

**Tesina de Grado**  
**Licenciatura en Bioquímica**



Tutora

**Dra. Sandra Frabasile**

Co-Tutora

**Dra. Adriana Delfraro**

Sección Virología  
Facultad de Ciencias, Universidad de la República  
2017

# ÍNDICE

◆ RESUMEN .....	5
◆ 1. INTRODUCCIÓN .....	7
1.1. Murciélagos como reservorios virales .....	7
1.1.1. Orden Chiroptera .....	9
1.1.2. Características biológicas, sociales e inmunológicas de los murciélagos en su rol como reservorios virales .....	10
1.1.3. Murciélagos autóctonos .....	13
1.2. <i>Rhabdoviridae</i> .....	13
1.2.1. Taxonomía y clasificación .....	13
1.2.2. Genoma y Virión .....	14
1.2.3. Lyssavirus: los rhabdovirus asociados a murciélagos .....	16
1.2.4. Virus rábico: el prototipo del género .....	17
1.2.5. Situación actual de la rabia en Latinoamérica .....	18
1.3. <i>Paramyxoviridae</i> y <i>pneumoviridae</i> .....	19
1.3.1. Taxonomía y clasificación .....	19
1.3.2. Genoma y Virión .....	20
1.3.3. Paramyxovirus y pneumovirus en murciélagos .....	22
1.4. <i>Situación en Uruguay de infecciones por rabia y pneumovirus transmitidos         por murciélagos</i> .....	23
◆ 2. OBJETIVOS .....	25
◆ 3. ESTRATEGIA DE TRABAJO .....	25
◆ 4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
4.1. <i>Colecta de ejemplares y toma de muestras de saliva</i> .....	26
4.2. <i>Puesta a punto de técnicas de RT-PCR para la detección de RABV         y pneumovirus</i> .....	26
4.2.1. Propagación de cepas de referencia por cultivo celular .....	26
4.2.2. Extracción de ARN total a partir de aislamientos virales .....	27
4.2.3. Extracción de ARN total a partir de cerebros murinos infectados .....	27
4.2.4. Amplificación de la región de la nucleoproteína de RABV .....	28
4.2.5. Amplificación de la región de la ARN polimerasa viral de pneumovirus .....	29
4.3. <i>Análisis de las muestras</i> .....	30
4.4. <i>Electroforesis en gel de agarosa</i> .....	30
4.5. <i>Purificación y secuenciación</i> .....	30
◆ 5. RESULTADOS .....	31
5.1. <i>Obtención de controles y puesta a punto de técnicas de RT-PCR</i> .....	31
5.2. <i>Procesamiento de las muestras y secuenciación de los amplicones         obtenidos</i> .....	34
◆ 6. DISCUSIÓN.....	36
◆ 7. CONCLUSIONES .....	40
◆ 8. PERSPECTIVAS .....	40
◆ REFERENCIAS .....	41
◆ AGRADECIMIENTOS .....	47

♦ <b>ANEXO</b> .....	<b>49</b>
<i>Tabla 1A.</i> Virus encontrados en murciélagos.....	50
<i>Tabla 2A.</i> Taxonomía de la familia <i>Rhabdoviridae</i> .....	55
<i>Tabla 3A.</i> Especies de murciélagos positivas para rabia en América Latina y el Caribe.....	58
<i>Tabla 4A.</i> Taxonomía de las familias <i>Paramyxoviridae</i> y <i>Pneumoviridae</i> .....	61

## ◆ ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico	μL	Microlitro
ARN	Ácido ribonucleico	μg	Microgramo
ARNm	ARN mensajero	nt	Nucleótidos
dNTPs	Desoxinucleótidos	ORF	Marco abierto de lectura
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético	pb	Pares de bases
EtOH	Etanol	PBS	Fosfato buffer salino
g	Gramos	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
kb	Kilo base	rpm	Revoluciones por minuto
L	Litro	s	Segundo
min	Minuto	TAE	Tris Acetato EDTA
mL	Mililitro	RT	Retrotranscripción
mM	Milimolar	RT-PCR	Retrotranscripción y PCR

## ◆ RESUMEN

Los murciélagos (orden Chiroptera) son el segundo orden de mamíferos en la naturaleza y están ampliamente distribuidos. Sus características biológicas y hábitos de vida son propicios para que actúen como reservorios de enfermedades infecciosas emergentes importantes para la salud humana y la sanidad animal. El papel desempeñado en la transmisión y mantenimiento de virus de las familias virales *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae* y *Coronaviridae*, entre otras, se debe a la presencia de características únicas que los distinguen del resto de los mamíferos. Su capacidad de volar, la longevidad extrema, el desarrollo de infecciones persistentes, el hecho de conformar uno de los mayores grupos sociales y convivir en colonias altamente pobladas, su flexibilidad ecológica y diversidad trófica, así como su sistema inmune; contribuyen al mantenimiento y transmisión (intra/ interespecie) de enfermedades infecciosas.

La familia *Rhabdoviridae* comprende virus envueltos, con genoma de ARN simple hebra y polaridad negativa, que tradicionalmente se han dividido en seis géneros distintos. Entre ellos, los *Lyssavirus* son los más importantes para la salud pública al ser los causantes de una encefalitis aguda fatal en mamíferos, comúnmente conocida como rabia. Trece de las catorce especies existentes de *Lyssavirus* se han encontrado en murciélagos, siendo Mokola virus (MOKV) el único no asociado a estos reservorios. El virus rábico (RABV) es el prototipo del género y el único virus que se conoce que establece ciclos epidemiológicos en murciélagos y carnívoros, circulando únicamente en murciélagos americanos.

Desde los tiempos de la colonización de Latinoamérica se han reportado casos de enfermedades paralíticas en ganado y humanos asociados a mordeduras de murciélagos hematófagos. A su vez, la rabia en murciélagos insectívoros se evidenció por primera vez en 1953 en Florida (Estados Unidos) y luego se documentó a lo largo de Estados Unidos, Canadá y Latinoamérica. Hoy en día, en esta última, los murciélagos constituyen el principal reservorio del virus rábico, siendo su principal transmisor el vampiro común *Desmodus rotundus*, a pesar de haberse detectado también su presencia en murciélagos no hematófagos.

Los miembros de las familias *Paramyxoviridae* y *Pneumoviridae* son virus envueltos, con genoma de ARN simple hebra y polaridad negativa, que se dividen en distintos géneros siendo siete en la primera, y dos en la segunda. A lo largo de los años, varios trabajos científicos han identificado a los murciélagos como reservorios de paramyxovirus, destacándose los pertenecientes a los géneros *Henipavirus* y *Rubulavirus* que pueden infectar humanos y/o animales domésticos. Los henipavirus, Hendra (HeV) y Nipah (NiV) virus fueron asociados a murciélagos frugívoros del género *Pteropus* en Australia (1994) y Malasia (1999) respectivamente. Asimismo en Australia, en 1997, se aisló por primera vez el rubulavirus, Menangle virus, hallándose anticuerpos específicos en cuatro especies del género *Pteropus*. Investigaciones recientes reportan la presencia de *Morbillivirus* y *Pneumovirus* en murciélagos filostómidos, vespertiliónidos y pteropódidos. Existen escasos registros de detección de *Paramyxovirus* en murciélagos del continente americano, y poca información referente a los *Pneumovirus* a nivel mundial.

En Uruguay contamos con 21 especies de quirópteros, incluyendo al hematófago *D. rotundus* y diversas especies no hematófagas. Luego del brote de rabia ocurrido en el año 2007 se comprobó por primera vez en el país la presencia de RABV en *D. rotundus* y en tres especies insectívoras: *Tadarida brasiliensis*, *Myotis sp.*, *Molossus molossus*; pero no hay hasta el momento información acerca de su rol como reservorios virales para miembros de la familia *Pneumoviridae*.

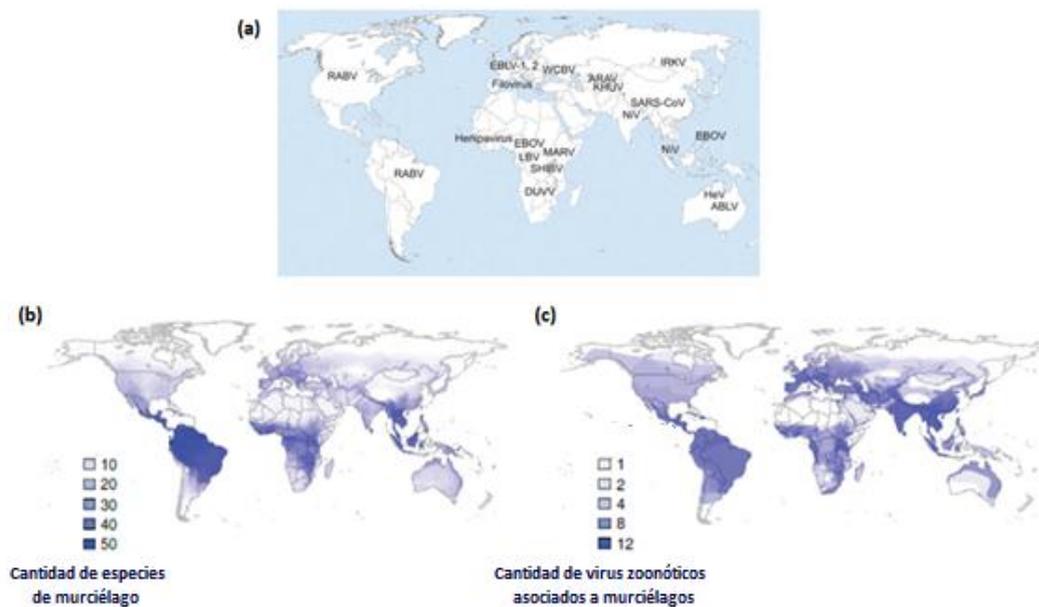
Dado el panorama planteado, nos propusimos como objetivo principal la detección por técnicas moleculares de *Rhabdovirus* y *Pneumovirus* en murciélagos autóctonos, con el fin de generar información acerca de su circulación en la población silvestre de quirópteros y determinar el potencial riesgo zoonótico que representan. Para ello, se propuso la puesta a punto de técnicas de RT-PCR en tiempo final, para la amplificación de genes conservados de rhabdovirus y pneumovirus mediante el uso de oligonucleótidos genéricos basados en la literatura; y de controles positivos generados por aislamiento y extracción de ARN viral. Dichas técnicas se aplicaron en el análisis de 77 muestras de saliva de murciélagos hematófagos y no hematófagos, con resultados acordes a lo descrito en la literatura en cuanto número de muestras analizadas y probabilidad de detección viral.

## ◆ 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Murciélagos como reservorios virales

Las enfermedades infecciosas emergentes (EIDs, por su sigla en inglés) amenazan tanto la salud humana como la sanidad animal y por tanto afectan la biodiversidad global. Estas EIDs son aquellas infecciones que han aparecido recientemente en una población o han existido anteriormente, pero cuya incidencia o alcance geográfico están aumentando rápidamente. La mayoría son causadas por virus zoonóticos, es decir, transmitidos por animales a humanos; y el 70% se originan en la vida silvestre <sup>[1-3]</sup>. Estos virus se adaptan bien a sus reservorios animales y exhiben estabilidad dentro de sus ambientes celulares y ecológicos, mostrando poca o ninguna evidencia clínica. Sin embargo, cuando saltan la barrera inter-especie y son transmitidos a los humanos y animales domésticos pueden causar enfermedad, y se vuelven una preocupación importante para la salud pública <sup>[4]</sup>.

En los últimos años, los murciélagos se han visto implicados en numerosos eventos de EIDs y son cada vez más reconocidos como importantes reservorios de virus que pueden infectar humanos y otros mamíferos (Fig. 1). Gran parte de la información recopilada sobre el papel de los murciélagos en el mantenimiento y la propagación de los virus, ha sido a partir de especies de Microchiroptera, y hay relativamente poca información disponible para los miembros del suborden Megachiroptera <sup>[1, 5-7]</sup>.



**Figura 1. (a)** EIDs asociadas y presuntamente asociadas a murciélagos. Abreviaturas: RABV = Virus rábico; EBLV-1,2: European Bat Lyssavirus 1 y 2; WCBV = West Caucasian bat virus; ARAV = Aravan virus; KHUV = Khujand virus; IRKV = Irkut virus; LBV = Lagos Bat virus; SHIBV = Shimoni bat virus; DUVV= Duvnag virus; MARV = Marburg virus; EBOV = Ebola virus; Filovirus = Filovirus sin clasificar detectados en murciélagos Europeos; HeV = Hendra virus; Niv = Nipah virus; Henipavirus = henipavirus sin clasificar; SARS-CoV = SARS Coronavirus. Extraído de: Kuzmin et al, 2011. **(b y c)** Distribución mundial de la riqueza de (a) especies de quirópteros y (b) virus zoonóticos asociados a murciélagos. Extraído y modificado de: Luis et al, 2015.

El primer reconocimiento de que los murciélagos están involucrados en la transmisión viral, se produjo hace más de un siglo, cuando en 1911 se identificó por primera vez el virus rábico (género *Lyssavirus*) en un murciélago asintomático. Desde entonces y hasta hace poco, la rabia dominaba la literatura científica en cuanto a la relación entre murciélagos y las EIDs. Sin embargo, el descubrimiento de los *Henipavirus* a mediados de los 90, y el subsecuente reconocimiento de que los murciélagos podrían ser los reservorios naturales de corona y filovirus marcó una nueva era en las investigaciones sobre el rol de los murciélagos como potenciales reservorios para una amplia variedad de enfermedades que afectan humanos y animales [8, 9].

Hoy en día el papel de los murciélagos en la enfermedad viral está bien establecido, y en particular su rol como reservorios para alphavirus, flavivirus, rhabdovirus, paramyxovirus y coronavirus (Fig. 1a). Análisis comparativos han demostrado que los quirópteros hospedan más virus zoonóticos, y más virus totales por especie que los roedores, a pesar de que existen dos veces más especies de roedores en el mundo [2]. En total se han aislado o detectado más de 200 virus de 27 familias diferentes en murciélagos que abarcan ambos subórdenes, 11 familias y 37 géneros distintos [5, 6, 10, 11] (Tabla 1, Tabla 1A [anexo]).

