

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS

PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIEL LOPES PEREIRA

**INVESTIGAÇÃO DE SARS-COV-2 EM INSETOS E PLANTAS COLETADOS
PRÓXIMOS AO HOSPITAL DE CAMPANHA LOCALIZADO NO GINÁSIO DE
ESPORTES DA UFABC**

SÃO BERNARDO DO CAMPO - SP

2021

GABRIEL LOPES PEREIRA

**INVESTIGAÇÃO DE SARS-COV-2 EM INSETOS E PLANTAS COLETADOS
PRÓXIMOS AO HOSPITAL DE CAMPANHA LOCALIZADO NO GINÁSIO DE
ESPORTES DA UFABC**

Trabalho de conclusão de curso apresentada junto ao curso de bacharelado em ciências biológicas na Universidade Federal do ABC.

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Aparecida Sperança

Lopes Pereira, Gabriel

Investigação de SARS-CoV-2 em insetos e plantas coletados próximos ao hospital de Campanha localizado no Ginásio de Esportes da UFABC / Gabriel Lopes Pereira. — 2021.

31 fls.

Orientadora: Márcia Aparecida Sperança

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do ABC, Bacharelado em Ciências Biológicas, São Bernardo do Campo, 2021.

1. SARS-CoV-2. 2. Coronavírus. 3. Insetos. 4. Vigilância Epidemiológica. 5. Síndrome aguda respiratória grave. I. Aparecida Sperança, Márcia. II. Bacharelado em Ciências Biológicas, 2021. III. Título.

SÃO BERNARDO DO CAMPO - SP

2021

GABRIEL LOPES PEREIRA

**INVESTIGAÇÃO DE SARS-COV-2 EM INSETOS E PLANTAS COLETADOS
PRÓXIMOS AO HOSPITAL DE CAMPANHA LOCALIZADO NO GINÁSIO DE
ESPORTES DA UFABC**

Trabalho de conclusão de curso apresentada junto ao curso de bacharelado em ciências biológicas na Universidade Federal do ABC.

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Aparecida Sperança

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Márcia Aparecida Sperança (Orientadora)

Prof. Dr. Gabriel Zorello Laporta

Prof. Dra. Ana Paula de Mattos Arêas Dau

Dedico este trabalho à minha família e a todos que me ajudaram a chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Roseclair Teixeira Lopes da Silva e Marcelo Dias Pereira, por todo apoio, paciência, conselhos, amizade e companheirismo.

As minhas irmãs, Leticia Lopes Pereira e Luana Gabriela Lopes Pereira, por toda ajuda, apoio e companhia.

A Prof.^a. Dra. Márcia Aparecida Sperança por todo incentivo, apoio e interesse. E principalmente sua curiosidade que foi o ponta pé inicial da pesquisa.

A Leticia Abrantes de Andrade pela ajuda direta no projeto, pelas ideias, compreensão, por todo apoio, companheirismo e amizade.

Aos colegas de laboratório, Felipe Jordão, Felipe Baena, Luana Prado, Carla Moreira e Edmar Silva pela ajuda, parceria e conhecimentos trocados. Principalmente a Luana e Márcia que me ajudaram com a parte experimental durante o período de quarentena.

A Universidade Federal do ABC por apoiar a busca ativa de casos de Covid-19 em focos de transmissão na cidade de São Bernardo do Campo

“[..] a cadeia da vida é composta de elos interdependentes, alguns dos quais não são vivos, e que não podemos nos abstrair do mundo como bem entendermos. O “nós”, portanto, dificilmente faz sentido se consideramos que a microbiota de cada um de nós é composta de milhares de bilhões de “eles”, ou que o CO₂ que hoje emito ainda afetará o clima em mil anos. Os vírus, os microrganismos, as espécies animais e vegetais que modificamos ao longo dos milênios são nossos comensais no banquete às vezes trágico da vida. É absurdo pensar que poderíamos tirar uma folga para viver em uma bolha.”

Philip Descola, 2020

Lista de ilustrações

- Figura 1. Locais de coleta no entorno do hospital de campanha da UFABC Santo André..... 17
- Figura 2. Eletroforese em géis de agarose 2% corados com brometo de etídeo contendo produtos de RT-PCR obtidos com os oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 227 pb do gene que codifica a proteína E de SARS-CoV-2. 1 a 16 22
- Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo contendo produto de RT-PCR e nested-PCR com os oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 492 pb do gene que codifica a proteína Spike de SARS-CoV-2. 1 a 16 22
- Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo produto de PCR com os oligonucleotídeos M13F e M13R a partir de diferentes colônias de bactérias transformadas com plasmídeo TOPO-TA. EF1-5.: 23
- Figura 5. Cromatograma das reações de sequenciamento pelo método de Sanger, após eletroforese capilar dos fragmentos de 492 pb (A) e 227 pb (B) contendo as regiões com modificações nucleotídicas..... 24
- Figura 6. Comparação da sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína E de SARS-CoV-2 obtida a partir do espécime de formiga, com as sequências de SARS-CoV-2 obtidas de humanos (human) e de Betacoronavírus de morcego (Bat) com maior similaridade após busca em banco de dados públicos por BLAST.. 25
- Figura 7. Comparação da sequência aminoacídica do gene que codifica a proteína E de SARS-CoV-2 obtida a partir do espécime de formiga, com as sequências de SARS-CoV-2 obtidas de humanos (human) e de Betacoronavírus de morcego (Bat) com maior similaridade após busca em banco de dados públicos por BLAST.. 25
- Figura 8. Comparação da sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína Spike de SARS-CoV-2 obtida a partir do espécime de barata, com as sequências de SARS-CoV-2 obtidas de humanos (human) e de Betacoronavírus de morcego (Bat) com maior similaridade após busca em banco de dados públicos por BLAST. 26
- Figura 9. Comparação da sequência aminoacídica do gene que codifica a proteína Spike de SARS-CoV-2 obtida a partir do espécime de barata, com as sequências de SARS-CoV-2 obtidas de humanos (human) e de Betacoronavírus de morcego (Bat) com maior similaridade após busca em banco de dados públicos por BLAST. 27

SUMÁRIO

Resumo	9
Abstract	9
Introdução	11
Objetivos	16
Objetivos específicos	16
Material e Métodos	16
Coleta de amostras	16
Extração de ácidos nucléicos	17
Detecção de SARS-CoV-2 por RT/PCR em tempo real e termociclador convencional	17
Clonagem e sequenciamento dos produtos de PCR obtidos	20
Resultados	21
Discussão	27
Conclusão	29
Referências	29

Resumo

O papel de aerossóis gerados por indivíduos infectados na transmissão da Síndrome Respiratória Aguda Grave, causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2), é bem estabelecido entre pessoas, entretanto, a contribuição deles na transmissão ambiental do vírus, permanece incerto. Embora medidas de higiene e contato sejam geralmente recomendadas em situações em que há suspeita de doença, há evidências limitadas sobre a contaminação ambiental. Superfícies contaminadas podem infectar pessoas através do contato das mãos, com a conjuntiva dos olhos ou boca. Os insetos que se alimentaram em resíduos humanos ou de qualquer outro material contaminado com o vírus podem também se tornar vetores mecânicos quando em contato com humanos. Além disto em áreas de grande circulação de pessoas, plantas e animais podem servir de organismos sentinelas para indicar o grau de contaminação do ambiente. Portanto, conduzimos a vigilância ambiental da contaminação por SARS-CoV-2 em insetos e plantas coletados em ambientes com alta probabilidade de circulação do vírus e com grande circulação de pessoas.

Palavras-chave : SARS-CoV-2 , Síndrome aguda respiratória grave, Infecção respiratória, vigilância ambiental, diagnóstico

Abstract

The role of aerosols generated by infected individuals in the transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome, caused by the new coronavirus (SARS-CoV-2), remains uncertain. Although hygiene and contact measures are generally recommended in situations where disease is suspected, there is limited evidence on environmental contamination. Contaminated surfaces can infect people through contact with the hands, the conjunctiva of the eyes or mouth. Insects that have fed on human waste or any other material contaminated with the virus can also become mechanical vectors when in contact with humans. In addition, in areas with high circulation of people, plants and animals, they can serve as sentinel organisms to indicate the degree of contamination of the environment. Therefore, we conduct environmental surveillance of SARS-CoV-2 contamination in insects and plants collected in environments with a high probability of virus circulation and with large circulation of people.

