e entre bezerros (Hodnik et al., 2020). Sendo assim, o ideal seria que os bovinos fossem mantidos sob quarentena ou separados por um período de tempo suficiente para realizar testes e tratamento.

Na propriedade avaliada, não é realizada vacinação contra BCoV. Porém, a vacinação tem se demonstrado uma estratégia eficaz para evitar a disseminação de BCoV, desempenhando um papel importante como medida profilática da infecção pelo BCoV em rebanhos bovinos (Stipp et al., 2009). As vacinas são administradas nas vacas antes do parto para imunização passiva dos bezerros, com os anticorpos sendo transmitidos pelo colostro (Stipp et al., 2009; Tizard, 2020).

Para a detecção do BCoV nas amostras de fezes e secreção nasal, assim como nas amostras do ambiente, foram utilizadas a técnica de *semi-nested*-RT-PCR que possui alta especificidade e sensibilidade para detectar BCoV em bovinos (Ribeiro et al., 2016). A proteína N tem sido amplamente utilizada no diagnóstico molecular de BCoV (Takiuchi et al., 2006; Barros et al., 2013; Lorenzetti et al., 2013; Ribeiro et al., 2016), uma vez que é bastante conservada e se expressa em grandes quantidades durante a replicação viral

Na análise do gene N não foram observadas variações de similaridade em relação às cepas de BCoV das diferentes amostras desse estudo, sugerindo que a mesma cepa de BCoV foi identificada nos animais e nas superfícies da propriedade avaliada. Adicionalmente, as três cepas de BCoV identificadas neste estudo foram agrupadas no cluster II juntamente com cepas descritas na Ásia, nos EUA e com outras cepas brasileiras (BRA/PR) coletadas em 2018, 2019 e 2020. Curiosamente, outras cepas brasileiras foram agrupadas no cluster III, juntamente com cepas europeias. Portanto, sugere-se que a variação genética das diferentes cepas está diretamente ligada às regiões geográficas. Essa variação genética já foi demonstrada num estudo prévio e sugere de maneira consistente que existem múltiplas cepas do BCoV em circulação no Brasil, inclusive dentro do mesmo estado (Frucchi et al., 2022).

A análise filogenética baseada no fragmento de 1621 nt do gene S1 mostrou a formação de clados e subclados com diferentes isolados de BCoV, demonstrando uma tendência de separação filogeográfica. As amostras do presente estudo foram agrupadas com cepas respiratórias brasileiras (BRA/UEL e BR-UEL 1,2 e 3), evidenciando que as cepas brasileiras são geneticamente próximas, diferentemente das cepas identificadas em outros países. As cepas protótipos, apesar de pertencerem a diferentes regiões geográficas, foram isoladas há muitos anos e agruparam-se em um clado específico.

Com base nos resultados, esse estudo mostra que BCoV está presente nos bovinos e em diversas superfícies ambientais da propriedade de bovinos leiteiros avaliada. A mesma cepa está presente tanto nos bovinos quanto nas superfícies da propriedade. Estes dados reforçam a importância de reconhecer as múltiplas vias de transmissão desse vírus, incluindo a disseminação por aerossóis e via fecal-oral (Saif, 2010) e fômites contaminados (Oma et al., 2018), uma vez que BCoV pode permanecer infeccioso em alguns tipos de superfície (Oma et al., 2018; Watanabe et al, 2022).

Conclusão

BCoV foi detectado por meio de técnicas moleculares em diferentes superfícies de uma propriedade com rebanho bovino positivo para BCoV. Indicando que é imprescindível considerar ações coordenadas para prevenir e controlar a disseminação do vírus em propriedades de bovinos leiteiros, com a implementação rigorosa de medidas de biossegurança, juntamente com a desinfecção eficiente das instalações. Adicionalmente, o conhecimento das variações genéticas das cepas são elementos importantes para mitigar os riscos e impactos potenciais de novas cepas virais ou mutações que possam surgir, protegendo a saúde do rebanho, bem como os interesses econômicos dos produtores.

REFERÊNCIAS

Aboubakr, H. A., Sharafeldin, T. A., Goyal, S. M. (2021). Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review. *Transboundary and emerging diseases*, 68(2), 296–312. <https://doi.org/10.1111/tbed.13707>.