**Tabla 1.** Virus encontrados en murciélagos

Familia Viral	Género	Familia Viral	Género
<b>Adenoviridae</b>	<i>Mastadenovirus</i>	<b>Nodaviridae</b>	<i>Nodavirus</i>
<b>Arenaviridae</b>	<i>Arenavirus</i>	<b>Orthomyxoviridae</b>	<i>Influenzavirus A</i>
<b>Astroviridae</b>	<i>Mamastrovirus</i>	<b>Papillomaviridae</b>	<i>Omegapapillomavirus</i>
<b>Bornaviridae</b>	Género sin nombre	<b>Paramyxoviridae</b>	<i>Morbillivirus</i>
<b>Bunyaviridae</b>	<i>Orthobunyavirus</i>		<i>Henipavirus</i>
	<i>Hantavirus</i>		<i>Rubulavirus</i>
	<i>Phlebovirus</i>		<i>Pneumovirus</i>
	<i>Nairovirus</i>	<b>Parvoviridae</b>	<i>Dependovirus</i>
<b>Caliciviridae</b>	<i>Sapovirus</i>		<i>Bocavirus</i>
<b>Circoviridae</b>	<i>Circovirus</i>	<b>Picobirnaviridae</b>	<i>Picobirnavirus</i>
	<i>Cyclovirus</i>	<b>Picornaviridae</b>	<i>Kobuvirus</i>
<b>Coronaviridae</b>	<i>Alphacoronavirus</i>	<b>Polyomaviridae</b>	Género sin nombre
	<i>Betacoronavirus (SARS, MERS)</i>	<b>Poxviridae</b>	<i>Molluscipoxvirus</i>
<b>Dicistroviridae</b>		<b>Reoviridae</b>	<i>Orbivirus</i>
<b>Filoviridae</b>	<i>Cuevavirus</i>		<i>Orthoreovirus</i>
	<i>Ebolavirus</i>		<i>Rotavirus</i>
	<i>Marburgvirus</i>	<b>Retroviridae</b>	<i>Betaretrovirus</i>
<b>Flaviviridae</b>	<i>Flavivirus</i>		<i>Spumavirus</i>
	<i>Hepacivirus</i>		<i>Gammaretrovirus</i>
	<i>Pegivirus</i>	<b>Rhabdoviridae</b>	<i>Lyssavirus</i>
	<i>Pestivirus</i>		<i>Vesiculovirus</i>
<b>Hepadnaviridae</b>	<i>Orthohepadnavirus</i>	<b>Togaviridae</b>	<i>Alphavirus</i>
<b>Hepeviridae</b>	Género sin nombre	<b>Totiviridae</b>	<i>Totivirus</i>
<b>Herpesviridae</b>	(Alpha-herpesvirinae) <i>Simplexvirus</i>		
	(Beta-herpesvirinae) género sin nombre		
	<i>Cytomegalovirus</i>		
	<i>Percavirus</i>		
	<i>Rhadinovirus</i>		
	<i>Macavirus</i>		

Extraído y modificado de: Serra-Cobo et al, 2016

### 1.1.1. Orden Chiroptera

El orden Chiroptera está constituido por más de 1200 especies de murciélagos (divididos en 175 géneros dispuestos en 20 familias), y comprenden casi una quinta parte de las especies de mamíferos del mundo. Constituyen el grupo de mamíferos con mayor número de especies después de los roedores y están ampliamente distribuidos, encontrándolos en todos los continentes a excepción de la Antártida. Dada su capacidad de volar, han colonizado varias islas oceánicas, y en algunas de ellas son los únicos mamíferos nativos <sup>[1, 5, 6]</sup>.

Cada año se describen nuevas especies de quirópteros alrededor del mundo, no sólo en las regiones tropicales y no tropicales, sino también en regiones templadas. La riqueza de especie aumenta hacia los trópicos (Fig.1b) y en la mayoría de las áreas tropicales la diversidad de murciélagos es mayor que la de cualquier otro grupo de mamíferos <sup>[1, 5, 6]</sup>.

Tradicionalmente, desde la división basal de Dobson (1875), el orden Chiroptera se divide en dos subórdenes, Megachiroptera y Microchiroptera, basados en gran medida en la evolución de la ecolocalización (emisión de ultrasonidos para comunicarse, orientarse y capturar sus presas) (Fig. 2). El primero, comprende únicamente a la familia *Pteropodidae* de murciélagos frugívoros del Viejo Mundo, o “zorros voladores”, que no tienen la capacidad de ecolocalizar; mientras que los microquirópteros abarcan el resto de las familias y se encuentran distribuidos por todo el mundo. Éstos son un grupo de murciélagos generalmente pequeños, que ecolocalizan y presentan diferentes hábitos alimenticios (insectívoros, frugívoros, carnívoros o hematófagos) <sup>[1, 5, 6, 12]</sup>.

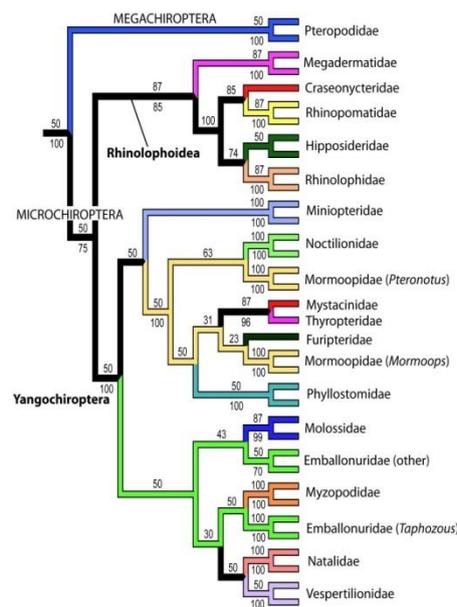


Figura 2. Árbol filogenético del Orden Chiroptera. Extraído de: Agnarsson et. al, 2011.

### 1.1.2. Características biológicas, sociales e inmunológicas de los murciélagos en su rol como reservorios virales

¿Por qué los murciélagos son tan buenos reservorios virales? ¿Qué les permite mantener y transmitir diferentes virus zoonóticos? A lo largo de años de investigación, se ha visto que los quirópteros presentan un conjunto de características y atributos que los diferencian del resto de los mamíferos y que los adapta a su rol como reservorios virales.

Para comenzar, varios autores postulan que murciélagos y virus tienen una larga historia de co-evolución y que ésta juega un rol importante en su asociación con las EIDs. Los orígenes deducidos para ciertos virus zoonóticos (por ejemplo, henipa- y lyssavirus) indican una larga historia de co-especiación con los murciélagos, y se estima que los ancestros virales pudieron haber utilizado para su replicación, receptores celulares y vías bioquímicas que se han conservado a lo largo de las distintas especies de mamíferos, y que aumentan, por tanto, las posibilidades de transmisión viral entre éstos <sup>[5, 7, 14]</sup>.

La característica más peculiar de los murciélagos es su capacidad de volar; los distingue del resto de los mamíferos y les provee máxima movilidad. Esta habilidad juega un papel fundamental en su distribución mundial y potencialmente les permitiría dispersar partículas virales en un amplio rango geográfico <sup>[5-7]</sup>. Durante el vuelo, los microquirópteros (con alguna excepción dentro de los megaquirópteros) emiten ultrasonidos para orientarse, comunicarse entre ellos y capturar su presa. Estas señales de ecolocalización se producen en la laringe y son emitidas a través de la boca o las fosas nasales dónde pueden generarse aerosoles o fluidos que permiten la transmisión viral entre individuos próximos entre sí <sup>[5, 7, 15]</sup>.

En su mayoría los murciélagos son predominantemente nocturnos y ciertas familias entran en un estado de letargo diario, y de hibernación estacional, como adaptaciones fisiológicas y conductuales que les permiten la supervivencia durante períodos estacionales de bajos recursos. La hibernación consiste en un estado de inactividad en el cual el ritmo cardíaco, la temperatura corporal y la respiración, están disminuidos para conservar la energía. Estas estrategias, llevan a la inmunosupresión y al incremento del riesgo de infección, a la vez que se espera una reducción de la replicación de la mayoría de los patógenos dadas las bajas temperaturas corporales. En conjunto, esto permitiría que los virus persistan en los quirópteros y re-emerjan cuando las condiciones ambientales sean favorables para su transmisión <sup>[1, 5-7, 15]</sup>.

Por otro lado, los murciélagos maximizan la inversión de los recursos en su tasa de supervivencia sobre la descendencia, madurando a edades más avanzadas y produciendo menos crías por año que la mayoría de las especies de mamíferos del mismo tamaño. Como consecuencia, presentan una longevidad extrema, y viven, en promedio, tres veces y media más que otro mamífero de tamaño similar; y si se considera su tamaño, viven más que cualquier otro. Esto les ayuda a mantener y transmitir los virus por más tiempo, aumentando así su potencial de transmisión <sup>[5, 6, 15]</sup>.

La flexibilidad ecológica y de hábitos alimenticios que presentan los murciélagos, contribuye al aumento de la biodiversidad en un área geográfica pequeña, y da lugar a la interacción entre múltiples especies que pueden intercambiar patógenos infecciosos entre ellas. Esto es, los

murciélagos habitan una amplia variedad de nichos ecológicos (habitualmente lugares ocultos) que pueden ser estacionales o perennes, y cuya localización, estructura y aspecto son importantes para la supervivencia y el éxito reproductivo de la especie. Estos requisitos determinan las condiciones micro-climáticas que pueden afectar los costos energéticos de las etapas clave del ciclo vital (hibernación, preñez y lactancia), por lo que las poblaciones de quirópteros se mueven estacionalmente entre refugios con microclimas óptimos. De esta forma, conectan poblaciones aparentemente aisladas y hacen posible la transmisión viral entre ellas <sup>[1, 6, 7, 15]</sup>.

A su vez, la capacidad que presentan los murciélagos de ocupar edificaciones, y de habitar y alimentarse en zonas agrícolas y urbanas, los pone en contacto cercano con seres humanos y animales domésticos, aumentando las oportunidades de interacción e intercambio viral entre ellos <sup>[6, 7]</sup>.

Los quirópteros no sólo son capaces de habitar múltiples nichos, sino que también presentan un variado espectro de especializaciones tróficas. A pesar de ser superados por los roedores en número de especies, son los primeros entre los mamíferos (y probablemente entre todos los vertebrados) en su diversidad de hábitos alimenticios. Esto los ha organizado en seis categorías principales: frugívoros, nectívoros, insectívoros, carnívoros, hematófagos y omnívoros. Todos ellos pueden distribuir y transmitir los virus durante su proceso de alimentación, ya sea, al dejar frutas e insectos a medio comer contaminadas con partículas virales, o por mordedura directa del murciélago, como ocurre con los hematófagos (o vampiros). Estos últimos abarcan tres especies diferentes, *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata*, y *Diaemus youngi* (familia *Phyllostomidae*) que se encuentran únicamente en Latinoamérica, y pueden llegar a atacar humanos y animales domésticos cuando sus fuentes de alimento se reducen como consecuencia de la expansión urbana y disminución de los recursos naturales <sup>[1, 6, 7]</sup>.

Por último, los quirópteros son considerados uno de los grupos de mamíferos más sociables y son conocidos por formar agregaciones de individuos. Varias especies forman colonias grandes y densas que proveen amplias oportunidades para el intercambio viral entre las distintas poblaciones. Dependiendo de la especie, la estación y la localización del nicho, el tamaño de la población puede ir desde pocos individuos hasta millones. El gran número de individuos que conviven conjuntamente, podría no sólo aumentar las tasas de contacto entre grupos de murciélagos de una o más especies, sino también facilitar la entrada o propagación de virus a través del movimiento de individuos entre colonias, especialmente si éstos migran estacionalmente <sup>[1, 6, 7]</sup>.

### **Sistema inmune**

Todos los virus zoonóticos son, por definición, patógenos para los seres humanos, sin embargo, usualmente no lo son o lo son mínimamente para sus reservorios. En este sentido, los murciélagos actúan como reservorios de una gran diversidad viral, y existe poca evidencia de muerte o enfermedad generada por los virus que albergan <sup>[16, 17]</sup>. Muchos de estos virus han desarrollado estrategias de evasión inmune que manipulan la respuesta del hospedero de una manera favorable para su persistencia, y que consisten en su mayoría, de proteínas virales accesorias que están optimizadas evolutivamente para el reservorio, y que contribuyen a la patogénesis en otras especies <sup>[16]</sup>.

Se conoce muy poco acerca del sistema inmune de los quirópteros y de los parámetros inmunológicos específicos que conducen a la persistencia o perpetuación de EIDs en las poblaciones de murciélagos. Dado que éstos serían uno de los mamíferos en surgir más tempranamente en la historia evolutiva de la Clase, es posible que sus respuestas inmunes innatas y adaptativas tengan diferencias importantes (tanto cualitativas como cuantitativas) con las de otros mamíferos. Sin embargo, algunos estudios sugieren que las respuestas inmunes de los murciélagos tienen similitudes con las de aquellos mamíferos que han evolucionado después<sup>[5-7]</sup>. Así, estudios serológicos han demostrado que los murciélagos tienen anticuerpos contra la mayoría de los virus, y que producen inmunoglobulinas del tipo G (IgG), A (IgA), M (IgM) y E (IgE); pero se desconoce si los isotipos de las mismas son similares a los de otros vertebrados y si reaccionan del mismo modo<sup>[5, 6, 8]</sup>.

Se han propuesto varias hipótesis sobre porqué los murciélagos pueden albergar tantos agentes infecciosos sin evidencia de enfermedad. Una de ellas sugiere que el aumento del metabolismo y las altas temperaturas corporales alcanzadas durante el vuelo servirían como un adyuvante evolutivo a su sistema inmune, y les permitiría tolerar una mayor cantidad de virus, que al ser transmitidos a otros mamíferos son potencialmente virulentos<sup>[16, 17]</sup>. Esto es, durante el vuelo los murciélagos muestran un gran aumento de su tasa metabólica (de 15 a 16 veces) resultando en temperaturas corporales que alcanzan los rangos típicos de las condiciones febriles (38°C – 41°C), y que impiden la replicación del patógeno. Por tanto, cuando un murciélago se enfrenta a un antígeno viral, el aumento proporcional en el metabolismo para alcanzar una respuesta inmune puede ser trivial en comparación con los costos metabólicos del vuelo<sup>[8, 18]</sup>.

En base a esto, se ha sugerido que las tasas metabólicas durante esta actividad pueden mejorar, facilitar, o tal vez subvencionar cualquier costo inherente de aumentar el metabolismo para activar una respuesta inmune. Además, podría permitir la adaptación de ciertos virus frente a estas condiciones y volverlos resistentes a esta parte de la respuesta inmune innata, explicando así la alta patogenicidad de estos agentes en otros mamíferos<sup>[8, 18]</sup>. A su vez, se ha evidenciado que el vuelo evolucionó en tándem con cambios genéticos concomitantes a sus sistemas inmunes innatos, los cuales fueron consistentes con la necesidad de reparación de daños en el ADN dadas las altas tasas metabólicas durante el vuelo<sup>[17]</sup>.

Por otra parte, se ha demostrado por trabajos empíricos que en condiciones de temperatura ambiente elevada, los murciélagos mantienen a los virus en el torrente sanguíneo en lugar de en los tejidos, y que la eliminación del mismo ocurre sin respuesta de anticuerpos demostrable; lo que sugeriría una forma de control inmunológico adaptativo y no humoral<sup>[8]</sup>.

Como se ha mencionado, la consideración del letargo es también pertinente a las hipótesis planteadas sobre el rol de los murciélagos como reservorios virales. Es así que un posible mecanismo de control de patógenos vinculado a este estado, podría estar relacionado con los altos niveles de tejido adiposo pardo presente en todos los murciélagos<sup>[8]</sup>. Por ejemplo, investigaciones sobre los impactos de la hibernación en la patogénesis de la rabia, han demostrado la presencia del virus rábico en la grasa parda de los murciélagos, sugiriendo que ésta presenta un rol en el almacenamiento viral a largo plazo<sup>[8]</sup>.

### 1.1.3 Murciélagos autóctonos

En Uruguay contamos con 21 especies de murciélagos que comprenden las familias *Phyllostomidae*, *Molossidae* y *Vespertilionidae*. Las dos últimas se caracterizan por agrupar murciélagos insectívoros y excelentes controladores de plagas, mientras que los filostómidos incluyen al murciélago vampiro común *D. rotundus* y dos especies frugívoras. Su distribución es heterogénea y en conjunto cubren toda la totalidad del territorio nacional, abarcando incluso Montevideo dónde se encuentran principalmente murciélagos insectívoros (Tabla 2) <sup>[12]</sup>.