Keywords: SARS-CoV-2, Acute severe respiratory syndrome, Respiratory infection, environmental monitoring, diagnosis

Introdução

Doenças causadas por espécies de coronavírus, dentre as quais estão a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), afetaram a população humana no passado, mas pouco foi feito e estudado sobre a biologia e monitoramento destes patógenos no mundo. Os coronavírus pertencem à família *Coronaviridae*, que é subdividida em duas subfamílias *Coronavirus* (CoV) e *Torovirus*. Todos os CoVs são subdivididos em quatro gêneros, *alpha coronavirus*, *beta coronavirus*, *gamma coronavirus* e *delta coronavirus* dos quais alpha e beta são reconhecidos como possíveis agentes infecciosos para humanos.

No primeiro surto global de SARS identificado inicialmente na cidade de Foshan na China, ocorreram mais de 8 mil infecções e 774 mortes em 27 países. Posteriormente, foi descoberto que o agente etiológico da doença correspondia a um vírus do grupo dos Coronavirus que apresentava características zoonóticas, com infecção acidental em humanos. Uma vez identificado o coronavírus, agente causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), medidas de restrição e controle da circulação de pessoas foram feitas, a pandemia cessou e nenhum novo caso humano foi registrado. Neste primeiro surto de SARS-CoV foi importante notar que a infecção pela via aérea pode resultar em alta prevalência na população humana e que eventos de transbordamento são possíveis (HAMNER et al., 2020; PAULES; MARSTON; FAUCI, 2020). Os eventos de transbordamento são comumente referidos em artigos na língua inglesa como “*Host Transfer*”, “*Host switching*” ou “*Spillover*”; e, ocorrem quando uma população silvestre é naturalmente infectada com um determinado patógeno e este é passado para outra população não atingida (CONFALONIEIRI, 2010).

Em junho de 2012, um caso de pneumonia aguda na Arábia Saudita marcou o ressurgimento de outra pandemia causada por um *beta coronavirus* denominada Síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV). Houve um conjunto de casos diagnosticados em um hospital na Jordânia e posteriormente 1728 casos de infecção em 27 países, e após abril de 2016, nenhum outro caso foi registrado. Estes dois casos do passado ressaltam a capacidade de contágio e disseminação deste grupo de vírus e a importância do controle e vigilância da população humana e de animais silvestres. (DE WIT et al., 2016)

O mercado atacadista de frutos do mar da cidade de Wuhan é considerado o marco zero do surto de pneumonia que cresceu de forma exponencial e se consolidou como a maior pandemia da última década, decretada pela Organização Mundial da Saúde desde 11 de março de 2020 (WHO,

2020). O novo coronavírus (SARS-CoV-2) causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS) pertence ao gênero *beta coronavirus* e apresenta aproximadamente 96% de similaridade com a cepa BatCoV RaTG13 encontrada no morcego *Rhinolophus affinis* na província chinesa de Yunnan. Os virions são envelopados e medem aproximadamente 50–200 nm de diâmetro, com um único genoma de RNA de sentido positivo. As glicoproteínas do envelope viral são claviformes e dão uma aparência em forma de coroa ou coronal (JUNEJO et al., 2020; ZHOU et al., 2020). As glicoproteínas ancoradas no envelope viral (proteínas S ou proteínas Spike) fazem a mediação da entrada do coronavírus em seu hospedeiro, elas apresentam duas subunidades: S1 e S2. A S1 é responsável pela ligação ao domínio receptor e a S2 conduz a fusão entre as membranas virais e as do hospedeiro. Estas proteínas têm um domínio receptor obrigatório (RBD) que se liga aos receptores do hospedeiro e reconhece especificamente a ACE2 (enzima conversora de angiotensina 2), ou o receptor CD147 (WAN et al., 2020; WANG et al., 2020).

Os primeiros relatos graves da doença datam do final de dezembro de 2019, e a maioria dos pacientes tiveram contato com o mercado de Wuhan. Os principais sintomas foram febre, tosse, dificuldade para respirar, sendo que os principais achados clínicos foram, pneumonia bilateral, manchas opacas, padrão de opacidade de vidro fosco, pneumotórax e síndrome do desconforto respiratório agudo. O hemograma da maioria dos pacientes apresentava o valor absoluto de linfócitos diminuídos, sugerindo atuação do vírus em linfócitos, especialmente linfócitos T. As partículas virais se espalham pela mucosa respiratória e infectam outras células, geram uma série de respostas imunológicas e acabam por induzir uma tempestade de citocinas no corpo, e causam alterações nos glóbulos brancos periféricos e outras células da série branca. Alguns pacientes progrediram rapidamente com síndrome do desconforto respiratório agudo e choque séptico, que foi eventualmente seguido por falência de múltiplos órgãos (CHEN et al., 2020).

Os sintomas para pacientes positivos para SARS-CoV-2 são heterogêneos, alguns dados reforçam a possibilidade de que doenças autoimunes sejam causadas durante e após o contágio. Em estudo de 18 pacientes que morreram em decorrência do vírus, (EHRENFELD et al., 2020), para identificação da causa da morte, foram utilizados diferentes marcadores em técnica de imunohistoquímica. O estudo comprovou a presença de linfócitos T CD3+ e supressores de CD8+ nos pulmões, glândulas adrenais, fígado e intestino, indicando uma resposta autoimune. O mimetismo molecular, ativação “bystander” e o espalhamento de epítomos estão dentre os mecanismos suspeitos que possam explicar as doenças autoimunes, sendo que o mimetismo molecular pode ser o mais importante deles pois o vírus compartilha vários epítomos com proteínas de humanos (EHRENFELD et al., 2020; SIMÕES; BAGATINI, 2021; TAHERIFARD et al., 2021). Quando a

resposta imune aumenta, pode haver uma reação cruzada com proteínas humanas e ocasionar doenças autoimunes. Devido a diversidade e desconhecimento dos mecanismos de patogenia, ainda não há fármacos eficazes para tratar todos os pacientes acometidos pela doença. Desta forma, as medidas para controle da doença correspondem ao isolamento social e a vacinas, que ainda não estão disponíveis para toda a população.

No início da pandemia causada pelo SARS-CoV-2, países que não adotaram medidas de controle, testagem em massa, e ampla vacinação, obtiveram um crescimento exponencial de casos e um posterior colapso do sistema de saúde que não foi capaz de dar suporte a todos os casos graves (ARMOCIDA et al., 2020; DE WIT et al., 2016; GONZALEZ et al., 2020; MITJÀ et al., 2020).

A Itália foi o primeiro país europeu a detectar Covid-19 em sua população, houve um atraso para a testagem em massa e a implementação de medidas de isolamento social. Com isso, o país enfrentou hospitais lotados e altos índice de mortalidade (9%) entre os idosos, sendo que somente 1% das mortes foram detectadas em pacientes com menos de 50 anos de idade (INDOLFI; SPACCAROTELLA, 2020). No Brasil, a região norte do país é uma das mais afetadas pela crise, devido a um contexto que combina extrema desigualdade socioeconômica, precariedade na infraestrutura de saúde e a má gestão destes recursos. Se comparada com os outros estados, apresentam proporcionalmente o menor número de leitos de UTI, médicos e ventiladores, resultando em grande número de internações e óbitos que cresceram exponencialmente. Aliado ao contexto de sobrecarga no Sistema Único de Saúde (SUS), a população desassistida corre um grande risco de sofrer danos irreversíveis (DASPETT MENDONÇA et al., 2020).

Em um estudo preliminar sobre as dinâmicas de transmissão em Wuhan (LI et al., 2020), o tempo de incubação médio do vírus é de 5,2 dias até a apresentação de sintomas e o tempo médio do início da apresentação de sintomas até a hospitalização é de 2,2 dias em 27% dos casos, mas o tempo até a hospitalização foi de pelo menos 5 dias, em 89% dos casos. Esta demora decorre da dificuldade de identificar pacientes em estágios precoces da doença. Diante desta situação, é ressaltada a importância da busca ativa de casos assintomáticos da doença, uma vez que a taxa de infectividade aumenta conforme o progresso da doença, aproximadamente 5 ou 6 dias antes do aparecimento de qualquer sintoma e atingindo pico de infectividade no início da apresentação de sintomas (HE et al., 2020)

De acordo com MORIYAMA; HUGENTOBLER; IWASAKI (2020) as dinâmicas de transmissão de vírus respiratórios são sazonais e acontecem através de contato direto e indireto, com aerossóis curtos ou aerossóis de longo alcance. A transmissão ocorre predominantemente

através do contato com gotículas de diâmetro grande ($>10\mu\text{m}$ em diâmetro) ou pequeno ($>5\mu\text{m}$ em diâmetro) com membranas mucosas. A eficiência destes meios de transmissão depende majoritariamente das condições ambientais externas ou internas e do material da superfície onde estas partículas foram depositadas.