Asano, K. M., Souza, S. P., Silva, S. O. S., Richtzenhain, L. J., Brandão, P. E. (2009). Rapid detection of bovine coronavirus by a semi-nested, RT-PCR. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(11), 874–880. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2009001100001>

Bidokhti, M. R. M., Tråvén, M., Ohlson, A., Baule, C., Hakhverdyan, M., Belák, S., Liu, L., Alenius, S. (2012). Tracing the transmission of bovine coronavirus infections

in cattle herds based on S gene diversity. *Veterinary Journal*, 193(2), 386–390. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.12.015>

Biryukov, J., Boydston, J.A., Dunning, R.A., Yeager, J.J., Wood, S., Reese, A.L., Ferris, A., Miller, D., Weaver, W., Zeitouni, N.E., Phillips, A., Freeburger, D., Hooper, I., Ratnesar-Shumate, S., Yolitz, J., Krause, M., Williams, G., Dawson, D.G., Herzog, A., Dabisch, P., Wahl, V., Hevey, M.C., Altamura, L.A. (2020). Increasing temperature and relative humidity accelerates inactivation of sars-cov-2 on surfaces. *mSphere* 5. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00441-20> e00441-20

Bolieau, M.J; Kapil,S. (2010). Bovine coronavirus associated syndromes. *The veterinary clinics of North America, Food Animal Practice*, v.26, n.1, p.123-146.

Barros N.I., Silva S.O.S., Neto F.S.N., Asano K.M., Souza S.P., Richtzenhain L.J., Brandão P.E. (2013). A multigene approach for comparing genealogy of betacoronavirus from cattle and horses. *The Scientific World Journal*, 1–6.

Brandão, P. E., Villarreal, L. Y. B., Gregori, F., Souza, S. L. P. de., Lopes, M. A. E., Gomes, C. R., Sforsin, A. J., Sanches, A. A., Rosales, C. A. R., Richtzenhain, L. J., Ferreira, A. J. P., Jerez, J. A. (2007). On the etiology of an outbreak of winter dysentery in dairy cows in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 27(10), 398–402. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2007001000002>

Carraturo, F., Del Giudice, C., Morelli, M., Cerullo, V., Libralato, G., Galdiero, E., Guida, M. (2020). Persistence of SARS-CoV-2 in the environment and COVID-19 transmission risk from environmental matrices and surfaces. *Environ. Pollut.* 265, 115010. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115010>

Chin, A.W.H., Chu, J.T.S., Perera, M.R.A., Hui, K.P.Y., Yen, H.L., Chan, M.C.W., Peiris, M., Poon, L. L. M. (2020). Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet Microbe* 1. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30003-3](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30003-3) e10

Clark M. A. (1993). Bovine coronavirus. *The British veterinary journal*, 149(1), 51–70. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(05\)80210-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(05)80210-6).

Clark, K.J, Sarr, A.B, Grant, P.G, Phillips, T.D, Woode, G.N.(1998). In vitro studies on the use of clay, clay minerals and charcoal to adsorb bovine rotavirus and bovine coronavirus. *Veterinary Microbiology*. Oct;63(2-4):137-46. doi: 10.1016/s0378-1135(98)00241-7. PMID: 9850994; PMCID: PMC7117430.

Colaneri, M., Seminari, E., Novati, S., Asperges, E., Biscarini, S., Piralla, A., Percivalle, E., Cassaniti, I., Baldanti, F., Bruno, R., Mondelli, M. U., COVID19 IRCCS San Matteo Pavia Task Force (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 RNA contamination of inanimate surfaces and virus viability in a health care emergency unit. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(8), 1094.e1–1094.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.009>

Duan, S. M., Zhao, X. S., Wen, R. F., Huang, J. J., Pi, G. H., Zhang, S. X.; SARS Research Team. (2003). Stability of SARS coronavirus in human specimens and

environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 16(3), 246

Eggers, M., Eickmann, M., & Zorn, J. (2015). Rapid and Effective Virucidal Activity of Povidone-Iodine Products Against Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) and Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA). *Infectious diseases and therapy*, 4(4), 491–501. <https://doi.org/10.1007/s40121-015-0091-9>