**Tabla 2.** Murciélagos del Uruguay

Familia	Género	Especie	Dieta
<i>Molossidae</i>	<i>Eumops</i>	<i>E. bonariensis</i>	Insectívoro
		<i>E. patagonicus</i>	Insectívoro
	<i>Molossops</i>	<i>M. temminckii</i>	Insectívoro
	<i>Molossus</i>	<i>M. molossus</i>	Insectívoro
	<i>Nyctinomops</i>	<i>N. laticuadatus</i>	Insectívoro
		<i>N. macrotis</i>	Insectívoro
	<i>Tadarida</i>	<i>T. brasiliensis</i>	Insectívoro
<i>Phyllostomidae</i>	<i>Desmodus</i>	<i>D. rotundus</i>	Hematófago
	<i>Sturnira</i>	<i>S. lilium</i>	Frugívoro
	<i>Platyrrhinus</i>	<i>P. lineatus</i>	Frugívoro
<i>Vespertilionidae</i>	<i>Eptesicus</i>	<i>E. furinalis</i>	Insectívoro
		<i>E. diminutus</i>	Insectívoro
	<i>Lasiurus</i>	<i>L. blossevilli</i>	Insectívoro
		<i>L. cinereus</i>	Insectívoro
		<i>H. montanus</i>	Insectívoro
	<i>Histiotus</i>	<i>H. velatus</i>	Insectívoro
		<i>Myotis</i>	<i>M. albescens</i>
	<i>M. levis</i>		Insectívoro
	<i>M. nigricans</i>		Insectívoro
	<i>M. riparius</i>		Insectívoro
	<i>Dasypterus</i>	<i>D. ega</i>	Insectívoro

Fuente: González et al, 2010.

## 1.2 Rhabdoviridae

La familia *Rhabdoviridae* es una de las familias de virus ARN más ecológicamente diversas, cuyos miembros son importantes patógenos que afectan la salud humana y animal. La mayoría son transmitidos por vectores artrópodos, sin embargo, varios rhabdovirus han evolucionado para adaptarse a vertebrados y plantas sin la necesidad de un vector biológico. Si bien no presentan un origen geográfico definido, se encuentran distribuidos mundialmente y su ecología abarca ambientes acuáticos y terrestres <sup>[18-20]</sup>.

### 1.2.1 Taxonomía y clasificación

Los rhabdovirus pertenecen al orden Mononegavirales junto a las familias *Borna*, *Filo* y *Paramyxoviridae*, entre otras recientemente agregadas. Tradicionalmente, se han dividido en base a sus propiedades estructurales, antigénicas y análisis filogenéticos en seis géneros diferentes: *Lyssavirus*, *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus*, *Novirhabdovirus*, *Cytorhabdovirus* y *Nucleorhabdovirus*. Hoy día dados los numerosos descubrimientos y secuencias génicas

obtenidas, estos géneros ascienden a un total de dieciocho, quedando aún rhabdovirus sin clasificar (Tabla 3, Tabla 2A [anexo]) <sup>[19, 21, 22]</sup>.

**Tabla 3.** Familia *Rhabdoviridae*

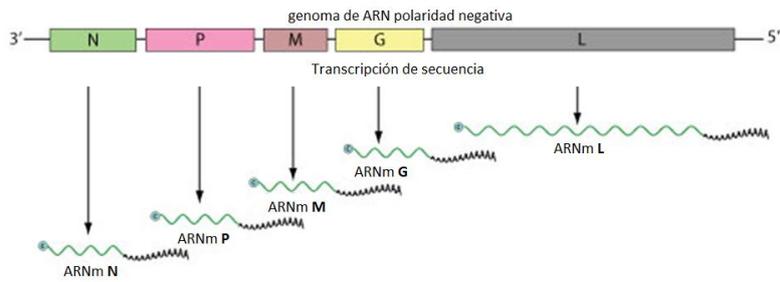
Género	N° de especies	Prototipo	Género	N° de especies	Prototipo
<i>Almendravirus</i>	5	<i>Puerto Almendras almenravirus</i>	<i>Perhabdovirus</i>	3	<i>Perch perhabdovirus</i>
<i>Curiovirus</i>	4	<i>Curionopolis curiovirus</i>	<i>Sigmavirus</i>	7	<i>Drosophila melanogaster sigmavirus</i>
<i>Cytorhabdovirus</i>	11	<i>Lettuce necrotic yellows cytorhabdovirus</i>	<i>Sprivirus</i>	2	<i>Carp sprivirus</i>
<i>Dichorhavirus</i>	2	<i>Orchid fleck dichorhavirus</i>	<i>Sripuvirus</i>	5	<i>Niakha sripuvirus</i>
<i>Ephemerovirus</i>	8	<i>Bovine fever ephemerovirus</i>	<i>Tibrovirus</i>	6	<i>Tibrogargan tibrovirus</i>
<i>Hapavirus</i>	15	<i>Wongabel hapavirus</i>	<i>Tupavirus</i>	3	<i>Durham tupavirus</i>
<i>Ledantevirus</i>	14	<i>Le Dantec ledantevirus</i>	<i>Varicosavirus</i>	1	<i>Lettuce big-vein associated varicosavirus</i>
<i>Lyssavirus</i>	14	<i>Rabies lyssavirus</i>	<i>Vesiculovirus</i>	16	<i>Indiana vesiculovirus</i>
<i>Novirhabdovirus</i>	4	<i>Salmonid novirhabdovirus</i>	<i>Sin asignar</i>	1	
<i>Nucleorhabdovirus</i>	10	<i>Potato yellow dwarf nucleorhabdovirus</i>			

Fuente: Amarasinghe et al, 2017.

### 1.2.2 Genoma y virión

Los rhabdovirus son virus envueltos cuyos viriones presentan una morfología típica de bala que es distinguible por microscopía electrónica. Cuentan con un genoma de ARN simple hebra no segmentado y polaridad negativa ([-] ssRNA), de 11-16 kb de longitud que presenta hasta 10 genes, cinco de los cuales codifican para las proteínas estructurales y comunes a todos los miembros de la familia: (de 3' a 5') nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) y ARN polimerasa dependiente de ARN (L), entre los cuales se pueden interponer uno o más genes adicionales (Fig. 3) <sup>[18-21, 23]</sup>.

Este grupo de genes está flanqueado por secuencias reguladoras 3' *leader* y 5' *trailer*, parcialmente complementarias y no traducidas, de 50 – 100 nt, que contienen secuencias promotoras para el inicio de la replicación <sup>[19, 21]</sup>. Por su parte, cada ORF (por sus siglas en inglés, *Open Reading Frame*) está flanqueado por señales de inicio (TI, del inglés *Transcription Initiation*) y final de la transcripción o poliadenilación (TTP, *Transcription Termination/Polyadenylation*), las cuales están relativamente conservadas y participan en la regulación de la expresión de los cinco ARNm correspondientes. Los genomas de rhabdovirus son diversos y a menudo complejos dado que pueden presentar ORFs adicionales que codifican para otras proteínas, en su mayoría de función desconocida <sup>[19-21]</sup>.

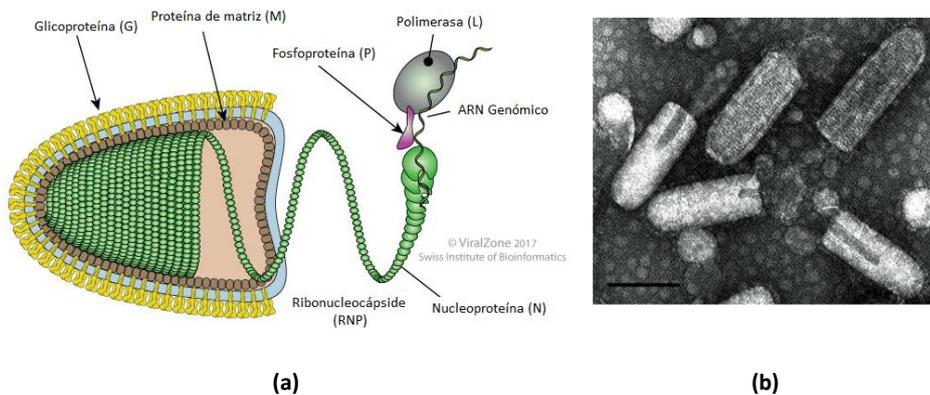


**Figura 3.** Esquema general del genoma de ARN simple hebra y polaridad negativa de los miembros de la familia *Rhabdoviridae*. Extraído y modificado de: ViralZone, <http://viralzone.expasy.org/>

Todos los viriones de los rhabdovirus están compuestos por dos unidades estructurales: una nucleocápside o complejo interno (*core*) de ribonucleoproteína (RNP), y una envoltura en forma de bicapa lipoproteica que deriva de la membrana celular de la célula hospedera y que se encuentra rodeando estrechamente al *core* RNP (Fig. 4) [20, 23]. Esta última es el componente infeccioso de todos los rhabdovirus, es activa en la transcripción y replicación, y en ella el ARN genómico se encuentra fuertemente asociado a la nucleoproteína (N) y a las proteínas L y P (altamente fosforiladas) formando un núcleo resistente a ARNasas [19, 20, 23, 26, 27].

El ensamblaje en el virión de la ARN polimerasa viral dependiente de ARN (proteína L) es esencial, dado que los genomas virales de ARN de polaridad negativa no pueden ser utilizados como ARNm, al no poseer las células hospederas enzimas apropiadas para catalizar su transcripción [20, 23].

La proteína de matriz (M) por su parte, recubre la superficie interna de la membrana del virión, y es la responsable de la condensación de la nucleocápside en una estructura helicoidal estrechamente enrollada, y de unirla a la membrana plasmática celular dónde está inserta la proteína G. Esta última es el principal determinante antigénico de los rhabdovirus, y el responsable del tipo de especificidad, da lugar a anticuerpos y reacciona con anticuerpos neutralizantes. La glicoproteína presenta un ectodominio grande, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. El primero, forma trímeros que sobresalen desde la superficie de la envoltura viral y es considerado la unidad funcional para el ensamblaje en viriones y la entrada del virus en la célula hospedera [19, 20, 23, 24].



**Figura 4. (a)** Diagrama ilustrativo del virión de rhabdovirus y la estructura de la nucleocápside. Extraído y modificado de: ViralZone: [www.expasy.org/viralzone](http://www.expasy.org/viralzone), SIB Swiss Institute of Bioinformatics  
**(b)** Micrografía electrónica de contraste negativo de viriones en un aislado del virus Vesicular

Stomatitis Indiana. La barra corresponde a 100 nm. Extraído de: International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), <https://talk.ictvonline.org/>.

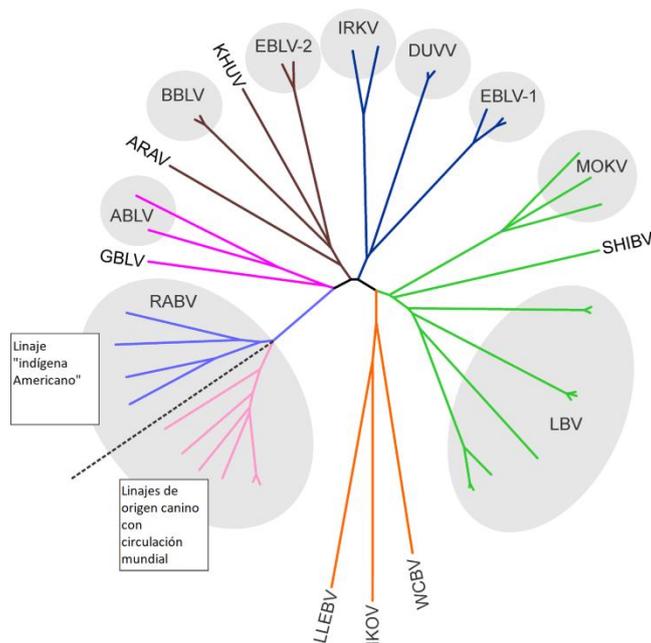
### 1.2.3 Lyssavirus: los rhabdovirus asociados a murciélagos

El género *Lyssavirus* es uno de los seis géneros en los que tradicionalmente se ha dividido la familia *Rhabdoviridae*. La taxonomía de estos virus es compleja y hoy en día el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV, de su sigla en inglés) reconoce catorce especies en base a estudios en sus secuencias génicas, estando cada una de ellas representada por un único virus: *Aravan lyssavirus* (ARAV), *Australian bat lyssavirus* (ABLV), *Bokeloh lyssavirus* (BBLV), *Duvenhage lyssavirus* (DUVV), *European bat lyssaviruses, tipo 1* y *tipo 2* (EBLV-1 y EBLV-2), *Ikoma lyssavirus* (IKOV), *Irkut lyssavirus* (IRKV), *Khujand lyssavirus* (KHUV), *Lagos bat lyssavirus* (LBV), *Mokola lyssavirus* (MOKV), *Rabies virus* (RABV), *Shimoni bat lyssavirus* (SHIBV), and *West Caucasian bat lyssavirus* (WCBV) (Fig. 5). Existen otros dos lyssavirus que aún no tienen estatus taxonómico, uno de ellos es Lleida bat lyssavirus (LLEBV), identificado únicamente por una secuencia génica parcial, y cuyos intentos de aislamiento aún continúan; y el segundo es el recientemente descubierto Gannoruwa bat lyssavirus (GBLV) (Tabla 2A [anexo])<sup>[20, 22, 29]</sup>.

Los miembros del género *Lyssavirus* forman un grupo monofilético que difiere ampliamente del resto de los rhabdovirus (grupo donde todas las especies presentes han evolucionado a partir de un ancestro común, y representan el total de los descendientes de éste)<sup>[29, 30]</sup>. A su vez, los lyssavirus se han dividido en dos filogrupos en base a sus relaciones filogenéticas y reactividad cruzada con anticuerpos, donde el virus rábico y los lyssavirus ARAV, ABLV, BBLV, DUVV, EBLV-1 y 2 e IRKV, se agrupan en el filogrupo I, mientras que LBV, MOKV y SHIBV lo hacen en el filogrupo II. Los restantes, West Caucasian bat lyssavirus, Ikoma lyssavirus y Lleida bat lyssavirus no están incluidos en ninguno de ellos, ya que, si bien están relacionados filogenéticamente, la cantidad de divergencia genética que presentan y la ausencia de neutralización cruzada, no permiten ubicarlos en un único filogrupo considerando los criterios de agrupación existentes. A su vez, dentro del filogrupo I, DUVV, EBLVs, ARAV, KHUV e IRKV son monofiléticos, y representan un *cluster* de lyssavirus de murciélagos del Viejo Mundo (con origen en África y Eurasia)<sup>[20, 29, 31]</sup>.

Todos los lyssavirus del filogrupo I, y del filogrupo II, circulan en murciélagos, y RABV además está adaptado para hacerlo en carnívoros. Para algunos, como el caso de MOKV, el reservorio aún permanece incierto<sup>[29, 31]</sup>.

La historia evolutiva de los lyssavirus no está del todo clara, pero tanto su emergencia como su perpetuación están fuertemente influenciadas por los murciélagos, quienes son considerados los hospederos evolutivos del género. Los lyssavirus se han encontrado en todos los continentes a excepción de la Antártida y en ciertas islas aisladas, su distribución geográfica es no uniforme y difiere considerablemente de un lyssavirus a otro. Con la excepción de RABV, varias especies circulan en murciélagos del Viejo Mundo, pero sólo el virus rábico lo hace en murciélagos (y carnívoros) del Nuevo Mundo<sup>[20, 29, 32, 33]</sup>.



**Figura 5.** Filogenia de los lyssavirus. Las abreviaturas corresponden a las indicadas en el texto. Extraído de: Rupprecht et al, 2017

Los lyssavirus son únicos entre los géneros de *Rhabdoviridae* por estar adaptados para replicar en el sistema nervioso central de mamíferos y transmitirse por contacto directo sin estar asociados con la transmisión o replicación natural en insectos. Son, en su totalidad, virus neurotrópicos que comparten una patología común: causan una encefalomielitis aguda, progresiva y fatal conocida como rabia. Históricamente, se ha creído que la rabia es causada solamente por el virus rábico (RABV - prototipo del género *Lyssavirus*); sin embargo, desde la década de 1950 hasta la fecha, se han identificado en todo el mundo más de una docena de otros lyssavirus, cuya patología es clínicamente indistinguible de la causada por la infección con RABV [29, 32, 33].