Em um esforço para determinar a viabilidade do vírus e sua meia vida em aerossóis e em diferentes materiais cotidianos (VAN DOREMALEN et al., 2020), utilizou-se uma câmara para o estudo de aerossóis, onde o SARS-CoV-2 permaneceu viável durante três horas. O material onde o vírus apresentou maior viabilidade foi o plástico, por um período de 72 horas; no aço inoxidável, 48 horas; e os menores tempos de viabilidade foram no papelão e no cobre, com 8 e 4 horas de viabilidade, respectivamente. Um exemplo da alta persistência do SARS-CoV-2 no ambiente foi descrita no estudo de SANTARPIA et al. (2020) que analisou amostras ambientais do navio Diamond Princess Cruise. Este navio precisou passar por um período de quarentena durante o começo da pandemia, devido a um surto dentre os integrantes da embarcação. Amostras ambientais como roupas, cartões de acesso e lugares de toque frequente foram analisadas por RT-PCR e dentre as 163 amostras, 121 (72,4%) amostras obtiveram resultado de PCR positivo para SARS-CoV-2.

A alta transmissibilidade pelos aerossóis liberados por humanos, ocorre não só por mecanismos diretos como tosses ou espirros, fala e respiração, mas também por mecanismos indiretos como o contato com objetos infectados (SANTARPIA et al., 2020). Estas descobertas suportam a necessidade de analisar os insetos como um agente sentinela ou até um vetor mecânico do SARS-CoV-2 (BIOL; RUJ, 2021).

O grupo dos insetos hematófagos são responsáveis pela transmissão de uma grande variedade de doenças virais para humanos e animais dentre os mais importantes estão: febre amarela, Zika, Febre do Nilo ocidental, Chikungunya e Dengue. (BIOL; RUJ, 2021) Além disto, as moscas domésticas e baratas são outros vetores conhecidos de uma vasta diversidade de patógenos como bactérias, protozoários, fungos, ovos de vermes intestinais e vírus, como o vírus da poliomielite. Em experimento controlado, as moscas domésticas foram capazes de atuar como vetores mecânicos na transmissão do coronavírus de perus (CALIBEO-HAYES et al., 2003). Portanto, a investigação do papel de insetos na transmissão de SARS-CoV-2 tem grande relevância para auxiliar no controle da pandemia.

Existem fortes evidências de que a rota de infecção fecal-oral de SARS-CoV-2 é possível. XIAO et al. (2020) demonstraram, por estudos de identificação de marcadores genéticos por imunofluorescência, que células glandulares de epitélio gástrico, duodenal e retal, podem ser

infectadas pelo SARS-CoV-2 por expressar grande quantidade dos receptores ACE2, porta de entrada para o vírus nas células humanas. A infecção se mantém nas células gastrointestinais e o RNA viral pode ser detectado continuamente nas fezes mesmo após RT-PCR das vias aéreas indicarem resultado negativo, o que indica que a rota de infecção fecal-oral deve ser considerada, e mais medidas de higiene devem ser levadas em conta.

Diante do fato de que a replicação do SARS-CoV-2 não é possível em insetos hematófagos (HUANG et al., 2020) e alguns animais domésticos podem servir como hospedeiro intermediário (SHI et al., 2020), é necessário verificar se o vírus pode ser transportado por insetos, já que a rota fecal-oral é possível e estes insetos normalmente se alimentam e são atraídos por fezes e alimentos possivelmente contaminados. Em ambientes críticos como em hospitais, com alta circulação de patógenos e de pessoas, artrópodes podem ser importantes vetores de doenças e eventualmente causar infecções hospitalares que agravam o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes internados. LIMA et al., 2013; MÁXIMO et al. (2014) relataram a presença de gêneros como Salmonella, Staphylococcus, Klebsiella e Enterobacter em insetos capturados dentro de ambientes hospitalares.

A presença de SARS-CoV-2 em aerossóis também levanta a possibilidade de que artrópodes também sejam vetores mecânicos ou organismos sentinelas indicando a circulação do patógeno. A alimentação destes insetos é muito diversa e pode ocorrer em ambientes contaminados com resíduos humanos, animais e hospitalares. Com isto, eles são capazes de contaminar humanos através do mecanismo de fômites que ocorre quando uma superfície contaminada é tocada e em seguida as mãos contaminadas são passadas nos olhos, que através do tecido conjuntivo é acometido pela infecção (DEHGHANI; KASSIRI, 2020). A infecção indireta por contato ambiental com o vírus descrita por (PANG et al., 2020) é preocupante pois demonstra como um surto de Covid-19 pode começar pelo contato com itens contaminados. Em uma fábrica de processamento de proteínas congeladas, evidenciou-se o início de um surto de Covid-19, que provavelmente ocorreu pelo contato com salmões importados por funcionários da fábrica. Os funcionários contaminados chegaram a 20%. Após análise de todo o lote de salmão importado, dentre 3582 espécimes, apenas 6 foram positivas para RNA de SARS-CoV-2. Isto ressalta a importância da intervenção imediata e medidas de higiene e vigilância de alimentos e insetos, pois estes podem participar da cadeia de transmissão do SARS-CoV-2.

Objetivos

Avaliar a presença de SARS-CoV-2 em insetos e fragmentos de plantas coletados em locais próximos ao hospital de campanha localizado no ginásio de esportes da UFABC.

Objetivos específicos

- Coletar insetos e fragmentos de plantas em locais próximos ao hospital de campanha localizado no ginásio de esportes da UFABC;
- Extrair ácidos nucleicos dos insetos e plantas coletados;
- Detectar RNA de SARS-CoV-2 por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real e em termociclador convencional.

Material e Métodos

Coleta de amostras

O local de estudo deste projeto foi o hospital de campanha de UFABC, localizado no ginásio do campus de Santo André no endereço Av. dos Estados, 5001 - Bangú, Santo André - SP, 09210-580. As coletas foram feitas no dia 5 de fevereiro de 2021, no entorno do hospital de campanha, e em plantas localizadas próximas ao carrinho de cachorro-quente onde os funcionários do hospital de campanha fazem refeições (Figura 1). As áreas do entorno foram inspecionadas para busca de formigas, baratas, mosquitos, moscas e plantas. As amostras coletadas foram acondicionadas em tubos de 1,5 mL estéreis de forma manual, com desinfecção das mãos com 70% de etanol a cada coleta.



Figura 1. Locais de coleta indicados com as flechas brancas no entorno do hospital de campanha da UFABC Santo André.

Extração de ácidos nucleicos

O método de extração de ácidos nucleicos foi realizado de acordo com o método descrito por (SANTOS et al., 2018); utilizando o kit de extração de DNA genômico Purelink® (ThermoFischer Invitrogen). Para tanto, ao tubo de 1,5 mL contendo o inseto ou fragmento de planta foi adicionado 200 uL do tampão de digestão disponibilizado no kit e 400µg / mL de Proteinase K. O inseto foi digerido durante 16 horas a 56⁰C. Posteriormente, os 200 uL de tampão de digestão foi transferido para outro tubo de 1,5 mL e a extração de ácidos nucleicos seguiu protocolo disponibilizado pelo kit utilizado. Os ácidos nucleicos obtidos foram dissolvidos em um volume final de 30 µL de tampão de eluição. O protocolo aplicado está em [protocol.io](https://protocol.io/doi.org/10.17504/protocols.io.kkqcuvw) no link: [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kkqcuvw](https://protocol.io/doi.org/10.17504/protocols.io.kkqcuvw).