Frucchi, A. P. S., Dall Agnol, A. M., Bronkhorst, D. E., Beuttemuller, E. A., Alfieri, A. A., Alfieri, A. F. (2022). Bovine Coronavirus Co-infection and Molecular Characterization in Dairy Calves With or Without Clinical Respiratory Disease. *Frontiers in veterinary science*, 9, 895492. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.895492>

Gallagher, T.M, Buchmeier, M.J. (2001) Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* 279: 371–374

Geller C, Varbanov M, Duval RE. (2012) Human coronaviruses: insights into environmental resistance and its influence on the development of new antiseptic strategies. *Viruses*. Nov 12;4(11):3044-68. doi: 10.3390/v4113044. PMID: 23202515; PMCID: PMC3509683.

Hall T. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* 41:98.

Hasoksuz, M., Hoet, A. E., Loerch, S. C., Wittum, T. E., Nielsen, P. R., & Saif, L. J. (2002). Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in an Ohio feedlot. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 14(4), 308–313. <https://doi.org/10.1177/104063870201400406>

Hodnik, J. J., Ježek, J., Starič, J. (2020). Coronaviruses in cattle. *Tropical Animal Health and Production*. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02354-y>

Jansson, L., Akel, Y., Eriksson, R., Lavander, M., Hedman, J. (2020). Impact of swab material on microbial surface sampling. *Journal of microbiological methods*, 176, 106006. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106006>

Kampf, G., Todt, D., Pfaender, S., Steinmann, E. (2020). Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J. Hosp. Infect.* 104,246–251. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022>

Kasloff, S.B, Leung, A, Strong, J.E., Funk, D, Cutts, T. (2021) Stability of SARS-CoV-2 on critical personal protective equipment. *Sci. Rep.* 11, 94. (doi:10. 1038/s41598-020-80098-3)

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Liu Y et al. 2021 Stability of SARS-CoV-2 on environmental surfaces and in human excreta. *J. Hospital Infect.* 107, 105–107. (doi:10.1016/j.jhin.2020.10.021)

Lorenzetti, E., de Arruda Leme, R., Ribeiro, J., Almeida De Souza, V. R., Alfieri, A. F., Alfieri, A. A. (2013). Neonatal diarrhea by bovine coronavirus (BCoV) in beef cattle herds. *Semina: Ciencias Agrarias*, 34(6 SUPPL. 2), 3795–3800. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3795>

Lotfollahzadeh, S., Madadgar, O., Reza Mohebbi, M., Reza Mokhber Dezfouli, M., George Watson, D. (2020). Bovine coronavirus in neonatal calf diarrhoea in Iran. *Veterinary Medicine and Science*, 6(4), 686–694. <https://doi.org/10.1002/vms3.277>

Mahl, M.C., Sadler, C. (1975). Virus survival on inanimate surfaces. *Can. J. Microbiol.* 21, 819–823. <https://doi.org/10.1139/m75-121>.

Morris, D.H., Yinda, K.C., Gamble, A., Rossine, F.W., Huang, Q., Bushmaker, T., Fischer, R.J., Matson, M.J., van Doremalen, N., Vikesland, P.J., Marr, L.C., Munster, V.J., Lloyd-Smith, J.O. (2020). The effect of temperature and humidity on the stability of SARS-CoV-2 and other enveloped viruses. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.10.16.341883>, 10.16.341883

Mullis L, Saif LJ, Zhang Y, Zhang X, Azevedo MS. (2012). Stability of bovine coronavirus on lettuce surfaces under household refrigeration conditions. *Food Microbiology*;30: 180-186. doi: 10.1016/j.fm.2011.12.009. [Epub 2011 Dec 13]. PMID: 22265299, PMCID: PMC4980993.

Natsuaki, S., Goto, K., Nakamura, K., Yamada, M., Ueo, H., Komori, T., Shirakawa, H., & Uchinuno, Y. (2007). Fatal winter dysentery with severe anemia in an adult cow. *The Journal of veterinary medical science*, 69(9), 957–960. <https://doi.org/10.1292/jvms.69.957>.

Nei M, Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press.