#### 1.2.4 Virus rábico: el prototipo del género

El virus de la rabia (RABV) es uno de los virus más antiguos; históricamente la primera descripción de la enfermedad data del siglo XXIII A.C., en el código Eshnunna de la ciudad babilónica con el mismo nombre. Desde entonces, varios filósofos, médicos y científicos han hecho mención y han descrito casos de rabia canina. Sin embargo, no fue hasta 1804 que se demostró que la rabia podía transmitirse a través de la saliva de los perros rabiosos. En la última parte del siglo XIX el virus fue estudiado metódicamente por Louis Pasteur quien preparó y administró lo que sería la primera vacuna para la profilaxis postexposición. Unos años después, el médico italiano Adelchi Negri, reportó en 1903 su observación de lo que se llamarían “cuerpos de Negri”, inclusiones eosinofílicas en el citoplasma de células nerviosas conteniendo el virus rábico, dando lugar así al primer diagnóstico de la enfermedad [5, 6, 33].

En 1911 (Brasil) se sugirió por primera vez que la rabia que afectaba a los herbívoros podía ser transmitida por los murciélagos. Este reporte estuvo a cargo de Antonio Carini quien evidenció la presencia de cuerpos de Negri en el cerebro de ganado fallecido por la enfermedad parálitica, y concluyó que los murciélagos eran la fuente más probable de transmisión. Desde entonces, se han observado a lo largo de América del Sur y Central, varias muertes asociadas a

murciélagos, e incluso se registró un brote de rabia en la Isla de Trinidad (1925-1930) que incluyó un gran número de muertes humanas y de ganado <sup>[5, 6, 34]</sup>.

El primer aislamiento del virus rábico a partir de un quiróptero fue de un murciélago vampiro común (*Desmodus rotundus*) en 1931, y en 1936 se demostró experimentalmente que estos murciélagos podían transmitir el virus. Por su parte, la conexión con los murciélagos frugívoros fue establecida en 1948 <sup>[6, 34]</sup>.

Hasta la década de 1950, la relación del virus rábico con los murciélagos estaba restringida a la situación comprendida en las Américas donde tanto la rabia asociada a los quirópteros hematófagos como frugívoros era conocida. Las detecciones iniciales del virus en murciélagos insectívoros se creían que eran debido a la transmisión por murciélagos vampiros, y no fue hasta 1953 que el papel de los murciélagos insectívoros se hizo evidente en Norteamérica con el caso de un niño de Florida, E.E.U.U, que fue mordido por un murciélago *Dasypterus floridanus*. Desde entonces, se ha detectado la rabia en la mayoría de las especies insectívoras de América del Norte y Latina <sup>[7, 31, 34]</sup>.

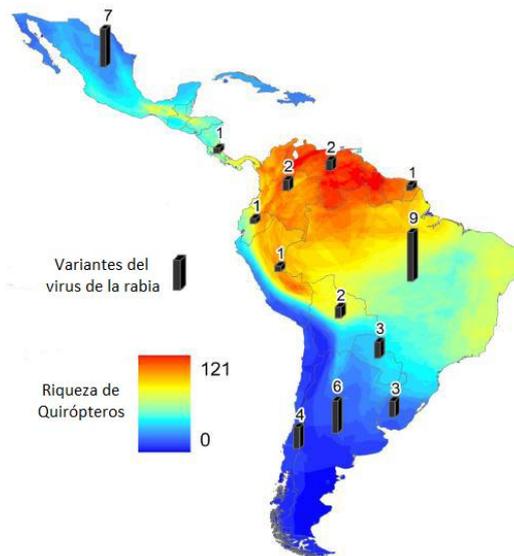
### 1.2.5 Situación actual de la rabia en Latinoamérica

Como se ha visto, en América los murciélagos constituyen el principal reservorio de la rabia, y se cree que la misma ha ocurrido desde la época pre hispana, siendo transmitida en su mayoría por murciélagos hematófagos. De hecho, desde la época de los primeros colonizadores hispanos hubo reportes de una enfermedad paralítica que afectaba al ganado y esporádicamente a los seres humanos que eran mordidos por murciélagos vampiros. <sup>[5, 7, 34, 35]</sup>

La riqueza de quirópteros en el continente es muy amplia, además de las tres especies de quirópteros hematófagos (*Diphylla ecaudata*, *Diaemus youngi* y *Desmodus rotundus*), se han documentado otras 330 especies en 24 países de América Latina y el Caribe, de las cuales el 22,5% (75 especies) son positivas para rabia (Fig. 6, Tabla 3A [anexo]). Con respecto a los primeros, la evidencia disponible indica que sólo *D. rotundus* juega un papel importante en la transmisión del virus <sup>[35, 36]</sup>.

En las últimas décadas, los casos de rabia humana en la región han ido disminuyendo, y en 2013, las tasas de rabia humana y canina se redujeron en un 95% con respecto a años anteriores. De hecho, dado que los informes de perros rabiosos han bajado drásticamente, y que el número de casos de rabia asociada a murciélagos permanece estable, puede decirse que hoy en día los murciélagos constituyen el principal reservorio del virus rábico en América Latina <sup>[35, 36]</sup>.

Los países con más reportes de rabia han sido Brasil, México y Argentina, y sólo Guyana, Surinam y Haití carecen de registros de murciélagos positivos. En términos de riqueza de especies se ha visto que la familia que presenta más casos reportados es *Vespertilionidae* con el 64% de las especies (25 especies); y en cuanto al tipo de dieta, se han encontrado murciélagos positivos para rabia abarcando todos los tipos dietarios, sin embargo se evidenció que los insectívoros incluyen el mayor número de especies positivas (184 especies) <sup>[35]</sup>.



**Figura 6.** Riqueza de murciélagos en función del número de especies de quirópteros presente en Latinoamérica (sombreado de colores), y número de variantes antigénicas reportadas para RABV asociado a murciélagos de la región (barras negras). Extraído y modificado de: Escobar et al, 2015.

Las variantes antigénicas reportadas provienen de 13 países de la región con murciélagos positivos para el virus (Fig. 6), y el número de éstas es directamente proporcional a la diversidad de murciélagos portadores de RABV. Las variantes más frecuentemente reportadas fueron AgV3 (12 países, encontradas principalmente en *D. rotundus*), AgV4 (seis países, en *T. brasiliensis*), y AgV6 (cinco países, en *Lasiurus spp*). Las mismas difieren entre las especies de murciélagos y las localizaciones geográficas, y se han encontrado también en carnívoros domésticos (perros y gatos) en México, Costa Rica, Colombia, Brasil, Argentina y Chile <sup>[35]</sup>.

### 1.3 Paramyxoviridae y pneumoviridae

Las familias virales *Paramyxoviridae* y *Pneumoviridae*, son familias diversas cuyos miembros pueden infectar humanos y otros mamíferos, así como aves, peces y reptiles. Varios de ellos son patógenos altamente infecciosos que infectan millones de individuos en todo el mundo, con importancia para la salud pública y la economía <sup>[37-40]</sup>.

#### 1.3.1 Taxonomía y clasificación

Las familias *Paramyxoviridae* y *Pneumoviridae* son dos de las ocho familias que conforman el orden *Mononegavirales* <sup>[22, 41, 42]</sup>. Hasta 2016 estas se clasificaban como dos subfamilias dentro de la familia *Paramyxoviridae*; sin embargo, diferencias entre ellos y similitudes existentes entre los pneumovirus y los filovirus (también del orden *Mononegavirales*) llevó a su separación y a la conformación de dos familias independientes <sup>[39, 41]</sup>.

Ambas familias se dividen en distintos géneros en base a criterios morfológicos, la actividad biológica de sus proteínas y la homología de secuencia de las proteínas que codifican; la familia *Paramyxoviridae* consiste así de siete géneros, mientras que *Pneumoviridae* constituye únicamente dos (Tabla 4, Tabla 4A [anexo]) <sup>[22, 41, 42]</sup>.

**Tabla 4.** Familias *Paramyxoviridae* y *Pneumoviridae*

Familia	Género	Nro. de especies	Prototipo
<b><i>Paramyxoviridae</i></b>	<i>Aquaparamyxovirus</i>	1	<i>Salmon aquaparamyxovirus</i>
	<i>Avulavirus</i>	13	<i>Avian avulavirus 1</i>
	<i>Ferlavirus</i>	1	<i>Reptilian ferlavirus</i>
	<i>Henipavirus</i>	5	<i>Hendra henipavirus</i>
	<i>Morbillivirus</i>	7	<i>Measles morbillivirus</i>
	<i>Respirovirus</i>	5	<i>Murine respirovirus</i>
	<i>Rubulavirus</i>	17	<i>Mumps rubulavirus</i>
<b><i>Pneumoviridae</i></b>	<i>Metapneumovirus</i>	2	<i>Avian metapneumovirus</i>
	<i>Orthopneumovirus</i>	3	<i>Human orthopneumovirus</i>

Fuente: Amarasinghe et al, 2017.

### 1.3.2 Genoma y virión

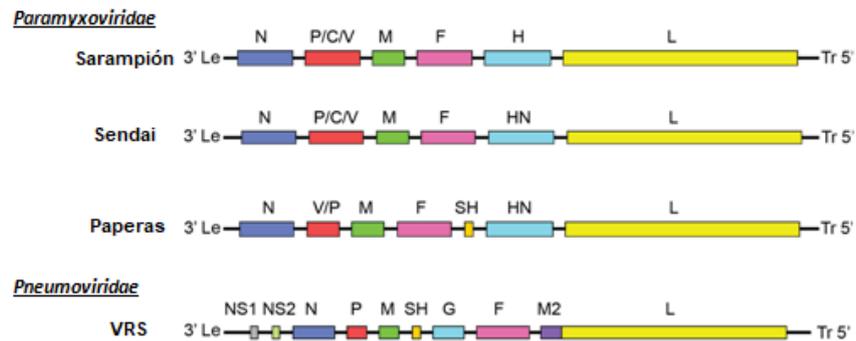
Si bien los paramyxovirus y pneumovirus difieren en el número de genes que poseen, la estructura genómica y los mecanismos de expresión génica y replicación son bastante similares [42]. Ambas familias están integradas por virus envueltos, que presentan una envoltura de bicapa lipídica que deriva de la membrana de la célula hospedera en la cual el virus se replica. Las partículas virales son pleomórficas, variando su forma considerablemente en función del género; habitualmente son esféricas de 150 a 350 nm de diámetro, si bien pueden observarse formas filamentosas para ciertos virus [39, 41, 43, 44].

Para ambas familias el genoma consiste en una única hebra de ARN no segmentado de polaridad negativa y de aproximadamente 15 kb de longitud. Presentan los genes comunes a ambas familias arreglados en la misma dirección (de 3' a 5') y flanqueados por elementos conservados, que se conocen como secuencias de inicio y final del gen, y que los delimitan controlando su transcripción [42, 43]. Ambos genomas contienen regiones extracistrónicas de aproximadamente 50 nt en sus extremos 3' y 5', denominadas *leader* y *trailer*, respectivamente. Estas regiones de control son esenciales para la transcripción y flanquean de seis a diez genes dependiendo de la familia y el género (Fig. 7) [42, 43, 46].

Los genomas de paramyxovirus y pneumovirus tienen un gen N, próximo a 3', que codifica para la proteína de la nucleocápside (nucleoproteína o proteína N), que cubre el ARN genómico viral; un gen P que codifica para la fosfoproteína o proteína P, la subunidad fosfoproteica de la ARN polimerasa dependiente de ARN, y el gen M codificante de la proteína de matriz (proteína M), involucrada en el ensamblaje del virus. A su vez, el genoma presenta un gen 5' proximal que codifica para la proteína L, la proteína grande de la subunidad catalítica de la ARN polimerasa viral. Dado que estos virus son envueltos, los miembros de ambas familias codifican para una proteína de fusión de membranas (la proteína F), que inicia la infección a través de la fusión de la bicapa lipídica del virión y la membrana plasmática de la célula hospedera [43, 46, 47].

Hasta aquí ambas familias comparten su estructura genómica, sin embargo, difieren en los genes que codifican para las proteínas de fijación (proteína de attachment), pudiendo ser una hemaglutinina-neuroaminidasa (HN), una hemaglutinina (H), o la proteína G. Ambas familias comparten esta última, mientras que las dos primeras se encuentran únicamente en *Paramyxoviridae*. Algunos paramyxovirus, codifican además para una glicoproteína

transmembrana de superficie, la proteína pequeña e hidrofóbica SH, cuya función en el ciclo de infección aún no está clara, siendo incluso dispensable para la replicación *in vivo* [39, 41, 43, 47].



**Figura 7.** Organización genómica de *Paramyxoviridae* y *Pneumoviridae*. Miembros de la familia *Paramyxoviridae* incluye Virus del Sarampión (Measles virus, MeV), Virus de las paperas (Mumps virus, MuV), y Sendai virus. El virus respiratorio sincitial (VRS) es un miembro de la familia *Pneumoviridae*. La organización del genoma y el número de marcos abiertos de lectura difiere entre los miembros de ambas familias, pero todos ellos utilizan una ARN polimerasa viral compuesta por P y L. Extraído y modificado de: Cox et al, 2015.

Sólo dos o tres de las proteínas codificadas por los seis a diez genes presentes en estos genomas están expresadas en la superficie del virus: las dos glicoproteínas requeridas para la entrada del virus a la célula blanco, la proteína de fijación (HN, H o G) y la proteína de fusión (F), que están fuertemente asociadas en la envoltura viral y forman espículas visibles al microscopio electrónico. El resto están involucradas tanto en la transcripción/ replicación del genoma, como en el ensamblaje de la partícula viral (Fig. 8) [39, 43, 44].

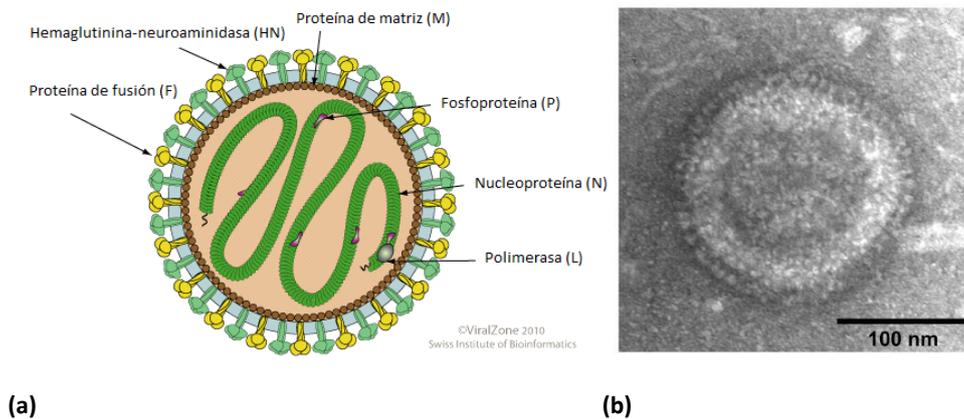
Dentro de la envoltura, el genoma de ARN se encuentra encapsidado por la proteína de nucleocápside (proteína N), formando una estructura helicoidal flexible denominada complejo de ribonucleoproteína (RNP), a la cual se une el complejo de la ARN polimerasa viral dependiente de ARN. Esta última está conformada por la proteína L y la fosfoproteína P, y utiliza el complejo RNP como molde para la transcripción y la replicación [39, 41, 44, 46].

La asociación de la RNP y la membrana viral está mediada por la proteína de matriz (M). Éstas son consideradas los organizadores claves del ensamblaje de la partícula viral, al actuar como puente entre las glicoproteínas de la envoltura y el complejo RNP (mediante la proteína N) [39, 41, 44].

Este tipo de genoma no es infeccioso por sí mismo, dado que sólo el complejo de la ARN polimerasa viral dependiente de ARN es capaz de transcribir y replicarlo. Por tanto, además de la nucleocápside, las partículas infecciosas naciescentes deben empaquetar y entregar estos complejos para poder iniciar un nuevo ciclo infeccioso [41].