A concentração e a qualidade dos ácidos nucleicos extraídos foram determinadas por avaliação em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Deteção de SARS-CoV-2 por RT/PCR em tempo real e termociclador convencional

As amostras de ácidos nucleicos foram submetidas a síntese de DNA complementar (cDNA) com transcriptase reversa Script® da Cellco a partir de 8,5 uL (aproximadamente 1 ug de RNA). Ao RNA foram adicionados 5 uM de hexâmetros aleatórios da ThermoFischer Scientific e 1 uL de 10 mM de dNTP. A solução foi aquecida a 70⁰C por 5 min e colocada no gelo. A essa solução foi adicionado 4 uL de 5x RT buffer, 1 uL de DTT 100 mM, 0,5 uL de 200u/uL de transcriptase reversa e o volume foi acertado para 20 uL com água. A síntese foi realizada em termociclador por 10 min a 42⁰C, 50 min a 50⁰C e 15 min a 85⁰C.

A PCR convencional foi realizada com utilização de 2 uL do cDNA sintetizado de cada amostra, sendo realizada à amplificação do gene que codifica a proteína do envelope viral e de um fragmento do gene que amplifica a proteína Spike do SARS-CoV-2. O protocolo utilizado para amplificação do fragmento da proteína Spike foi descrito por (SHIRATO et al., 2020) e consiste em uma reação de PCR seguida de *nested* PCR. A PCR foi realizada com os oligos WuhanCoV-sp1-f(S)/Spk2r (AS) e a *nested* foi feita com os oligos NIID_WH-1_F24381 (S)/R24873 (AS) a partir de 2 uL da PCR após tratamento com o kit Exosap da Cellco, por 20 minutos a 37⁰C e 10 min a 85⁰C. A enzima utilizada para PCR foi a Taq DNA polimerase Hot Start da Cellco de acordo com

instruções do fabricante. As condições da PCR estão descritas na tabela 1. Foi realizado controle negativo da reação com água no lugar de cDNA na reação de PCR.

A PCR em tempo real foi realizada com a metodologia Taqman com uso de sonda marcada com fluoresceína em reações multiplex. Foi realizada uma reação multiplex com o conjunto de primers e sondas para amplificação e detecção da proteína do nucleocapsídeo N1 e N2 e como controle da presença de ácido nucléico de humano, o conjunto de primers e sonda para amplificação e detecção da RNase P humana. Outra reação multiplex foi realizada com o gene que codifica a proteína do envelope de SARS-CoV-2 e a RNase P humana. Para realizar a reação de PCR em tempo real foi utilizado o Mix de qPCR Taqman da Promega de acordo com as instruções do fornecedor com adição do conjunto de oligos e sondas. Os oligos foram utilizados na concentração final de 1 uM de cada um dos pares e as sondas na concentração final de 0,4 uM. Em cada reação foram utilizados controles positivo e negativo da reação e as condições estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos, sondas e condições das reações de PCR convencional e PCR em tempo real utilizados Nome	5' sequência 3'	Gene	Amplificon	Condições PCR
WuhanCoV-sp1-f (S)	TTGGCAAATTC AAGACTCACTT T	Spike	544 pb	94°C 3'/ 40 ciclos de 94°C 30'' - 56°C 30'' - 72°C 30''/72° C 5'
WuhanCoV-sp2-r (AS)	TGTGGTTCATAAAAATTCCTTTG TG			
NIID_WH- 1_F24381 (S)	TCAAGACTCACTTTCTTCCAC			

NIID_WH- 1_R24873 (AS)	ATTTGAAACAAAGACACCTTCAC			de 94°C 30'' - 56°C 30'' - 72°C 30''/72° C 5'
ESars2_sense_Bv	ATGTACTCATTTCGTTTCGGAAGA G	Envelope	227 pb	94°C 3'/ 40 ciclos de 94°C 30'' - 58°C 30'' - 72°C 30''/72° C 5'
ESars2_antisense_ Bv	GACCAGAAGATCAGGAACTCT			
2019-nCoV_N1-F	GACCCCAAATCAGCGAAAT	Nucleocapsídeo	PCR em tempo real com utilizaçã o de sonda em reações multiple	95°C 3'/ 45 ciclos de 95°C 3'' - 55°C 30''
2019-nCoV_N1-R	TCTGGTACTGCCAGTTGAATCT G			
2019-nCoV_N1- Sonda	FAM - ACCCCGCATTACGTTTGGTGGAC C-BHK			
2019-nCoV_N2-F	TTACAAACATTGGCCGCAA	Nucleocapsídeo	em reações multiple	
2019-nCoV_N2-R	GCGCGACATTCCGAAGAA			
2019-nCoV_N2 - Sonda	Hex - ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG -BHK			
RNase P (RP-F)	AGATTTGGACCTGCGAGCG	RNase P humana	x N1/N2/R P E/RP	Controle positivo da qPCR nas condiçõe s de
RNase P (RP-R)	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT			
RNase P (RP-P) - Sonda	TxR - TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG -DQ			

				N1/N2 ou E- Sarbeco
E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAG CGT	Envelope		95°C 3'/ 45 ciclos de 95°C 5'' - 58°C 30''
E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA			
E_Sarbeco_Sonda	FAM- ACACTAGCCATCCTTACTGCGCT TCG-BHK			

Tabela 1. Oligonucleotídeos, sondas e condições das reações de PCR convencional e PCR em tempo real utilizados

Clonagem e sequenciamento dos produtos de PCR obtidos

Os produtos de PCR de 227 pb do gene que codifica a proteína E de SARS-CoV-2 e de 492 pb referente ao gene que codifica a proteína Spike do vírus, amplificados a partir de uma formiga e de uma das pernas da barata, respectivamente, foram clonados em vetor TOPO-TA adquirido na ThermoFisher Scientific. Para realizar a clonagem, inicialmente os produtos de PCR foram purificados com kit de purificação de fragmentos de PCR EasyPure (Transgene Biotech) seguindo instruções do fornecedor e diluídos em 30 uL de 10 mM de Tris-HCl pH 7,8. 2 uL dos Produtos de PCR purificados (aproximadamente 100 ng) foram incubados por 5 min com 0,5 uL do vetor TOPO-TA e 2, 5uL de solução salina, de acordo com as instruções do fornecedor do kit de clonagem que acompanha o vetor. Posteriormente os produtos de ligação foram transformados em bactérias *Escherichia coli* da estirpe MachT1 (ThermoFischer Scientific) e as colônias recombinantes foram selecionadas em placas com meio de cultura LB contendo 50 ug/mL de Ampicilina. Os clones selecionados foram submetidos a reação de PCR com os oligonucleotídeos M13 F e M13 R (Tabela 1), e os clones positivos foram utilizados para produção de plasmídeo. Os plasmídeos obtidos a partir de um clone de cada um dos fragmentos obtidos a partir dos insetos coletados, foram enviados para o serviço de sequenciamento da empresa ACTGene pelo método de Sanger.

Resultados

Foram coletadas 10 formigas e duas pernas traseiras de uma barata coletados nos jardins que circundam o hospital de campanha. Foram também coletados 4 fragmentos de plantas próximas ao carrinho de cachorro-quente próximo ao hospital de campanha. Foram obtidos ácidos nucleicos (RNA e DNA) de todos os espécimes coletados e a qualidade foi confirmada por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo (resultados não apresentados).

A detecção de SARS-CoV-2 foi realizado por transcrição reversa seguida de PCR em tempo real e em termociclador convencional. Todas as amostras testadas foram positivas em reação de PCR em tempo multiplex com os conjuntos de oligonucleotídeos complementares a proteína do Nucleocapsídeo do vírus (N1 e N2), sendo negativas com os oligonucleotídeos e sonda para detecção do fragmento correspondente à RNase P humana. Os controles negativos e positivos tiveram resultados esperados.

Com o intuito de verificar se as amostras positivas com os marcadores N1 e N2 em tempo real foram decorrentes de RNA ou de DNA, a reação de PCR multiplex em tempo real foi realizada diretamente a partir dos ácidos nucleicos extraídos. Todas as amostras tiveram resultado positivo para N1 e N2 e negativo para RNase P humana, indicando que a amplificação ocorreu a partir de DNA e não de RNA.

A formiga 2 apresentou diagnóstico de SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real positivo com utilização do conjunto de oligonucleotídeos e sonda para detecção do gene que codifica a proteína do envelope do vírus (Tabela 1). A partir da mesma formiga foi amplificado o fragmento de 227 pb com oligonucleotídeos complementares ao gene que codifica a proteína E de SARS-CoV-2 (Tabela 1) por reação de RT-PCR convencional (Figura 2).