Ohlson, A., Emanuelson, U., Tråvén, M., & Alenius, S. (2010). The relationship between antibody status to bovine corona virus and bovine respiratory syncytial virus and disease incidence, reproduction and herd characteristics in dairy herds. *Acta veterinaria Scandinavica*, 52(1), 37. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-37>

Oma, V.S., Tråvén, M., Alenius, S., Myrmel, M., Stokstad, M. (2016) Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the potential for transmission. *Virology Journal* 13, 100 . <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0555-x>

Oma V.S., Klem T., Traven M., Alenius S., Gjerset B., Myrmel M. and Stokstad M., (2018). Temporary carriage of bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus by fomites and human nasal mucosa after exposure to infected calves, *BMC Veterinary Research*, 14, 1, 22. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1335-1>

Owen, L., Shivkumar, M., Cross, R. B. M., Laird, K. (2021). Porous surfaces: stability and recovery of coronaviruses. *Interface focus*, 12(1), 20210039. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2021.0039>

Pegoraro L.M.C. (2018). *Biosseguridade na Bovinocultura Leiteira*. Ed.Técnica – Pelotas : Embrapa Clima Temperado.

Pinto, F., Hiom, S., Girdlestone, S., & Maillard, J. Y. (2009). Evaluation of the effectiveness of commercially available contact plates for monitoring microbial environments. *Letters in applied microbiology*, 48(3), 379–382. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02534.x>

Rabenau, H. F., Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Preiser, W., Doerr, H. W. (2005). Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Medical Microbiology and Immunology*, 194(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00430-004-0219-0>

Ratnesar-Shumate, S., Williams, G., Green, B., Krause, M., Holland, B., Wood, S., Bohannon, J., Boydston, J., Freeburger, D., Hooper, I., Beck, K., Yeager, J., Altamura, L. A., Biryukov, J., Yolitz, J., Schuit, M., Wahl, V., Hevey, M., Dabisch, P. (2020). Simulated Sunlight Rapidly Inactivates SARS-CoV-2 on Surfaces. *The Journal of infectious diseases*, 222(2), 214–222. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa274>

Rawlinson, S., Ciric, L., Cloutman-Green, E. (2019). How to carry out microbiological sampling of healthcare environment surfaces? A review of current evidence. *The Journal of hospital infection*, 103(4), 363–374. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.07.015>

Ren, S.Y., Wang, W.B., Hao, Y.G., Zhang, H.R., Wang, Z.C., Chen, Y.L., Gao, R.D., (2020). Stability and infectivity of coronaviruses in inanimate environments. *World J. Clin. Cases*. 8, 1391–1399. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v8.i8.1391>.

Ribeiro J., Lorenzetti E., Alfieri A.F., Alfieri A. A. (2016). Molecular detection of bovine coronavirus in a diarrhea outbreak in pasture- feeding Nellore steers in southern Brazil, *Tropical Animal Health and Production*, 48, 649–653

Saif, L. J. (2010). Bovine respiratory coronavirus. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 26, Issue 2, pp. 349–364). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.005>

Sattar, S. A., Springthorpe, V. S., Karim, Y., Loro, P. (1989). Chemical disinfection of non-porous inanimate surfaces experimentally contaminated with four human pathogenic viruses. *Epidemiology and infection*, 102(3), 493–505. <https://doi.org/10.1017/s0950268800030211>

Sizun, J., Yu, M. W., Talbot, P. J. (2000). Survival of human coronaviruses 229E and OC43 in suspension and after drying on surfaces: a possible source of hospital-acquired infections. *The Journal of hospital infection*, 46(1), 55–60. <https://doi.org/10.1053/jhin.2000.0795>.

Stipp, D. T., Barry, A. F., Alfieri, A. F., Takiuchi, E., Amude, A. M., Alfieri, A. A. (2009). Frequency of BCoV detection by a semi-nested PCR assay in faeces of

calves from Brazilian cattle herds. *Tropical Animal Health and Production.*; 41(7), 1563–1567.

Suzuki T, Otake Y, Uchimoto S, Hasebe A, Goto Y. (2020). Genomic characterization and phylogenetic classification of bovine coronaviruses through whole genome sequence analysis. *Viruses*.12:183. doi: 10.3390/v120 20183.

Takiuchi, E., Alfieri, A. F., Alfieri, A. A. (2008). Structural analysis of bovine coronavirus S1 gene Molecular analysis of the bovine coronavirus S1 gene by direct sequencing of diarrheic fecal specimens. In *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (Vol. 41, Issue 4).