La transcripción y replicación de estos genomas tiene lugar en el citoplasma de la célula hospedera y son llevados a cabo por el complejo de la polimerasa viral sin involucrar enzimas nucleares. La primera comienza en la región 3' *leader*, y se generan ARNm subgenómicos con *cap* y poliadenilados, que corresponden a cada gen. Para replicar el genoma, la polimerasa nuevamente comienza en el promotor *leader* pero en este caso, es altamente procesiva y genera un ARN antígeno de polaridad positiva y longitud completa, que servirá como molde

para la síntesis del ARN genómico. Los productos de la replicación difieren de los ARNm al encapsidarse con la nucleoproteína (N) a medida que se va sintetizando <sup>[42, 43, 47]</sup>.



**Figura 8. (a)** Representación esquemática de un virión de paramyxovirus esférico. Extraído de: ViralZone: [www.expasy.org/viralzone](http://www.expasy.org/viralzone), SIB Swiss Institute of Bioinformatics **(b)** Microscopía electrónica con tinción negativa de un virión del Virus del sarampión (mumps virus, MuV). Las glicoproteínas son visibles como espículas embebidas en la envoltura. Extraído y modificado de: Harrison et al, 2010.

### 1.3.3 Paramyxovirus y pneumovirus en murciélagos

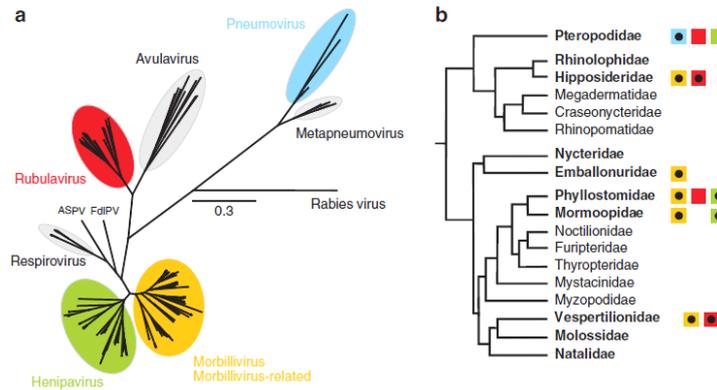
Los casos más emblemáticos de infecciones por paramyxovirus transmitidos por murciélagos son los causados por los henipavirus Hendra (Hev) y Nipah virus (Niv), que fueron descubiertos y reconocidos en la década de 1990 como los responsables de brotes de enfermedad en caballos, cerdos y humanos. Este descubrimiento tuvo un impacto importante en la comprensión de la diversidad genética, evolución viral y rango de hospedero de los paramyxovirus, y la identificación de los murciélagos como sus reservorios naturales jugó un papel importante al aumentar significativamente la atención científica en los murciélagos como importantes reservorios de virus zoonóticos <sup>[48-50]</sup>.

Entre ellos, Hendra virus fue el primer henipavirus zoonótico en ser identificado (1994), al estar asociado a un brote de enfermedad respiratoria y neurológica que afectó a 18 caballos y dos humanos de Brisbane, Hendra (Australia). Este agente infeccioso se aisló de ambas especies y se identificó como un paramyxovirus hasta entonces desconocido que estaba distantemente relacionado con ciertos morbilivirus <sup>[49-53]</sup>. Unos pocos años después, en un brote similar en cerdos y humanos (Malasia, 1998), se aisló un agente viral del líquido cefalorraquídeo (LCR) de dos pacientes fallecidos, que resultó estar estrechamente relacionado a HeV, y que fue nombrado Nipah virus, por el lugar de su aislamiento <sup>[49-53]</sup>.

Ambos virus han sido aislados de orina y saliva de murciélagos frugívoros de las especies *Pteropus*, y se ha demostrado la presencia de anticuerpos neutralizantes en los mismos, lo que sugiere que estos quirópteros serían el principal reservorio natural de los henipavirus <sup>[49-53]</sup>.

En cuanto a la familia *Pneumoviridae*, hasta el momento se ha identificado únicamente un grupo de virus nuevos asociados a murciélagos de la familia *Pteropodidae*, que

filogenéticamente son un grupo hermano del clado que agrupa al virus respiratorio sincitial (RSV, por su sigla en inglés) humano y bovino (género *Orthopneumovirus*). Sin embargo, hasta la fecha no se han detectado virus pertenecientes al género *Metapneumovirus* <sup>[54]</sup>.



**Figura 9.** Distribución de los paramyxovirus y pneumovirus entre las familias de murciélagos. **(a)** Filogenia de los paramyxovirus por máxima verosimilitud **(b)** Árbol filogenético de los quirópteros. Los paramyxovirus o pneumovirus detectados por familia viral se simbolizan como cuadrados coloreados como en (a). Extraído de: Drexler et al, 2012.

### Latinoamérica

Existen escasos registros de detección de paramyxovirus en murciélagos del continente americano. El primer evento ocurrió en 1979 cuando se aisló el virus Mapuera (MapV) a partir de un murciélago frugívoro asintomático, de la especie *Sturnira lilium*, en Brasil. Si bien no se cree que sea un patógeno para humanos, las infecciones experimentales en ratones demostraron ser fatales, y su hospedero natural aún se desconoce <sup>[55, 56]</sup>.

A su vez, Drexler y colaboradores (2011), identificaron secuencias con una estrecha relación filogenética con el género *Henipavirus*, en dos especies diferentes y ampliamente distribuidas del territorio latinoamericano; una frugívora (*Carollia perspicillata* [familia *Phyllostomidae*], Brasil 2009) y una insectívora (*Pteronotus parnelli* [familia *Mormoopidae*], Costa Rica 2010) <sup>[54]</sup>.

Asimismo, estos autores reportaron por primera vez la detección de miembros nuevos del género *Morbillivirus* en murciélagos vampiros neotropicales <sup>[54]</sup>.

### 1.4 Situación en Uruguay de infecciones por rabia y pneumovirus transmitidos por murciélagos

En Uruguay, se estima que la rabia fue introducida durante las invasiones inglesas a comienzos del siglo XIX, ocurriendo desde entonces casos esporádicos de rabia canina. En 1960 se declaró al país libre de rabia, como resultado de las acciones sanitarias que se llevaron a cabo. Sin embargo, en 1964 se registró un rebrote de la enfermedad, lo que obligó a reconstruir el Programa de Control de Rabia. El último caso humano se registró en 1966, y en 1982 y 1983 se dieron los últimos casos de rabia canina en los departamentos de Rivera y Rocha,

respectivamente. A partir de 1983 se vuelve a estar libre de rabia nuevamente, y desde el año 2001 no se realizan campañas de vacunación <sup>[57]</sup>.

En octubre de 2007, luego de 25 años sin reportes de rabia, se registró por primera vez en Uruguay un brote de rabia paralítica en el norte del país (Tacuarembó y Rivera) afectando bovinos y equinos. La principal fuente de infección fue el murciélago *Desmodus rotundus*, y la variante antigénica detectada fue AgV3, comúnmente asociada a estos quirópteros. Luego del brote, en el año 2009 se detectaron 44 focos de la enfermedad, decreciendo este número a 8 en el 2010, y en 2011 ya no hubo casos clínicos <sup>[58]</sup>. También se ha reportado la presencia del virus rábico en murciélagos insectívoros de las especies *Tadarida brasiliensis*, *Molossus molossus* y *Myotis sp.*, portando las dos primeras la variante viral AgV4, sin estar asociadas a casos de enfermedad en animales y humanos <sup>[58]</sup>.

En su Tesina de Grado “Búsqueda de anticuerpos neutralizantes en poblaciones de murciélagos de nuestro país” <sup>[59]</sup>, el Lic. Germán Botto, halló tres murciélagos *D. rotundus* colectados en la zona de Minas de Corrales (Rivera, 2007), y un ejemplar de zorro *Cerdocyon thous* de la forestal FYMSA (Rivera, 2007), que presentaron anticuerpos neutralizantes para el virus rábico por la técnica RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test). Más recientemente en 2017, 10 años después del brote de rabia paralítica, se reportaron nuevos casos de rabia en herbívoros en Tranqueras, Rivera <sup>[60]</sup>.

Por otra parte, hasta el momento no hay información local acerca del rol de los murciélagos autóctonos como reservorios virales para miembros de la familia *Pneumoviridae*. También se carece de esta información a nivel regional.

## ◆ 2. OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Detectar por técnicas moleculares virus de las familias *Rhabdoviridae* y *Pneumoviridae* en murciélagos del Uruguay.

### **Objetivos específicos**

- a. Preparación de controles mediante propagación de cepas de Pneumovirus en cultivo celular.
- b. Preparación de controles para RABV por extracción de ARN a partir de cepas de referencia.
- c. Puesta a punto de técnicas RT-PCR utilizando oligonucleótidos genéricos.
- d. Análisis de muestras de saliva de murciélagos autóctonos.
- e. Identificación de los virus detectados mediante secuenciación y análisis bioinformático de las amplificaciones obtenidas.

## ◆ 3. ESTRATEGIA DE TRABAJO

Teniendo en cuenta que los quirópteros son los principales reservorios de Rhabdo y paramyxovirus, entre otros; y considerando que en Uruguay hasta el momento son pocos los estudios acerca de su rol como reservorios naturales de distintos virus; es de gran importancia realizar un análisis viral en distintas especies de murciélagos autóctonos, como resultado de un relevamiento en condiciones silvestres y en situaciones alejadas de alarma epidemiológica. De esta forma se comenzará a generar información acerca de la circulación de distintas familias virales en el país y determinar así el potencial riesgo zoonótico que representan.

Para ello, se planteó la detección de RABV y miembros de las familias *Pneumoviridae* en muestras de saliva de murciélagos autóctonos; mediante la amplificación de regiones específicas del genoma por técnicas de RT-PCR. Éstas fueron puestas a punto haciendo uso de oligonucleótidos genéricos según literatura, y utilizando como controles positivos extracciones de ARN total a partir de cerebros de ratón inoculados con cepa de referencia de RABV y de pneumovirus propagados en cultivos celulares de las líneas HEP-2 y LLC-MK2. Los resultados obtenidos del procesamiento de las muestras, fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa. De acuerdo a la estrategia planteada, de haber resultados positivos, los amplicones correspondientes serían purificados y secuenciados, y a las secuencias que se obtuvieran se les realizaría un análisis bioinformáticos y filogenéticos con el fin de identificar y caracterizar genéticamente los virus detectados.

## ◆ 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 *Colecta de ejemplares y toma de muestras de saliva*

Las muestras de saliva (n=77) fueron recolectadas en capturas realizadas por el Lic. Germán Botto, colaborador de nuestro laboratorio, durante los años 2013 y 2015 en distintas localidades del país: Artigas, Maldonado, Montevideo, Rivera y Rocha. Las mismas comprenden murciélagos de las especies *Tadarida brasiliensis* (n=28), *Desmodus rotundus* (n=19), *Myotis sp.* (n =15), *Eptesicus furinalis* (n=5), *Molossus molossus* (n=4), *Eumops diminutus* (n=2), *Molossops temminckii* (n=2), *Eumops bonariensis* (n =1) y *Molossus rufus* (n=1), representantes de las tres familias registradas en Uruguay (Tabla 5).

**Tabla 5.** Muestras analizadas por RT-PCR

Especie	Cantidad	Localidad
<i>Tadarida brasiliensis</i>	28	Rivera
<i>Desmodus rotundus</i>	19	Maldonado
<i>Myotis sp.</i>	13	Rivera
	2	Artigas
<i>Eptesicus furinalis</i>	2	Artigas
	2	Rocha
	1	Montevideo
<i>Molossus molossus</i>	3	Rocha
	1	Artigas
<i>Eumops diminutus</i>	2	Artigas
<i>Molossops temminckii</i>	2	Artigas
<i>Eumops bonariensis</i>	1	Artigas
<i>Molossus rufus</i>	1	Artigas

La captura de los ejemplares se realizó mediante el uso de redes de niebla en las proximidades de sus refugios, y las muestras de saliva fueron tomadas por hisopado faríngeo. Cada hisopo individual se colocó y conservó en un criotubo conteniendo buffer de lisis viral (Buffer AVL, Qiagen, Hilden, Alemania). Una vez en el laboratorio, las muestras se mantuvieron a -80°C hasta su utilización, de forma de mantener la integridad del material genético.

El ARN viral se extrajo luego utilizando el kit para fluidos QIAmp Viral RNA (Qiagen, Hilden, Alemania). Para ello se partió del hisopo/muestra en 200 µL de buffer AVL (Qiagen), al cual se le agregaron 500 µL del mismo buffer y 5,6 µL del *carrier* de ARN (Qiagen), luego se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se continuó con el proceso de extracción según las instrucciones del fabricante.

### 4.2 *Puesta a punto de técnicas de RT-PCR para la detección de RABV y pneumovirus*

#### 4.2.1 *Propagación de cepas de referencia por cultivo celular*

Para la producción de los controles virales de la familia *Pneumoviridae* se realizó el aislamiento de cepas de referencia de virus respiratorio sincitial humano (hRSV, por su sigla en inglés) y de metapneumovirus humano (hMPV) en cultivos en monocapa de las líneas celulares continuas HEp-2 y LLC-MK2, respectivamente.

En primer lugar, el crecimiento de las células HEp-2 se realizó en medio mínimo esencial (MEM), enriquecido con 1% de glutamina, 1% de antibióticos (penicilina y estreptomina, concentraciones finales 100 U/mL y 100 µg/mL, respectivamente. Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos) y suero fetal bovino (SFB) al 10% para el crecimiento celular y al 2% para su mantenimiento. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5%, y la replicación de la línea celular se realizó cada 24 – 48 horas haciendo uso de una solución de tripsina al 0,25% (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos). Una vez que la monocapa alcanzó un estado óptimo y un 70% de confluencia se prosiguió a la infección con el inóculo de hRSV. Para ello, previamente se lavó la monocapa con MEM sin SFB (medio de lavado) y se agregó el inóculo puro de forma que cubriese toda la monocapa. Se dejó adsorber durante 90 minutos en estufa a 37°C agitando de manera suave cada 15 minutos, y se agregó medio de mantenimiento al 2% de SFB. La infección se recogió a las 48-72 horas, previa observación microscópica del efecto citopático (ECP): formación de sincicios o células gigantes multinucleadas. La monocapa de células infectadas se raspó y pasó a un tubo Falcon de 15 mL; se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos, y el pellet celular se lavó con PBS luego de lo cual se volvió a centrifugar (1200 rpm, 5 minutos) descartando el sobrenadante y conservando el pellet que se guardó a -80°C hasta su utilización.

Las células LLC-MK2 fueron crecidas y mantenidas en idénticas condiciones, y la propagación viral en ellas se realizó a partir de una cepa de hMPV diluida 1:2 en 0,5 mL de MEM sin SFB, suplementado con 1% de glutamina y 1% de antibióticos (penicilina y estreptomina, concentraciones finales 100 U/mL y 100 µg/mL, respectivamente. Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos). Al momento de la infección, las células fueron pre tratadas con tripsina cristalina (TPCK, tipo XIII de páncreas bovino) al 0,1% y concentración final 2 µg/mL. Luego de 4-6 días se observó el ECP característico (redondeo y agrupación de las células infectadas con posterior desprendimiento de la monocapa). El procedimiento de infección y de obtención del pellet celular fueron los mismos que los indicados anteriormente.

#### **4.2.2 Extracción de ARN total a partir de aislamientos virales**

La extracción de ARN viral se realizó por la técnica de Trizol adaptada para los pellets celulares de hRSV y hMVP obtenidos en el apartado anterior. Brevemente, se añadieron 300 µL de Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos) a cada uno de los pellets y se resuspendieron mediante pipeteos y vórtex dejándose incubar 5 minutos a temperatura ambiente (fase de homogenización). Se añadieron 60 µL de cloroformo, se mezcló por vórtex 15 segundos y se dejó reposar 3 minutos luego de los cuales se centrifugó 15 minutos a 12.000 – 14.000 rpm (fase de separación). Se recuperó la fase superior y se añadieron 150 µL de isopropanol ppa, tras 10 minutos de reposo se centrifugó 15 minutos 12.000 – 14.000 rpm (fase de precipitación). Se retiró el sobrenadante y se agregaron 300 µL de etanol (EtOH) ppa 75% al pellet que se centrifugó durante dos minutos a 12.000 – 14.000 rpm (fase de lavado). Luego de retirar el sobrenadante, se secó el pellet ligeramente y se resuspendió en 30 µL de H<sub>2</sub>O estéril (libre de ARNasa y ADNasa) mediante pipeteos suaves, y el ARN se conservó a -80° C para su posterior utilización.