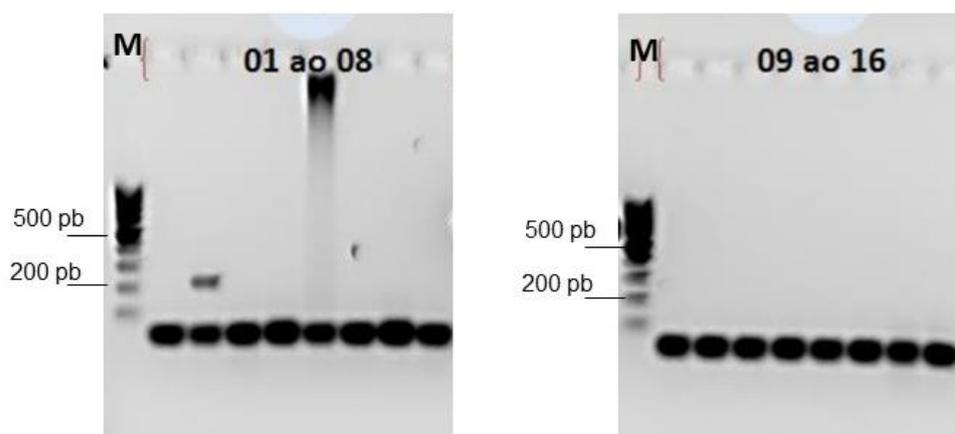


Figura 2. Eletroforese em géis de agarose 2% corados com brometo de etídeo contendo produtos de RT-PCR obtidos com os oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 227 pb do gene que codifica a proteína E de SARS-CoV-2. 1 a 16: amostras de insetos coletados nas proximidades do hospital de campanha localizado no ginásio de esportes da UFABC, onde 1 a 10 são espécimes de formigas; 11 e 12 são pernas de uma barata; 13 a 16 são fragmentos de plantas. M: marcador de peso molecular 100 pb ladder.

O diagnóstico de SARS-CoV-2 por RT-PCR em termociclador convencional, seguido de *nested*-PCR para amplificação de um fragmento de 492 pb correspondente ao gene que codifica a proteína Spike do vírus, foi positivo para uma das pernas da barata coletada (Figura 3).

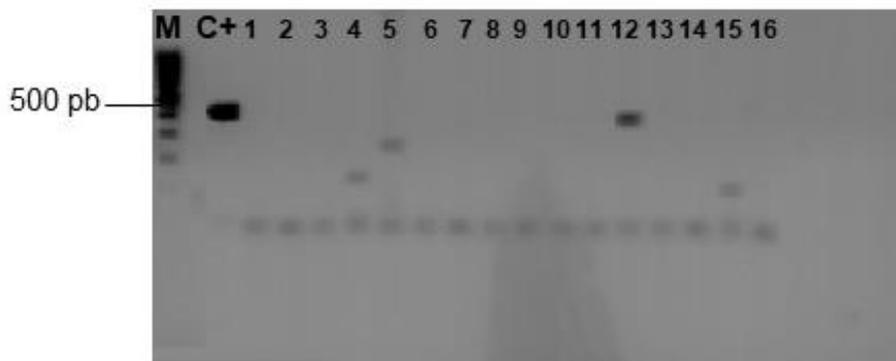


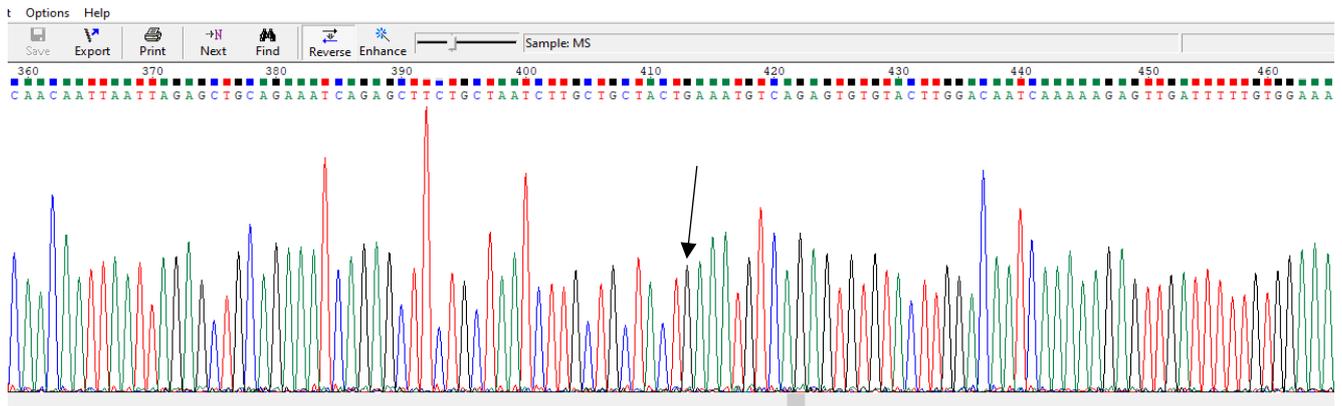
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo contendo produto de RT-PCR e nested-PCR com os oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 492 pb do gene que codifica a proteína Spike de SARS-CoV-2. 1 a 16: amostras de insetos coletados nas proximidades do hospital de campanha localizado no ginásio de esportes da UFABC, onde 1 a 10 são espécimes de formigas; 11 e 12 são pernas de uma barata; 13 a 16 são fragmentos de plantas. M: marcador de peso molecular 100 pb ladder; C+: controle positivo da reação de PCR. A amostra 12 apresentou um fragmento de tamanho esperado.

Os produtos de PCR de 227 pb e 492 pb amplificados a partir dos ácidos nucléicos da formiga 2 e da perna da barata, correspondentes aos **genes** que codificam as proteínas E Spike de SARS-CoV-2, respectivamente, foram clonados no vetor TOPO-TA. Foram obtidos 2 clones de cada um dos fragmentos, conforme demonstrado por PCR das colônias de bactérias transformadas com cada um dos produtos de PCR e resistentes a ampicilina (Figura 4). Os dois clones de cada fragmento foram enviados para sequenciamento pelo método de Sanger.



Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo produto de PCR com os oligonucleotídeos M13F e M13R a partir de diferentes colônias de bactérias transformadas com plasmídeo TOPO-TA. EF1-5: diferentes colônias bactérias resistentes à ampicilina ligadas ao fragmento de PCR de 227 pb correspondente ao gene que codifica a proteínas E de SARS-CoV-2 a partir da formiga 2. **SB1-8:** diferentes colônias bactérias resistentes à ampicilina ligadas ao fragmento de PCR de 227 pb correspondente ao gene que codifica a proteínas E de SARS-CoV-2 a partir da formiga 2. **M:** marcador de peso molecular 100 pb ladder. As colônias EF2 e 3 apresentaram o tamanho esperado de aproximadamente 500 pb e as colônias SB2 e 5 apresentaram o tamanho esperado de aproximadamente 800 pb.

Após análise comparativa nos bancos de dados público, National Center for Biotechnology Information (NCBI), e Global Initiative on Sharing all Influenza Data (GISAID), utilizando o software de busca Basic Local Alignment Sequence Tool (BLAST), das sequências obtidas dos fragmentos de 227 pb a partir da amostra de formiga e de 492 pb a partir da amostra de barata, foi confirmada a similaridade das mesmas com os genes que codificam as proteínas do envelope e Spike de SARS-CoV-2, respectivamente. As figuras 5-8 contêm o resultado das análises comparativas da sequência de nucleotídeos e de aminoácidos traduzida, de cada um dos fragmentos. Observa-se que a sequência correspondente a proteína E de SARS-CoV-2 apresenta duas modificações de nucleotídeos únicas e uma das modificações resulta em substituição de um aminoácido asparagina por uma serina (Figuras 5, 8 e 9). A sequência do fragmento de PCR correspondente ao gene que codifica a proteína Spike de SARS-CoV-2 de 492 pb, apresenta a modificação de um nucleotídeo, que resulta na alteração de um aminoácido lisina por uma glutamina (Figuras 5, 6 e 7).