Takiuchi, E., Alfieri, A. F., Alfieri, A. A. (2008). Molecular analysis of the bovine coronavirus S1 gene by direct sequencing of diarrheic fecal specimens. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 41(4), 277–282. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2008000400004>

Takiuchi, E., Stipp, D. T., Alfieri, A. F., Alfieri, A. A. (2006). Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. *Journal of Virological Methods*, 131(2), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.08.005>

Tizard I. R. (2020). Vaccination against coronaviruses in domestic animals. *Vaccine*, 38(33), 5123–5130. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.026>.

van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D. H., Holbrook, M. G., Gamble, A., Williamson, B. N., Tamin, A., Harcourt, J. L., Thornburg, N. J., Gerber, S. I., Lloyd-Smith, J. O., de Wit, E., Munster, V. J. (2020). Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *The New England journal of medicine*, 382(16), 1564–1567. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2004973>

van Doremalen, N., Bushmaker, T., Munster, V. J. (2013). Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) under different environmental conditions. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 18(38), 20590. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.38.20590>.

Vijgen, L., Keyaerts, E., Lemey, P., Maes, P., van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M., van Ranst, M. (2006). Evolutionary History of the Closely Related Group 2 Coronaviruses: Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus, Bovine Coronavirus, and Human Coronavirus OC43. *Journal of Virology*, 80(14), 7270–7274. <https://doi.org/10.1128/jvi.02675-05>

Vlasova, A. N., Saif, L. J. (2021). Bovine Coronavirus and the Associated Diseases. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 8). *Frontiers Media S.A.* <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.643220>

Warnes, S. L., Little, Z. R., Keevil, C. W. (2015). Human Coronavirus 229E Remains Infectious on Common Touch Surface Materials. *mBio*, 6(6), e01697-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01697-15>.

Watanabe, M., Ohnishi, T., Arai, S., Kawakami, T., Hayashi, K., Ohya, K., Hirose, S., Yoshinari, T., Taharaguchi, S., Mekata, H., Taniguchi, T., Ikarashi, Y., Honma, M., Goda, Y., Hara-Kudo, Y. (2022). Survival of SARS-CoV-2 and bovine coronavirus on common surfaces of living environments. *Scientific reports*, 12(1), 10624. <https://doi.org/10.1038>.

Yeargin, T., Buckley, D., Fraser, A., Jiang, X. (2016). The survival and inactivation of enteric viruses on soft surfaces: A systematic review of the literature. *American journal of infection control*, 44(11), 1365–1373. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.018>

CAPÍTULO 4

Perspectivas Futuras

Os resultados desse estudo evidenciam a presença de BCoV em diferentes superfícies da propriedade. Isso enfatiza a importância de práticas rigorosas de higiene e biossegurança para minimizar a presença e propagação do vírus. Além disso é muito importante:

- Estabelecer um sistema de monitoramento contínuo para avaliar a persistência de BCoV em superfícies de acesso aos bovinos e identificar potenciais pontos críticos de contaminação.
- Realizar estudos de acompanhamento ao longo do tempo que auxiliarão a compreender melhor os padrões sazonais ou outras tendências de contaminação de BCoV.
- Explorar intervenções específicas para reduzir a contaminação de superfícies. Isso pode envolver testes de diferentes agentes de limpeza e desinfecção para determinar sua eficácia na redução da carga viral em várias superfícies.

O estudo contínuo da presença viral e caracterização molecular é essencial para a obtenção de uma compreensão abrangente das infecções, permitindo a implementação de medidas preventivas eficazes para reduzir os distúrbios respiratórios e entéricos nos bovinos.