#### 4.2.3 Extracción de ARN total a partir de cerebros murinos infectados

Para RABV los controles se prepararon por extracción de ARN total a partir de una cepa de referencia cedida amablemente por la Dra. Helena Guarino (Facultad de Veterinaria/ DILAVE). Se partió de dos cerebros de ratón inoculados con el virus rábico, los cuales fueron inactivados individualmente por el agregado de 1 mL de Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos). El tejido se disgregó mediante la utilización de un vórtex, y se continuó con el método de extracción de ARN mencionado anteriormente a partir de 300 µL del homogenizado. Para ello, en la fase de separación se utilizaron 60 µL de cloroformo, y a la fase superior recuperada se le agregaron 150 µL de isopropanol. El pellet obtenido en la precipitación se lavó con 300 µL de EtOH 75%, y luego de secarlo ligeramente se resuspendió en 30 µL de H<sub>2</sub>O estéril. Al igual que en los casos anteriores el ARN extraído se mantuvo a -80°C.

#### 4.2.4 Amplificación de la región de la nucleoproteína de RABV

Se pusieron a punto varias técnicas de RT-PCR para la detección del virus rábico utilizando el ARN total de los cerebros inoculados con la cepa de referencia y haciendo uso de distintas combinaciones de oligonucleótidos específicos dirigidos a la nucleoproteína de RABV, previamente descritos en la bibliografía. Las condiciones óptimas para la amplificación del virus se fueron ajustando en función de la literatura consultada y de las especificaciones de las enzimas utilizadas.

Entre los protocolos establecidos, se seleccionó el más adecuado para realizar el tamizaje inicial de nuestras muestras, dónde se empleó el oligonucleótido N2 (5' TTA TGA GTC ACT CGA ATA 3') obtenido de Bordignon et al. <sup>[61]</sup> para la retrotranscripción (RT), y los oligonucleótidos 504 (Directo, 5' TAT ACT CGA ATC ATG ATG AAT GGA GGT CGA CT 3') y 304 (Reverso, 5' TTG ACG AAG ATC TTG CTC AT 3') para la PCR anidada cuyo producto final es un amplicón de 250 pb (Beltrán et al, 2014) <sup>[62]</sup>. Brevemente, la RT se realizó a partir de 5 µL de ARN, 2 µL del oligonucleótido N2 (10 µM) y 4 µL de H<sub>2</sub>O estéril, se incubó 5 minutos a 65°C y se colocó luego un minuto en hielo. El mix de reacción se preparó con 4 µL de buffer de reacción 5X, 2 µL de dNTPs (10 mM), 2 µL de H<sub>2</sub>O y 1 µL de la retrotranscriptasa RevertedAid M-MuLV (200 U/µL, Fermentas, Life Sciences, Estados Unidos). La mezcla final se incubó a 42°C durante una hora y a 72°C por 15 minutos. El primer round de la PCR se realizó en un volumen final de 50 µL, dónde se colocaron 32,7 µL de H<sub>2</sub>O estéril, 5 µL de Buffer Taq 10X, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL del oligonucleótido 504 (10 µM), 1 µL del oligonucleótido 304 (10 µM), 0,3 µL de Taq DNA Polimerasa (5 U/µL, Fermentas, Life Sciences, Estados Unidos) y 5 µL del cDNA obtenido de la retrotranscripción. La mezcla se incubó 5 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 50°C y 72°C, con una extensión de 7 minutos a 72°C. La segunda amplificación empleó el mismo protocolo utilizando 2 µL del ADN amplificado anteriormente, y aumentando el volumen de agua hasta alcanzar un volumen final de 50 µL. Para este round el ciclado fue 94°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 45 segundos a 94°C, 37°C y 72°C, y 10 minutos a 72°C para la extensión.

Aquellas muestras que dieron positivas en el tamizaje fueron confirmadas por un segundo ensayo de RT-PCR puesto a punto durante este trabajo, en el cual se utilizó el oligonucleótido N2 (Bordignon et al.) <sup>[61]</sup> para la retrotranscripción, y los oligonucleótidos N1 (Directo, 5' TTA TGA GTC ACT CGA ATA 3') (Bordignon et al.) <sup>[61]</sup> y JW10 (Reverso, 5' GTC ATT AGA GTA TGG TGT

TC 3') (Heaton et al, 1997) <sup>[63]</sup> para la *seminested* PCR, cuyo producto final es un amplicón de aproximadamente 550 pb. La RT se llevó a cabo de igual forma que la anterior, mientras que para la amplificación por PCR se realizó un primer round en un volumen final de 50 µL, dónde se colocaron 32,7 µL de H<sub>2</sub>O estéril, 5 µL de Buffer Taq 10X, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL del oligonucleótido N2 (10 µM), 1 µL del oligonucleótido N1 (10 µM), 0,3 µL de Taq DNA Polimerasa (5 U/µL, Fermentas, Life Sciences, Estados Unidos) y 5 µL del cDNA. La mezcla se incubó 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 59°C y 90 segundos a 72°C, con una extensión de 10 minutos a 72°C. El segundo round empleó el mismo protocolo utilizando 2 µL del ADN amplificado anteriormente, 2,5 µL del oligonucleótido JW10 (10 µM) y 2,5 µL del oligonucleótido N1 (10 µM). Para este round el ciclado fue 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 61°C, 90 segundos a 72°C, y 10 minutos a 72°C para la extensión.

#### 4.2.5 Amplificación de la región de la ARN polimerasa viral de pneumovirus

Para la puesta a punto de la técnica de RT-PCR para la detección de miembros de la familia *Pneumoviridae* se utilizaron como sustrato los ARN de hRSV y hMPV generados previamente. A su vez, se seleccionaron de la literatura los oligonucleótidos específicos para la secuencia codificante de la proteína L (ARN polimerasa viral) diseñados por Tong y colaboradores <sup>[64]</sup>, y se ajustó el protocolo indicado por los autores hasta alcanzar las condiciones adecuadas para la óptima amplificación del producto de 250 pb. Para ello, además de ajustar las condiciones a las enzimas de trabajo, se probaron también distintas cantidades de los oligonucleótidos a utilizar para la síntesis del cDNA: 2 µL y 4 µL. En función de los resultados, se eligió trabajar con el volumen mayor.

Brevemente, se realizó una retrotranscripción (RT) en un volumen final de 20 µL dónde se colocaron 4 µL de H<sub>2</sub>O estéril, 4 µL del oligonucleótido PNE-F1 (Directo, 5' GTG TAG GTA GIA TGT TYG CNA TGC ARC C 3', 10 µM) y 5 µL de ARN. La mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos, luego de lo cual se colocó en hielo un minuto. A continuación, se le agregó el mix de reacción conteniendo 4 µL de buffer de reacción 5X, 2 µL de dNTPs (10 mM) y 1 µL de la retrotranscriptasa RevertedAid M-MuLV (200 U/µL, Fermentas, Life Sciences, Estados Unidos). Finalmente se incubó una hora a 42°C seguido de 15 minutos a 72°C. En segundo lugar se realizó una *seminested* PCR para la obtención de un amplicón de 250 pb. La primer amplificación se realizó en un volumen final de 50 µL, y se colocaron 27,8 µL de H<sub>2</sub>O estéril, 5 µL de Buffer Taq 10X, 3 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM), 4 µL del oligonucleótido PNE-R (Reverso, 5' GTC CCA CAA ITT TTG RCA CCA NCC YTC 3', 10 µM), 4 µL del oligonucleótido PNE-F1 (10 µM), 0,2 µL de Taq DNA Polimerasa (5 U/µL, Fermentas, Life Sciences, Estados Unidos) y 5 µL del cDNA obtenido en el paso anterior. La mezcla se incubó 2 minutos a 94°C (desnaturalización), luego 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30s a 49°C y 30s a 72°C; y finalmente una extensión de 7 minutos a 72°C. Para la amplificación *seminested* (segundo round) se siguió el mismo protocolo utilizando los oligonucleótidos PNE-R y PNE-F2 (Directo, 5' ACT GAT CTI AGY AAR TTY AAY CAR GC 3', 10 µM), una alícuota de 2 µL del primer round de PCR y ajustando el volumen de agua hasta alcanzar un volumen final de 50 µL. El ciclado fue el mismo que el utilizado en la PCR 1.

### **4.3 Análisis de las muestras**

Cada una de las muestras fue sometida a la búsqueda de RABV y pneumovirus mediante las técnicas de RT-PCR detalladas anteriormente. Para RABV se realizó un tamizaje inicial mediante los oligonucleótidos N2/504/304 y aquellas muestras que resultaron positivas se confirmaron luego con los oligonucleótidos N2/N1/JW10. Para cada amplificación, se incluyó un control positivo (ARN total de RABV o hRSV/hMPV de cepas de referencia) y un control negativo o sin molde (H<sub>2</sub>O estéril) para detectar la posible contaminación cruzada entre los ejemplares.

Durante el desarrollo de este trabajo todas las RT-PCR (tanto de puesta a punto como de análisis de muestras), fueron realizadas en un termociclador Thermo Scientific.

### **4.4 Electroforesis en gel de agarosa**

La verificación de las técnicas de RT-PCR, y la visualización de sus respectivos productos de amplificación se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE), con intercalador de ADN *Sybr safe* (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos). Para corroborar los tamaños de los fragmentos obtenidos se incluyó en la corrida electroforética un marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder, Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos). La visualización de las bandas obtenidas de los productos de PCR se realizó en un transiluminador UV.

### **4.5 Purificación y secuenciación**

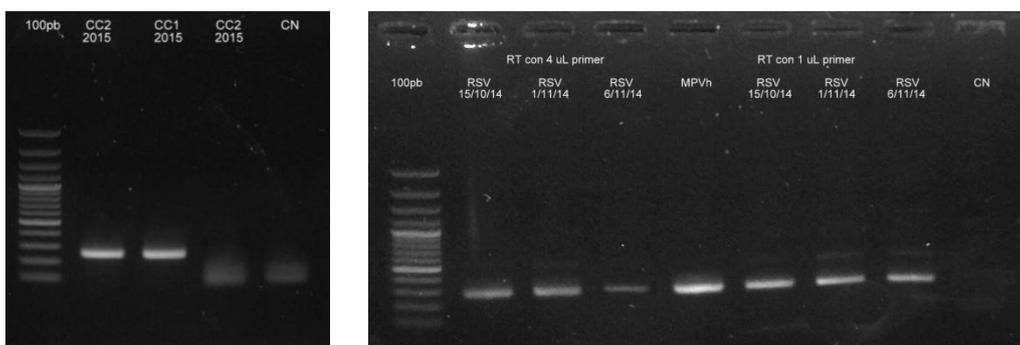
La purificación de los fragmentos obtenidos se realizó a partir de su correspondiente banda en un gel de agarosa al 0,8% en buffer TAE, y utilizando el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research), según las especificaciones del fabricante. Los productos purificados fueron secuenciados por los servicios de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo y de Macrogen Inc. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa BLAST (Basic Alignment Search Tool) <sup>[65]</sup> y fueron cotejadas con la base de datos de GenBank <sup>[66]</sup>, ambos disponibles on-line.

## ◆ 5. RESULTADOS

### 5.1 Obtención de controles y puesta a punto de técnicas de RT-PCR

Mediante técnicas de cultivo celular y extracción de ARN total se logró obtener correctamente el material genético de cepas de referencia de *Pneumoviridae* (hRSV y hMPV), mientras que el correspondiente al virus rábico se obtuvo por extracción de ARN total de los cerebros de ratones infectados.

Éstos fueron empleados y amplificados de forma exitosa en la puesta a punto de los ensayos de RT-PCR con los oligonucleótidos específicos dirigidos a la región génica de la nucleoproteína de RABV (oligonucleótidos N2/504/304 y N1/N2/JW10 [datos no mostrados]) y de la ARN polimerasa viral de pneumovirus (oligonucleótidos PNE-R/PNE-F1/PNE-F2) (Fig. 10).

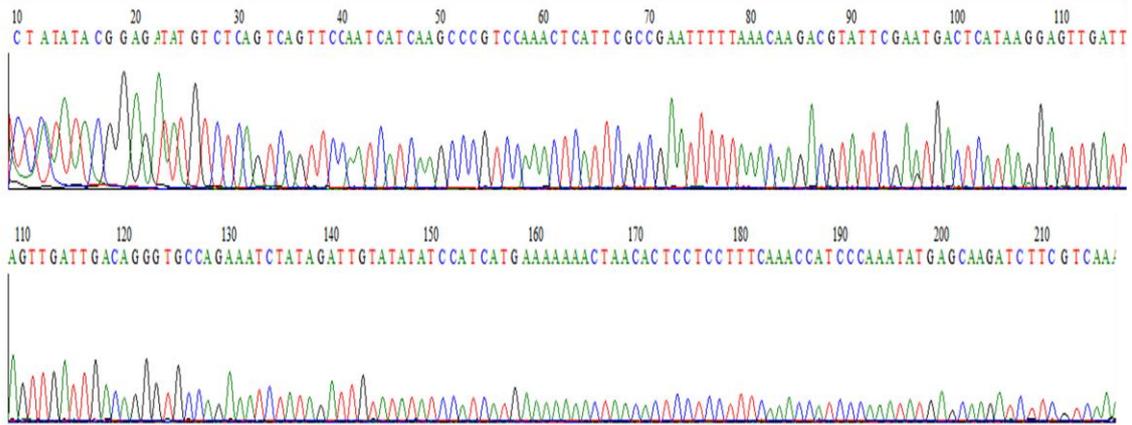


**Figura 10.** Visualización en electroforesis en gel de agarosa al 1% con intercalador de ADN *sybr safe*, de los amplicones de 250 pb para los controles de RABV con los oligonucleótidos N2/504/304 (izquierda) y pneumovirus (hRSV, hMPV) con los oligonucleótidos PNE-R/PNE-F1/PNE-F2 (derecha). El primer carril de cada uno de los gels corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb, mientras que el último muestra el resultado para el control negativo de cada experiencia. Se indica en cada caso el ARN procesado. CC = Control Cerebro (infectado con RABV), CN = Control Negativo.

La correcta extracción y amplificación fue corroborada luego por secuenciación de los amplicones obtenidos (servicio de secuenciación de MacroGen Inc). Para el caso de RABV las secuencias resultantes con los oligonucleótidos 304 (reverso) y 504 (directo) alinearon exitosamente con la región génica de la nucleoproteína (proteína N) del virus rábico. Mientras que la secuencias obtenidas para los controles de hRSV y hMPV con los oligonucleótidos PNE-R (reverso) y PNE-F2 (directo), lo hacen con las regiones génicas correspondientes a sus ARN polimerasas virales (proteína L). Estos resultados verifican y reafirman no sólo la identidad de los amplicones obtenidos y su óptimo aislamiento, sino también la correcta selección de los oligonucleótidos y la consiguiente puesta a punto de las técnicas de RT-PCR.