B. SARS-CoV-2 – Envelope

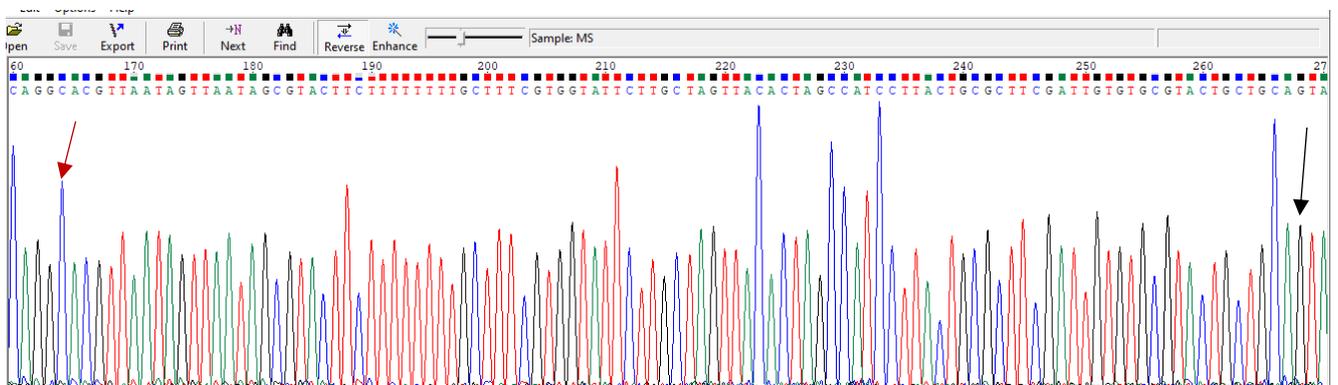


Figura 5. Cromatograma das reações de sequenciamento pelo método de Sanger, após eletroforese capilar dos fragmentos de 492 pb (A) e 227 pb (B) contendo as regiões com modificações nucleotídicas. A flecha preta indica modificações que resultaram em alterações aminoacídicas e a flecha vermelha indica modificações que não resultam em alterações aminoacídicas.

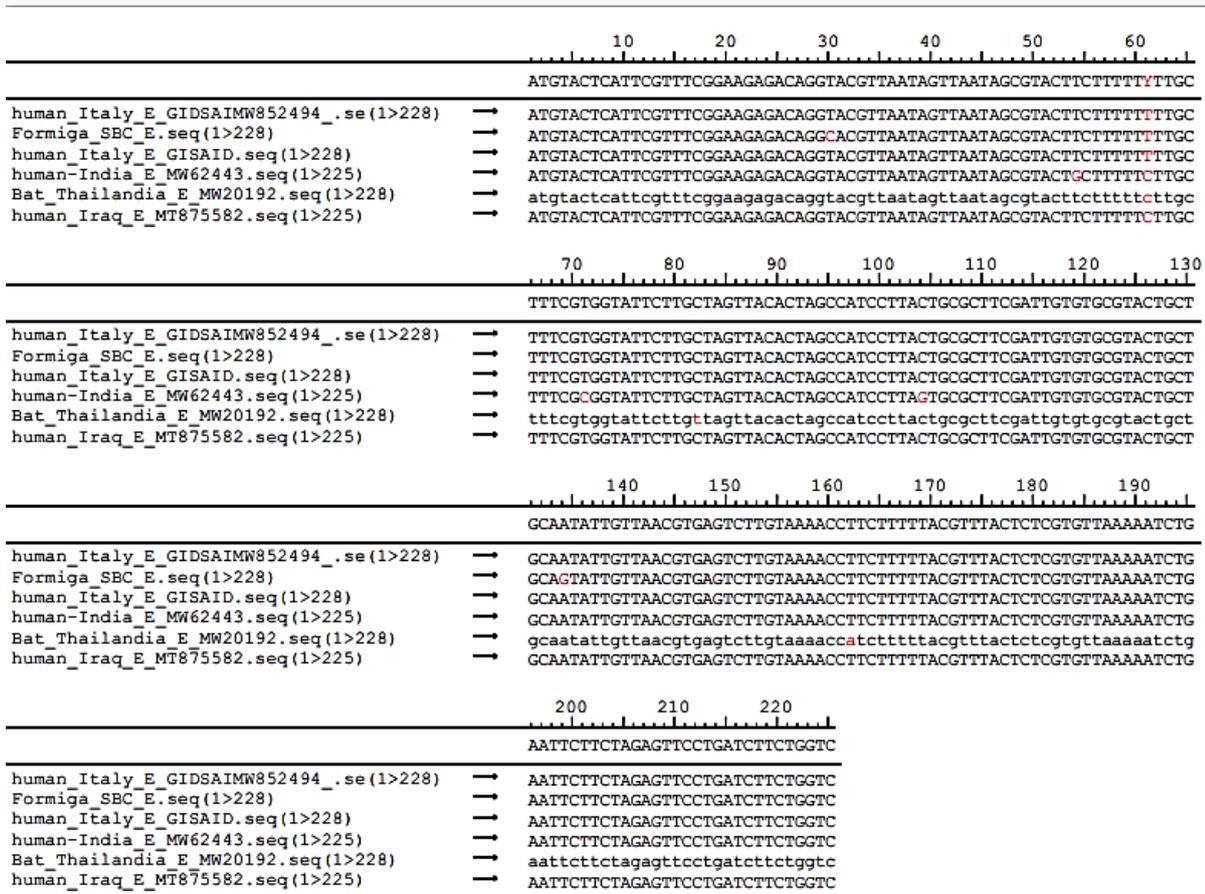


Figura 6. Comparação da sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína E de SARS-CoV-2 obtida a partir do espécime de formiga, com as sequências de SARS-CoV-2 obtidas de humanos (human) e de Betacoronavírus de morcego (Bat) com maior similaridade após busca em banco de dados públicos por BLAST. Os nucleotídeos divergentes estão em vermelho.

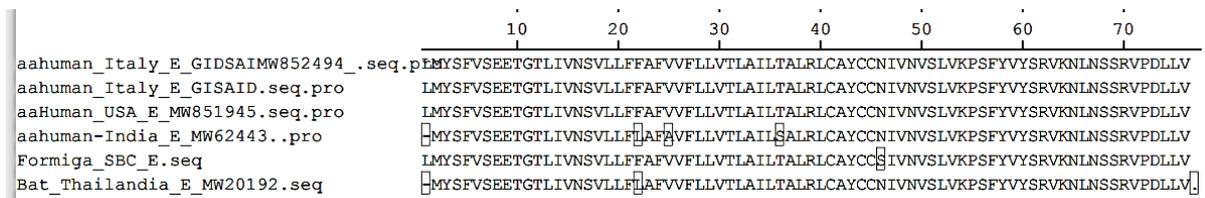


Figura 7. Comparação da sequência aminoacídica do gene que codifica a proteína E de SARS-CoV-2 obtida a partir do espécime de formiga, com as sequências de SARS-CoV-2 obtidas de humanos (human) e de Betacoronavírus de morcego (Bat) com maior similaridade após busca em banco de dados públicos por BLAST. Os aminoácidos divergentes estão discriminados em quadrados.