ANEXO (S)

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA

TÍTULO DA PESQUISA	Deteção, identificação molecular e dispersão de coronavírus bovino (BCoV) em superfícies bióticas e abióticas de uma fazenda de bovinos de leite.		
Nº DO PARECER / VERSÃO	02226		
PESQUISADOR RESPONSÁVEL	Cristina Santos Sotomaior		
ESPECIE DO ANIMAL	<i>Bos taurus</i>	Nº DE ANIMAIS	40, estimativa pois dependerá da propriedade visitada (5 % dos bovinos em cada categoria)
NOME COMUM DO ANIMAL	bovino	Nº SISBIO (animais de vida livre)	<i>Não se aplica</i>
SEXO / IDADE / PESO	Variados	ATIVIDADES (animais de vida livre)	<i>Não se aplica</i>
ORIGEM DO ANIMAL	Fazenda particular	GP TAXONÔMICO (animais de vida livre)	<i>Não se aplica</i>
DATA DE INICIO DA PESQUISA	Abril de 2022	LOCAL (IS) (animais de vida livre)	<i>Não se aplica</i>
DATA DE TÉRMINO DA PESQUISA	Abril de 2023	Nº SISGEN	<i>Não se aplica</i>
APRESENTAÇÃO DO PROJETO			
OBJETIVO DA PESQUISA	Objetivo Geral: - Identificar molecularmente a presença de Coronavírus Bovino (BCoV) em fezes de bezerros e a presença do BCoV em amostras colhidas de diferentes superfícies dos bezerreiros e demais locais da fazenda para rastrear a taxa de dispersão viral. Objetivos Específicos: - Investigar a ocorrência do BCoV em fezes diarreicas de bezerros utilizando a técnica RT-PCR, em propriedade positiva para BCoV; - Investigar a ocorrência do BCoV em fezes e swabs de novilhas / vacas do mesmo rebanho positivo, utilizando a técnica RT-PCR; - Detectar a presença do vírus pela amplificação genômica por métodos qualitativos (RT-PCR) em amostras colhidas de superfícies; - Verificar medidas preventivas contra a transmissão do vírus; - Avaliar a faixa etária dos bezerros mais acometida pelo vírus; - Investigar a relação da ocorrência da infecção com a comercialização ou trânsito de animais.		

RISCOS E ATITUDES MITIGATÓRIAS	Os bovinos leiteiros são animais acostumados ao trato diário e habituados à rotina de manipulação, portanto, de fácil manejo. O pessoal envolvido na manipulação dos animais é habituado ao manejo com a espécie e foram devidamente treinados, e assim, o risco físico aos pesquisadores envolvidos durante o manejo dos bovinos será mínimo. Serão realizadas ações preventivas para que os bovinos não manifestem desconforto, tais como: contenção animal adequada, colheita de amostras por pessoas treinadas e com experiência na área e sempre supervisionadas por médico veterinário. Caso o bovino manifeste estresse ou dor, a colheita será imediatamente suspensa. Não se justifica o uso de fármacos de controle de dor, uma vez que as colheitas são pouco invasivas e a aplicação do fármaco (injetável) ocasionaria mais estresse e dor do que a própria colheita de amostra. Os riscos de transmissão de doenças de um bovino a outro, ou destes para a pessoa que estará manipulando as amostras, serão minimizados com os cuidados de biossegurança, como: uso de um par de luvas por bezerra, roupas adequadas como macacão e botas limpos, e procedimentos de desinfecção das mãos, botas e dos utensílios e troca de macacão de uma fazenda para a outra.
CONSIDERAÇÕES SOBRE A PESQUISA	
CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TERMOS DE APRESENTAÇÃO OBRIGATÓRIA	
RECOMENDAÇÕES	

CONCLUSÕES OU PENDÊNCIAS E LISTA DE INADEQUAÇÕES	Todas as pendências foram atendidas.
CONSIDERAÇÕES FINAIS	O pesquisador tem 60 dias, após a ciência do parecer com pendência para responder aos quesitos formulados pela CEUA-PUCPR em seu parecer, os quais devem ser respondidos no formulário de pendência. Após este prazo o projeto será considerado "Retirado". Conforme RESOLUÇÃO N.º 036/2016 - CONSUN. Informamos que as pendências devem ser respondidas pelo link https://pucpr.co1.qualtrics.com/jfe/form/SV_3eEQgHGidK0KO45 , obrigatoriamente, não sendo possível avaliação caso seja enviado por outros meios.
SITUAÇÃO DO PARECER	APROVADO

CURITIBA, 12 de abril de 2022.

PROF. DR. SÉRGIO LUIZ ROCHA
Coordenador CEUA-PUCPR

A validade deste documento pode ser confirmada pelo e-mail ceua@pucpr.br informando o número do parecer