En la Figura 11 se muestran los resultados de secuencia y alineamiento con la base de datos obtenidos para cada uno de ellos por secuenciación con los cebadores directos.

a) Control positivo RABV, secuenciación Oligonucleótido 504



Rabies virus strain CVS-N2c, complete genome  
Sequence ID: [HM535790.1](#) Length: 11927 Number of Matches: 1

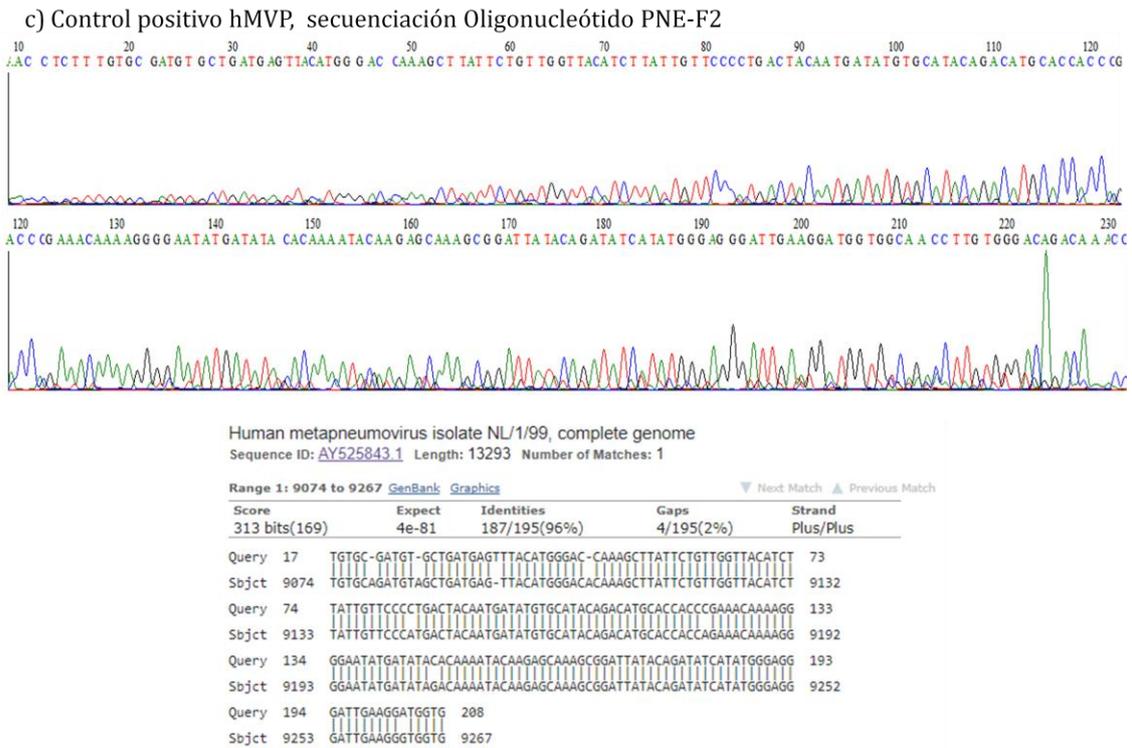
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
368 bits(199)	8e-98	202/203(99%)	1/203(0%)	Plus/Plus
Query 9	TCT-ATATACGGAGATATGTCTCAGTCAAGCCCGTCCAACTCATT	67		
Sbjct 1325	TCTCATATACGGAGATATGTCTCAGTCAAGCCCGTCCAACTCATT	1384		
Query 68	GCCGAATTTTAAACAAAGACGTATTGAAATGACTCATAAGGAGTTGATTGACAGGGTGCC	127		
Sbjct 1385	GCCGAATTTTAAACAAAGACGTATTGAAATGACTCATAAGGAGTTGATTGACAGGGTGCC	1444		
Query 128	AGAAATCTATAGATTGTATATATCCATCATGAAAAAAAACTAACACTCCTCCTTTCAAACC	187		
Sbjct 1445	AGAAATCTATAGATTGTATATATCCATCATGAAAAAAAACTAACACTCCTCCTTTCAAACC	1504		
Query 188	ATCCCAAATATGAGCAAGATCTT	210		
Sbjct 1505	ATCCCAAATATGAGCAAGATCTT	1527		

b) Control positivo hRSV, secuenciación Oligonucleótido PNE-F2



Human respiratory syncytial virus strain ATCC VR-26, complete genome  
Sequence ID: [AY911262.1](#) Length: 15226 Number of Matches: 2

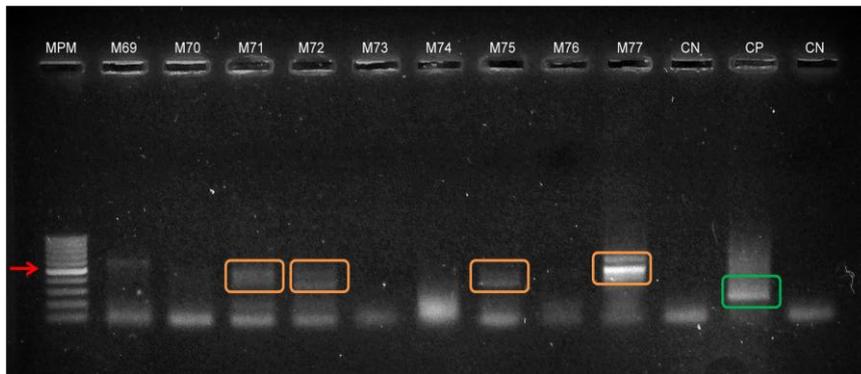
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
392 bits(212)	5e-105	214/215(99%)	0/215(0%)	Plus/Plus
Query 10	ACGTCATGTATTTGTAGTGATGTGCTGGATGAACGTCATGGTACAATCTCTATTTTCC	69		
Sbjct 10630	ACGTCATGTATTTGTAGTGATGTGCTGGATGAACGTCATGGTACAATCTCTATTTTCC	10689		
Query 70	TGGTTACATTTAACTATTCTCATGTGACAAATAATGCACATATAGGCATGCACCCCC	129		
Sbjct 10690	TGGTTACATTTAACTATTCTCATGTGACAAATAATGCACATATAGGCATGCACCCCC	10749		
Query 130	TATATAAGAGATCATATTGTAGATCTTAACAATGTAGATGAACAAAGTGGATTATATAGA	189		
Sbjct 10750	TATATAAGAGATCATATTGTAGATCTTAACAATGTAGATGAACAAAGTGGATTATATAGA	10809		
Query 190	TATCACATGGGTGATTGAAGGTTGGTGCAAAA	224		
Sbjct 10810	TATCACATGGGTGATTGAAGGTTGGTGCAAAA	10844		



**Figura 11.** Secuencias génicas obtenidas por secuenciación con los oligonucleótidos *forward* para los controles positivos de (a) RABV, (b) hRSV y (c) hMPV; y sus correspondientes alineamientos con la base de datos de GenBank.

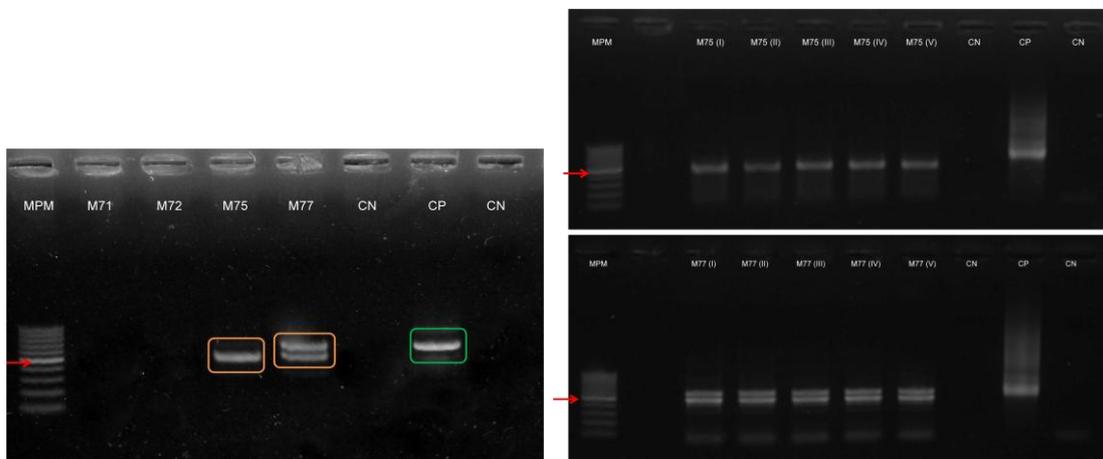
## 5.2 Procesamiento de las muestras y secuenciación de los amplicones obtenidos

Una vez puestas a punto las técnicas de retrotranscripción y amplificación por PCR, se prosiguió a su aplicación en el análisis de cada una de las muestras. Para RABV, se obtuvieron en primera instancia, mediante los cebadores N2/504/304, amplicones con un tamaño aproximado de 500 pb para cuatro muestras de *D. rotundus* procedentes de Grutas de Salamanca, Maldonado (Fig. 12). Dado que el tamaño de banda obtenido duplica el tamaño esperado (250 pb), se procesaron las muestras correspondientes por una segunda RT-PCR haciendo uso de los oligonucleótidos N1/N2/JW10, de forma de corroborar los resultados alcanzados.



**Figura 12.** Visualización en electroforesis en gel de agarosa al 1% con intercalador de ADN *sybr safe*, de las bandas de aproximadamente 500 pb obtenidas por RT-PCR con los oligonucleótidos N2/504/304, para las muestras M71, M72, M75 y M77, y de la banda de 250 pb para el control positivo (CP). El primer carril corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb, dónde se señala la banda correspondiente a los 500 pb. Se indica en cada caso el ARN procesado. CN = Control Negativo, M = Muestra.

En esta oportunidad se esperaba obtener un amplicón de 550 pb, el cual únicamente se visualizó para dos de las cuatro muestras procesadas, M75 y M77. La reproducibilidad de las mismas se comprobó mediante su amplificación por quintuplicado, obteniéndose en todos los casos el mismo resultado (Fig. 13).



**Figura 13.** Visualización en electroforesis en gel de agarosa al 1% con intercalador de ADN *sybr safe*, de los amplicones de aproximadamente 550 pb para las muestras M75, M77 y el control positivo (CP), obtenidas por RT-PCR con los oligonucleótidos N1/N2/JW10 (Izquierda); y de los quintuplicados

de las muestras con bandeo positivo (Derecha). El primer carril en ambos geles corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb, dónde se señala la banda correspondiente a los 500 pb. Se indica en cada caso el ARN procesado. CP = Control Positivo, CN = Control Negativo, M = Muestra.

No se obtuvieron resultados positivos para ninguna de las restantes muestra por amplificación con los cebadores N2/504/304, ni PNE-R/PNE-F1/PNE-F2. En todos los casos, los ensayos realizados estuvieron validados por los controles positivos y negativos.

### ***Secuenciación***

Los amplicones obtenidos para las muestras M75 y M77, así como los de los controles positivos, se purificaron a partir de sus correspondientes bandas en un gel de agarosa, según se indica en Materiales y Métodos, y fueron secuenciados en el Instituto Pasteur de Montevideo con los oligonucleótidos N1 (directo) y JW10 (reverso). Para el caso de la muestra M77, se purificaron y secuenciaron las dos bandas visualizadas en el gel.

Al igual que las secuencias anteriores, los resultados obtenidos para los controles por ambos cebadores alinean correctamente con la región del genoma de la nucleoproteína de RABV (datos no mostrados). Sin embargo, no se obtuvieron secuencias de calidad suficiente a partir de las muestras, e incluso para algunas de ellas ni siquiera se obtuvo secuencia, por lo que no se hallaron coincidencias en la base de datos de GenBank.

## ◆ 6. DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo general la detección por técnicas moleculares de virus de las familias *Rhabdoviridae* y *Pneumoviridae* en saliva de murciélago, con el fin de realizar un relevamiento de la circulación de estos agentes virales en la población silvestre de quirópteros del país.

En primer lugar, basándonos en bibliografía existente, se planteó la puesta a punto de técnicas de RT-PCR para la detección y amplificación del virus rábico (RABV, prototipo del género *Lyssavirus*, familia *Rhabdoviridae*) y de forma genérica para la familia *Pneumoviridae*. Para ello, se prepararon por diversas técnicas los controles de ARN viral (controles positivos de las distintas familias a detectar) empleados como sustratos en la puesta a punto. Los controles correspondientes a la familia *Pneumoviridae*, Virus Respiratorio Sincitial Humano (hRSV) y Metapneumovirus humano (hMPV), se generaron mediante propagación de cepas virales de referencia en cultivos celulares de las líneas HEp-2 y LLC-MK2, respectivamente. Mientras que los controles correspondientes al virus rábico se obtuvieron exitosamente por extracción de ARN total de cerebros de ratón infectados con una cepa de referencia.

Una vez obtenidos los controles positivos se comenzó con la puesta a punto de las distintas técnicas de RT-PCR. Para RABV inicialmente se seleccionó el trabajo de Bordignon et al. (2005)<sup>[61]</sup>, dónde se plantea la detección del virus rábico mediante una *seminested* RT-PCR con cebadores específicos (N1, N2 y N3) dirigidos a la nucleoproteína del virus. En base a las secuencias reportadas en el mismo, se adquirieron los tres oligonucleótidos los cuales fueron probados en numerosas oportunidades con el ARN control, sin obtener resultados positivos. Luego de varias modificaciones en el protocolo (enzimas, ciclados, concentraciones, etc.) y estando ya bastante avanzado el desarrollo del trabajo sin haber alcanzado resultados exitosos; se decidió hacer una búsqueda de los oligonucleótidos utilizados, y un *BLAST* de los mismos, encontrando que la bibliografía utilizada como base presentaba errores. Esto es, la secuencia reportada por Bordignon y colaboradores para el oligonucleótido reverso N3, no era correcta, y por tanto no alineaba con las secuencias génicas de rabia. Estas dificultades en la amplificación, nos llevó una mayor demanda de tiempo del estimado y la consiguiente realización de actividades no previstas, derivando en el diseño de nuevas condiciones y nuevos insumos que nos permitieran alcanzar el objetivo propuesto.

Con este nuevo panorama, se hizo la búsqueda de la secuencia original del cebador N3 (JW10) en el trabajo de Heaton et al. (1997)<sup>[63]</sup>, y tras corroborar su confianza, se realizó la puesta a punto de un protocolo de *seminested* RT-PCR haciendo uso de los oligonucleótidos N1/N2/JW10, con los cuales se pudo secuenciar correctamente los controles positivos de RABV (datos no mostrados). En paralelo, y continuando con lo referenciado en la bibliografía existente en cuanto a detección y amplificación del virus rábico, se probaron los cebadores 504 y 304 (dirigidos a la nucleoproteína) reportados por Beltrán y colaboradores (2014)<sup>[62]</sup>. Luego de ajustar el protocolo y de combinarlos con la retrotranscripción ya ensayada, se logró no sólo amplificar exitosamente los controles positivos, sino también secuenciarlos (Figs. 10 y 11).

Además de lo señalado hasta aquí, se diseñaron dos cebadores denominados N4 (5' GTC AYA RVG TRT GRT GYT CYA C 3') y N5 (5' GAT AAG ATC ACC CCG GAT TC 3'), que junto con N2 fueron empleados y puestos a punto en una *seminested* RT-PCR que amplifica correctamente los controles positivos, dando lugar a un amplicón de aproximadamente 260 pb. Sin embargo, lamentablemente, no fueron eficaces a la hora de secuenciar (datos no mostrados).

Teniendo en cuenta esto, y considerando los resultados obtenidos de amplicones y secuencia, se decidió emplear la RT-PCR con los oligonucleótidos N2/504/304 para realizar la búsqueda inicial de RABV en nuestras muestras (tamizaje), y confirmar aquellas presuntas positivas por la técnica desarrollada con los cebadores N1/N2/JW10.

En cuanto a la puesta a punto de las técnicas de RT-PCR para la detección de miembros de la familia *Pneumoviridae*, se seleccionaron de la literatura los oligonucleótidos PNE de Tong y colaboradores (2008) <sup>[64]</sup> para la amplificación del gen de la ARN polimerasa viral. Los mismos fueron ensayados junto con los controles de ARN de hRSV y hMPV, hasta alcanzar las condiciones adecuadas para la óptima amplificación de los controles. Esto se logró correctamente, así como la secuenciación de los mismos por ambos cebadores (Figs. 10 y 11).