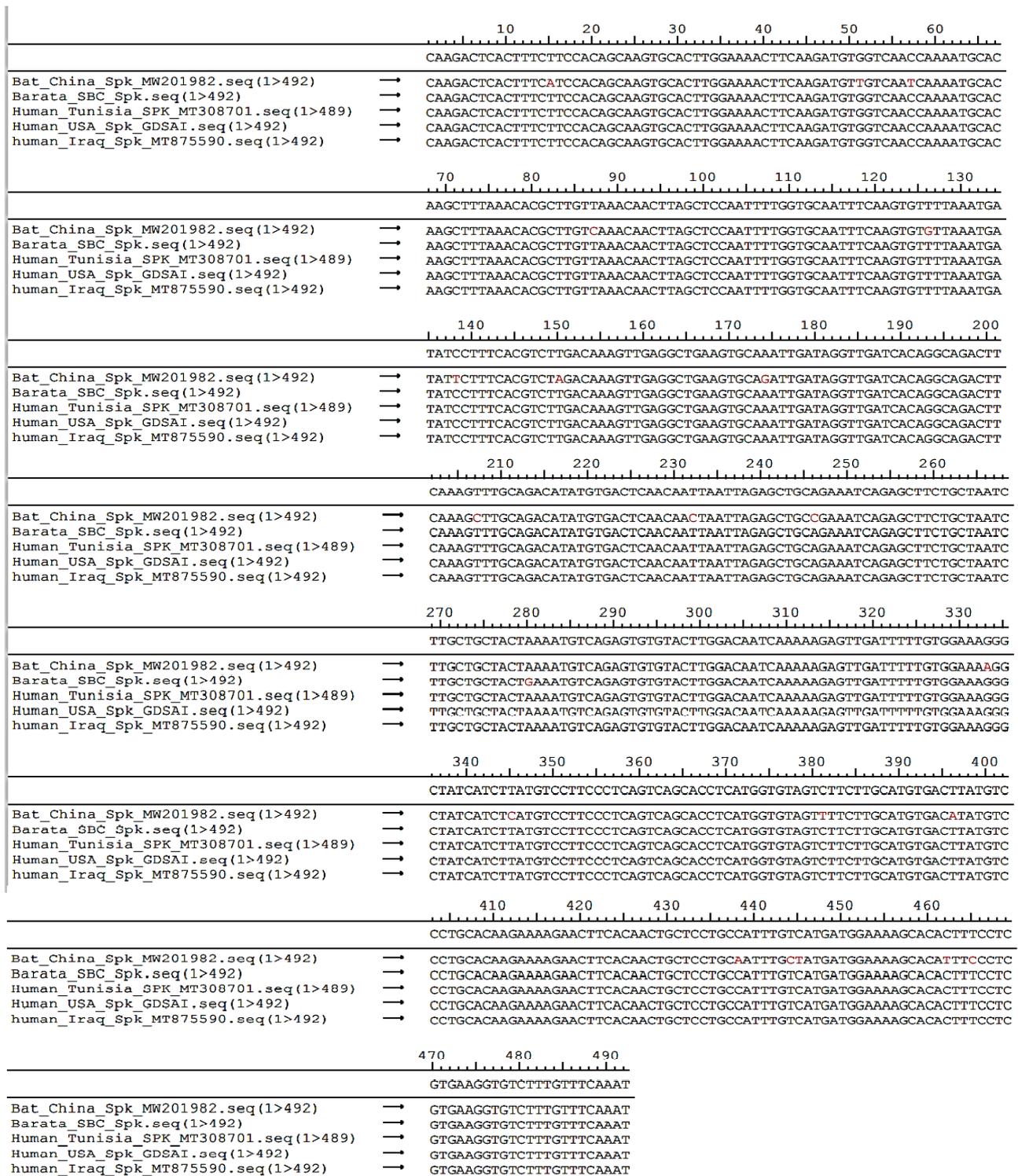


Figura 8. Comparação da sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína Spike de SARS-CoV-2 obtida a partir do espécime de barata, com as sequências de SARS-CoV-2 obtidas de humanos (human) e de Betacoronavírus de morcego (Bat) com maior similaridade após busca em banco de dados públicos por BLAST. Os nucleotídeos divergentes estão em vermelho.

Majority	QDLSSTASALGKLDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISVSLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIR	
	10 20 30 40 50 60 70 80	
aaHuman_USA_Spk_GDSAI.pro	QDLSSTASALGKLDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISVSLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIR	80
aaBarata_SBC_Spk.pro	QDLSSTASALGKLDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISVSLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIR	80
aaBat_China_Spk_MW201982.pro	QDLSSTASALGKLDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISVSLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIR	80
aahuman_Iraq_Spk_MT875590.pro	QDLSSTASALGKLDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISVSLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIR	80
aaHuman_Tunisia_SPK_MT308701.pro	QDLSSTASALGKLDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISVSLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIR	80
Majority	AAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHILMSFPQSAPHGVVFLHVTVYVPAQEKNF [□] TTAPAICH [□] DGKAHF [□] PREGV	
	90 100 110 120 130 140 150 160	
aaHuman_USA_Spk_GDSAI.pro	AAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHILMSFPQSAPHGVVFLHVTVYVPAQEKNF [□] TTAPAICH [□] DGKAHF [□] PREGV	160
aaBarata_SBC_Spk.pro	AAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHILMSFPQSAPHGVVFLHVTVYVPAQEKNF [□] TTAPAICH [□] DGKAHF [□] PREGV	160
aaBat_China_Spk_MW201982.pro	AAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHILMSFPQSAPHGVVFLHVTVYVPAQEKNF [□] TTAPAICH [□] DGKAHF [□] PREGV	160
aahuman_Iraq_Spk_MT875590.pro	AAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHILMSFPQSAPHGVVFLHVTVYVPAQEKNF [□] TTAPAICH [□] DGKAHF [□] PREGV	160
aaHuman_Tunisia_SPK_MT308701.pro	AAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHILMSFPQSAPHGVVFLHVTVYVPAQEKNF [□] TTAPAICH [□] DGKAHF [□] PREGV	160
Majority	FVSN	

aaHuman_USA_Spk_GDSAI.pro	FVSN	164
aaBarata_SBC_Spk.pro	FVSN	164
aaBat_China_Spk_MW201982.pro	FVSN	164
aahuman_Iraq_Spk_MT875590.pro	FVSN	164
aaHuman_Tunisia_SPK_MT308701.pro	FVSN	163

Figura 9. Comparação da sequência aminoacídica do gene que codifica a proteína Spike de SARS-CoV-2 obtida a partir do espécime de barata, com as sequências de SARS-CoV-2 obtidas de humanos (human) e de Betacoronavírus de morcego (Bat) com maior similaridade após busca em banco de dados públicos por BLAST. Os aminoácidos divergentes estão discriminados em quadrados.

Discussão

O controle da transmissão do SARS-CoV-2 é ainda a melhor forma de controlar surtos e prevenir novas infecções. Além disto novas possibilidades de contágio devem ser levadas em consideração e estudadas exaustivamente diante do impacto socioeconômico e sanitário que surtos da doença geram. O papel de artrópodes na possível infecção de humanos seja pela via fecal-oral seja pelo contato direto ainda permanece incerto. Apesar dos esforços globais para o controle do vírus em várias frentes de pesquisa não existem comprovações da contribuição de artrópodes no contágio do SARS-CoV-2 para humanos, apenas indicações de que o contágio poderá ocorrer de maneira direta ou indireta com artrópodes (BIOL; RUJ, 2021; ISMAIL et al., 2020; REUBEN; GYAR; DANLADI, 2020). Neste sentido, este trabalho é inédito ao comprovar a presença de partículas virais em insetos que circundam o hospital de campanha da UFABC, não havendo nenhum outro trabalho publicado, até a data de finalização deste trabalho em abril de 2021. Isto ressalta que a possibilidade existe, mesmo que remota, de que a transmissão mediada por insetos ocorra.

O pesquisador CALIBEO-HAYES et al. (2003) comprovou que a transmissão mecânica de uma espécie de coronavírus ocorre em ambiente de criação de perus pela ingestão de moscas domésticas contaminadas. Esse estudo foi realizado em um ambiente controlado, com uma espécie de Coronavírus diferente da qual enfrentamos, mas indica que o surgimento de novas variantes com características imprevisíveis, possa selecionar vírus com características imprevisíveis inclusive com maior probabilidade de infecção mecânica por insetos (DAVIES et al., 2020; KORBER et al., 2020).

A quantificação de SARS-CoV-2 no esgoto desempenha importante papel no monitoramento da COVID-19, com a análise de regiões afetadas e estimativa dos casos assintomáticos (CLARO et al., 2020). Visto que o Brasil ainda é um país muito desigual e com muitos problemas de saneamento básico, a infecção por via fecal-oral e por aerossóis produzidos em regiões de esgoto não tratado, pode ocorrer, principalmente em trabalhadores expostos. A presença de vírus com potencial infetivo em fezes, permanece por tempo considerável e pacientes com exames respiratórios negativos para coronavírus permaneceram eliminando vírus nas fezes por até cinco semanas (WENHAM; LOTTA; NACIF PIMENTA, 2020; WU et al., 2020). A presença de insetos em esgotos é comum, e os resultados obtidos indicam que Insetos que tenham contato com fezes podem levar o vírus e assim, se este ainda apresentar potencial infectivo, poderá ocorrer transmissão mecânica da doença.

Os dados sobre a persistência do SARS-CoV-2 no ambiente ainda são escassos e alguns apresentam controvérsias entre si. De acordo com CARRATURO et al. (2020), a persistencia do vírus em temperaturas menores que 4°C é de até 72 horas, no entanto (FIORILLO et al., 2020) afirma que é possível a persistência do vírus por mais de 28 dias nas mesmas condições, mas ambos convergem quanto a diminuição da persistência de SARS-CoV-2 no ambiente com a elevação da temperatura, com perda exponencial da viabilidade de infecção com o aumento de temperatura. A contribuição de parâmetros ambientais na determinação da viabilidade do SARS-CoV-2, incluindo temperatura, humidade e tipo de superfície ainda não estão bem estabelecidos, entretanto, há consenso de que o plástico mantém a viabilidade do SARS-CoV-2 por mais tempo quando comparado ao vidro, aço inoxidável, papel e papelão (CARRATURO et al., 2020; FIORILLO et al., 2020; SANTARPIA et al., 2020; VAN DOREMALEN et al., 2020). Os insetos possuem exoesqueleto de quitina, e mais estudos são necessários para conhecimento da viabilidade do SARS-CoV-2 nos mesmos.

Neste estudo, foi demonstrada a presença de fragmentos genéticos de SARS-CoV-2 em dois espécimes de insetos, comprovada por sequenciamento, com diferentes marcadores, indicando

fragmentação do vírus. Portanto, a transmissão mecânica por esses insetos dificilmente deve ocorrer, entretanto, estes indicam a ocorrência de vírus em áreas próximas aos hospitais e permitem estudar a variabilidade genética dos vírus circulantes por meio do sequenciamento de fragmentos genômicos. As duas sequências obtidas nesse estudo são inéditas nos bancos de dados públicos pesquisados, indicando a evolução regional do SARS-CoV-2.

Conclusão

Apesar da pequena amostra estudada neste trabalho, observamos a presença de RNA genômico de SARS-CoV-2 nas amostras de insetos coletadas no entorno do hospital de campanha da UFABC, o que pode ter implicações importantes em investigação epidemiológica de vírus circulantes em locais próximos a hospitais. Este trabalho também assinala a importância do estudo de artrópodes na transmissão do novo coronavírus e para que novos protocolos de higiene e controle da doença sejam aprimorados.

Referências

- ARMOCIDA, B. et al. **The Italian health system and the COVID-19 challenge** *The Lancet Public Health*, Elsevier Ltd, , 1 maio 2020.
- BIOL, S. L. J.; RUJ, K. R. Insect vectors of human viral diseases : Can they transmit COVID-19 ? v. 6, n. January, p. 3–14, 2021.
- CALIBEO-HAYES, D. et al. Mechanical transmission of turkey coronavirus by domestic houseflies (*Musca domestica* Linnaeus). **Avian Diseases**, v. 47, n. 1, p. 149–153, 2003.
- CARRATURO, F. et al. Persistence of SARS-CoV-2 in the environment and COVID-19 transmission risk from environmental matrices and surfaces. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 115010, 2020.
- CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, 2020.
- CONFALONIEIRI, U. E. C. emergência de doenças infecciosas humanas: Processos ecológicos e abordagens preditivas. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 3, p. 591–602, 2010.
- DASPETT MENDONÇA, F. et al. Região Norte do Brasil e a pandemia de COVID-19: análise socioeconômica e epidemiológica. **Journal Health NPEPS**, v. 5, n. 1, p. 20–37, 2020.
- DAVIES, N. G. et al. **Estimated transmissibility and severity of novel SARS-CoV-2 Variant of Concern 202012/01 in England** *medRxivmedRxiv*, , 26 dez. 2020.

- DE WIT, E. et al. SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 523–534, 2016.
- DEHGHANI, R.; KASSIRI, H. A brief review on the possible role of houseflies and cockroaches in the mechanical transmission of coronavirus disease 2019 (Covid-19). **Archives of Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. COVID-19, p. 6–10, 2020.
- EHRENFELD, M. et al. Covid-19 and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, p. 102597, 2020.
- FIORILLO, L. et al. COVID-19 Surface Persistence: A Recent Data Summary and Its Importance for Medical and Dental Settings. [s.d.].
- GONZALEZ, R. I. et al. Is a COVID19 Quarantine Justified in Chile or USA Right Now? **medRxiv**, 24 mar. 2020.
- HAMNER, L. et al. High SARS-CoV-2 Attack Rate Following Exposure at a Choir Practice. **Morbidity and Mortality Weekly Report High**, v. 69, n. 19, p. 606–610, 2020.
- HE, X. et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 5, p. 672–675, 2020.
- HUANG, Y. J. S. et al. SARS-CoV-2 failure to infect or replicate in mosquitoes: an extreme challenge. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–4, 2020.
- INDOLFI, C.; SPACCAROTELLA, C. The Outbreak of COVID-19 in Italy. **JACC: Case Reports**, v. 2, n. 9, p. 1414–1418, jul. 2020.
- ISMAIL, M. et al. Possible Mechanical Transmission of SARS-CoV-2 Causing COVID-19 by Insects: Infection, Prevention, Implications, and Control. **Open Journal of Medical Microbiology**, v. 10, n. 02, p. 89–101, 2020.
- JUNEJO, Y. et al. Novel SARS-CoV-2/COVID-19: Origin, pathogenesis, genes and genetic variations, immune responses and phylogenetic analysis. **Gene Reports**, v. 20, n. June, p. 100752, 2020.
- KORBER, B. et al. Spike mutation pipeline reveals the emergence of a more transmissible form of SARS-CoV-2. **bioRxiv**, 2020.
- LI, Q. et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 2020.
- LIMA, W. R. DOS S. et al. Ants in a hospital environment and their potential as mechanical bacterial vectors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 5, p. 637–640, set. 2013.
- MÁXIMO, H. J. et al. Ants as vectors of pathogenic microorganisms in a hospital in São Paulo county, Brazil. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 1–5, 20 ago. 2014.
- MITJÀ, O. et al. **Experts’ request to the Spanish Government: move Spain towards complete lockdown**The LancetLancet Publishing Group, , 11 abr. 2020.
- MORIYAMA, M.; HUGENTOBLE, W. J.; IWASAKI, A. Annual review of virology seasonality of respiratory viral infections. **Annual Review of Virology**, v. 7, n. 1, p. 83–101, 29 set. 2020.

- PANG, X. et al. Cold-chain food contamination as the possible origin of COVID-19 resurgence in Beijing. **National Science Review**, v. 7, n. 12, p. 1861–1864, 18 dez. 2020.
- PAULES, C. I.; MARSTON, H. D.; FAUCI, A. S. **Coronavirus Infections-More Than Just the Common Cold***JAMA - Journal of the American Medical Association*American Medical Association, , 25 fev. 2020.
- REUBEN, R.; GYAR, S.; DANLADI, M. COVID-19: Probable involvement of insects in the mechanical transmission of novel coronavirus (2019-nCoV). **Microbes and Infectious Diseases**, v. 0, n. 0, p. 0–0, 2020.
- SANTARPIA, J. L. et al. **Aerosol and surface transmission potential of SARS-CoV-2***medRxiv*medRxiv, , 3 jun. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2020.03.23.20039446>>. Acesso em: 25 jan. 2021
- SANTOS, D. et al. A non-destructive enzymatic method to extract DNA from arthropod specimens: Implications for morphological and molecular studies. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–11, 2018.
- SHI, J. et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. **Science**, v. 368, n. 6494, p. 1016–1020, 29 maio 2020.
- SHIRATO, K. et al. Development of genetic diagnostic methods for detection for novel coronavirus 2019(nCoV-2019) in Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 73, n. 4, p. 304–307, 2020.
- SIMÕES, J. L. B.; BAGATINI, M. D. **Purinergic Signaling of ATP in COVID-19 Associated Guillain-Barré Syndrome** *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, Springer, , 18 jan. 2021.
- TAHERIFARD, E. et al. Hematologic autoimmune disorders in the course of COVID-19: a systematic review of reported cases. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 26, n. 1, p. 225–239, 1 dez. 2021.
- VAN DOREMALEN, N. et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 16, p. 1564–1567, 16 abr. 2020.
- WAN, Y. et al. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. **Journal of Virology**, v. 94, n. 7, p. 1–9, 2020.
- WANG, K. et al. SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. **bioRxiv**, p. 2020.03.14.988345, 14 mar. 2020.
- WENHAM, C.; LOTTA, G.; NACIF PIMENTA, D. Mosquitoes and Covid-19 are a ticking time bomb for Latin America. 31 mar. 2020.
- WU, Y. et al. **Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples***The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, Elsevier Ltd, , 1 maio 2020.
- XIAO, F. et al. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. **Gastroenterology**, v. 158, n. 6, p. 1831- 1833.e3, 2020.
- ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020.