Las secuencias génicas obtenidas para los controles (tanto de RABV como de hRSV y hMPV), nos confirman su identidad y nos avalan el proceso de aislamiento y extracción del material genético (Fig. 11).

En cuanto a las muestras procesadas, se contó con un total de 77 muestras de saliva que representan cinco localidades del país (Artigas, Maldonado, Montevideo, Rivera y Rocha), nueve especies y las tres familias de murciélagos presentes en Uruguay: *Phyllostomidae*, *Molossidae* y *Vespertilionidae* (Tablas 3 y 5). Entre ellas, 19 corresponden a ejemplares del hematófago *D. rotundus*, todos procedentes de las Grutas de Salamanca, Aiguá – Maldonado, dónde existe una colonia de varios cientos de individuos de esta especie <sup>[67]</sup>.

El análisis de las muestras se realizó una vez puesto a punto las técnicas de RT-PCR así como los controles positivos que las validan. Se trabajó sobre el ARN total extraído de cada hisopado faríngeo, al cual se lo sometió a la búsqueda de RABV y miembros de *Pneumoviridae*. En el tamizaje inicial para RABV (RT-PCR con los oligonucleótidos N2/504/304), cuatro de las muestras analizadas (M71, M72, M75 y M77) registraron amplicones de aproximadamente 500 pb, duplicando el tamaño esperado (Fig. 12). Para confirmar estos resultados, se analizaron con los oligonucleótidos N1/N2/JW10, dónde sólo las muestras M75 y M77, mostraron amplicones presuntamente positivos para RABV (Fig. 13). Estos resultados no pudieron demostrarse, ya que no se obtuvieron secuencias de calidad para las mismas. Las secuencias positivas de los controles empleados en el mismo protocolo, nos valida la técnica de purificación de ADN, y corrobora la eficacia de los cebadores N1 y JW10 en el proceso de secuenciación. Para las restantes muestras no se detectó la presencia de los agentes virales de interés.

Existen reportes en la literatura que señalan que la prevalencia de la rabia en murciélagos basada en la vigilancia pasiva (estudios realizados con individuos que son llevados por la población a los centros de investigación) es considerablemente más alta que las estimaciones

para los individuos muestreados activamente en sus hábitats naturales (vigilancia activa), siendo menos del 1% de éstos últimos los que resultan positivos al virus <sup>[68, 69]</sup>.

Si se tiene en cuenta este porcentaje de positividad para RABV en la vigilancia activa, y si se considera que aquí se trabajó con 77 muestras de murciélagos silvestres recolectados al azar, resulta necesario aumentar el número de muestras para trabajos futuros, de forma de alcanzar un número mínimo de cien, y aumentar así la probabilidad de detectar el virus en al menos un individuo.

A nivel local, investigaciones previas han identificado tres especies de murciélagos no hematófagos positivas para el virus rábico: *Tadarida brasiliensis* (Rivera), *Myotis sp* (Tacuarembó) y *Molossus molossus* (Montevideo), así como casos positivos de *Desmodus rotundus* (Rivera), la única especie hematófaga del país <sup>[58, 59, 70]</sup>.

Teniendo en cuenta que la mayoría de estas detecciones se dieron en el Norte del territorio uruguayo, próximas a la zona de los brotes del 2007 y el recientemente ocurrido en 2017 <sup>[58, 59, 60, 70]</sup>; debería considerarse realizar nuevas capturas en estas zonas, no sólo por sus antecedentes de casos positivos, sino también por su proximidad con Brasil, dónde existe un gran reporte de quirópteros de distintas especies positivos a RABV <sup>[35]</sup>, que pueden contribuir al intercambio viral con murciélagos autóctonos, y a la dispersión de partículas virales durante sus vuelos migratorios.

Hasta el momento el total de la información obtenida sobre la infección por el virus rábico en murciélagos autóctonos, así como las únicas secuencias de RABV reportadas en el país (Guarino et al, 2013) <sup>[58]</sup>, se han generado a partir de estudios serológicos o mediante la detección directa del virus en el sistema nervioso central (SNC). En su investigación, Guarino y colaboradores han destacado el diagnóstico de RABV en tejidos del SNC de murciélagos por medio de técnicas de anticuerpos fluorescentes (FAT, por su sigla en inglés), inoculación en ratones (sigla en inglés, MIT), y RT-PCR, a partir de lo cual también se obtuvieron las primeras y únicas secuencias de RABV uruguayas reportadas <sup>[58]</sup>. Por su parte, el Lic. Germán Botto detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes para el virus de la rabia en sueros de tres ejemplares de *D.rotundus* mediante la técnica RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) <sup>[59]</sup>.

Es decir, hasta la fecha no se han realizado en el país estudios de detección viral en saliva de murciélagos y por tanto, este trabajo consiste en el primer intento de detección de RABV por amplificación a partir de hisopados faríngeos. Este tipo de estudios cobra relevancia considerando el papel fundamental de la saliva en la transmisión viral, no solo entre la población de murciélagos, sino en la infección de posibles hospederos como el ganado y el hombre.

En este sentido, varias especies de murciélagos son especies protegidas y la recolección de material del SNC u otros órganos para la identificación de infecciones virales activas en la población silvestre, se vuelve compleja. Es por ello, que la mayoría de los estudios se basan exclusivamente en serología, con la limitante de que la presencia de anticuerpos refleja la exposición pasada al virus y no precisamente una infección activa. A diferencia de esto, la toma de muestra por hisopados faríngeos es inofensiva y la presencia de ARN viral en las muestras puede utilizarse como un marcador de infección. Por tanto, la detección en saliva

puede considerarse una alternativa válida para determinar la circulación de agentes virales en la población de murciélagos silvestres y concluir así su potencial riesgo zoonótico <sup>[71]</sup>.

El presente trabajo representa además el primer estudio local de detección de Pneumovirus en murciélagos. Es muy poca la información recopilada a nivel regional sobre el rol de los murciélagos como reservorios de miembros de la familia *Pneumoviridae*, por lo que aún resta mucho por estudiar.

## ◆ 7. CONCLUSIONES

- a. Se generaron controles positivos de ARN viral representativo de la familia *Pneumoviridae* por propagación de cepas de referencia de hRSV y hMPV en cultivos celulares de las líneas HEp-2 y LLC-MK2, respectivamente.
- b. Se alcanzó la correcta extracción de material genético viral a partir de cerebros de ratón infectados con una cepa de referencia de RABV, y la óptima utilización del ARN viral como control positivo.
- c. Se pusieron a punto dos sistemas de detección molecular de RABV por RT-PCR que permiten la amplificación de la región génica de la nucleoproteína y un sistema genérico para la detección de miembros de la familia *Pneumoviridae* por amplificación por RT-PCR de la ARN polimerasa viral.
- d. Se intentó detectar por primera vez en Uruguay la presencia de RABV y virus de la familia *Pneumoviridae* en muestras de saliva de murciélago, realizándose un relevamiento de la circulación de estos agentes en la población silvestre de quirópteros autóctonos.
- e. No se detectó la presencia de RABV ni Pneumovirus en murciélagos insectívoros de Artigas, Montevideo, Rivera y Rocha; ni en hematófagos de Maldonado.

## ◆ 8. PERSPECTIVAS

El presente trabajo propuso como objetivo poner a punto técnicas moleculares para la detección de agentes virales de interés en muestras de saliva de murciélago y aplicarlas en el análisis de la población silvestre de quirópteros autóctonos. Considerando los resultados obtenidos, se pretende a futuro:

- a. Aumentar el número de muestras a procesar, y con ellas la diversidad de especies y áreas territoriales cubiertas.
- b. Ahondar en la investigación sobre los murciélagos como reservorios virales de miembros de la familia *Pneumoviridae* en el país y la región.
- c. Continuar con la puesta a punto de técnicas moleculares para la detección de otras familias virales, por ejemplo *Paramyxoviridae* y *Coronaviridae*.

## ◆ REFERENCIAS

- [1] Newman S.H., Field H.E., de Jong C.E., Epstein J.H., Food and Agriculture Organisation of the United Nations. (2011) *Investigating the role of bats in emerging zoonoses: Balancing ecology, conservation and public health interests*. Manual No. 12, Roma.
- [2] Luis, A. D., Hayman, D. T. S., O’Shea, T. J., Cryan, P. M., Gilbert, A. T., Pulliam, J. R. C., Mills, J. N., Timonin, M. E., Willis, C. K. R., Cunningham, A. A., Fooks, A. R., Rupprecht, C. E., Wood, J. L. N., Webb, C. T. (2013). A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special?. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 280(1756), 20122753. <http://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>
- [3] Luis, A. D., O’Shea, T. J., Hayman, D. T. S., Wood, J. L. N., Cunningham, A. A., Gilbert, A. T., Mills, J. N., Webb, C. T. (2015). Network analysis of host-virus communities in bats and rodents reveals determinants of cross-species transmission. *Ecology Letters*. <http://doi.org/10.1111/ele.12491>
- [4] Smith, I., Wang, L. (2012) Bats and their virome : an important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Current Opinion in Virology*, 3(1), 84–91. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.11.006>
- [5] Calisher, C. H., Childs, J. E., Field, H. E., Holmes, K. V., & Schountz, T. (2006). Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 531–545. <http://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>
- [6] Moratelli, R., & Calisher, C. H. (2015). Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses?. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(1), 1–22. <http://doi.org/10.1590/0074-02760150048>
- [7] Kuzmin, I. V., Bozick, B., Guagliardo, S. A., Kunkel, R., Shak, J. R., Tong, S., & Rupprecht, C. E. (2011). Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. *Emerging Health Threats Journal*, 4(0), 1–17. <http://doi.org/10.3402/ehth.v4i0.7159>
- [8] Brook, C. E., & Dobson, A. P. (2015). Bats as “special” reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends in Microbiology*, 23(3), 172–180. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.004>
- [9] Wang, L., Walker, P. J., & Poon, L. L. M. (2011). Mass extinctions , biodiversity and mitochondrial function : are bats “ special ” as reservoirs for emerging viruses? *Current Opinion in Virology*, 1(6), 649–657. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.013>
- [10] Hayman, D. T. S. (2016). Bats as Viral Reservoirs. *Annual Review of Virology*. 3:24.1–24.23, (August). <http://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042203>
- [11] Chen, L., Liu, B., Yang, J., & Jin, Q. (2014). DBatVir: the database of bat-associated viruses. *Database*, 2014(0). <http://doi.org/10.1093/database/bau021>

- [12] González, E. M & J. A. Martínez –Lanfranco. (2010). Mamíferos del Uruguay. Guía de campo e introducción a su estudio y conservación. *Banda Oriental, Vida Silvestre & MNHN*. Pp- 1- 464. Montevideo.
- [13] Agnarsson, I., Zambrana-Torrel, C. M., Flores-Saldana, N. P., & May-Collado, L. J. (2011). A time-calibrated species-level phylogeny of bats (Chiroptera, Mammalia). *PLoS Currents*, 3, RRN1212. <http://doi.org/10.1371/currents.RRN1212>
- [14] Teeling, E. C., Springer, M. S., Madsen, O., Bates, P., O'Brien, S. J., Murphy, W. J. (2005). A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the Fossil Record. *Science*. 307, Enero, p.580-584. <http://doi.org/10.1126/science.1105113>
- [15] Serra-cobo, J., & López-Roig, M. (2016). Bats and Emerging Infections : An Ecological and Virological Puzzle. *Adv Exp Med Biol - Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health*. DOI 10.1007/5584\_2016\_131
- [16] Schountz, T. (2014). Immunology of bats and their viruses: challenges and opportunities. *Viruses*, 6(12), 4880–4901. <http://doi.org/10.3390/v6124880>
- [17] O'Shea, T. J., Cryan, P. M., Cunningham, A. A., Fooks, A. R., Hayman, D. T. S., Luis, A. D., Peel, A. J., Plowright, R.K., Wood, J. L. N. (2014). Bat flight and zoonotic viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 20(5), 741–745. <http://doi.org/10.3201/eid2005.130539>
- [18] Walker, P. J., Dietzgen, R. G., Joubert, D. A., & Blasdel, K. R. (2011). Rhabdovirus accessory genes. *Virus Research*, 162(1–2), 110–125. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.004>
- [19] Dietzgen, R. G., Kondo, Hideki, Goodin, Michael M., Kurath, G, Vasilakis, N. (2016). The family Rhabdoviridae: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. *Virus Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.010>
- [20] Kuzmin, I. V, Novella, I. S., Dietzgen, R. G., Padhi, A., & Rupprecht, C. E. (2009). Infection, Genetics and Evolution, 9, 541–553. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.005>
- [21] Walker P.J., Firth C., Widen S.G., Blasdel K.R., Guzman H., Wood T.G., et al. (2015) Evolution of Genome Size and Complexity in the Rhabdoviridae. *PLoS Pathog* 11(2): e1004664. doi:10.1371/journal.ppat.1004664
- [22] Amarasinghe G. K, et al. (2017). Taxonomy of the order Mononegavirales : update 2017. *Springer*. <http://doi.org/10.1007/s00705-017-3311-7>
- [23] Wagner, R.R., Rose, J. K. (1996) *Rhabdoviridae: The Viruses and Their Replication*. En: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., et al. *Fields Virology Volume 1*. Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia, p. 1121-1135.
- [24] Albertini, A. a V, Baquero, E., Ferlin, A., & Gaudin, Y. (2012). Molecular and cellular aspects of rhabdovirus entry. *Viruses*, 4(1), 117–139. <http://doi.org/10.3390/v4010117>
- [25] ViralZone: [www.expasy.org/viralzone](http://www.expasy.org/viralzone), SIB Swiss Institute of Bioinformatics.

- [26] Kotait, I., Carrieri, M. L., Yumie Takaoka, N. (2009) Raiva – Aspectos gerais e clínica. São Paulo, Instituto Pasteur (Manuais 8) 49p. il.
- [27] Davis, B. M., Rall, G. F., & Schnell, M. J. (2015). Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But were Afraid to Ask). *Annual Review of Virology*. (June), 20:57, 1–21. <http://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055157>
- [28] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) <https://talk.ictvonline.org/>
- [29] Nel, L. H., & Markotter, W. (2007). Lyssaviruses. *Critical Reviews in Microbiology*. 33, p.301–324. <http://doi.org/10.1080/10408410701647602>
- [30] Rupprecht, C., Kuzmin, I., Meslin, F. (2017). Lyssaviruses and rabies : current conundrums , concerns , contradictions and controversies. *F1000Research* 6(0), 1–22. <http://doi.org/10.12688/f1000research.10416.1>
- [31] Banyard, A. C., Evans, J. S., Luo, T. R., Fooks, A. R. (2014). Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat. *Viruses*, 6(8), 2974–90. <http://doi.org/10.3390/v6082974>
- [32] Rupprecht, C. E., Turmelle, A., & Kuzmin, I. V. (2011). A perspective on lyssavirus emergence and perpetuation. *Current Opinion in Virology*, 1(6), 662–670. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.014>
- [33] Calisher, C. H., & Ellison, J. A. (2012). The other rabies viruses : The emergence and importance of lyssaviruses from bats and other vertebrates. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 10(2), 69–79. <http://doi.org/10.1016/j.tmaid.2012.01.003>
- [34] Johnson, N., Vos, A., Freuling, C., Tordo, N., Fooks, A. R., & Mu, T. (2010). Human rabies due to lyssavirus infection of bat origin. *Veterinary Microbiology*. 142 (2010) 151–159 <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.001>
- [35] Escobar, L. E., Peterson, A. T., Favi, M., Yung, V., & Medina-Vogel, G. (2015). Bat-borne rabies in Latin America. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 57(1), 63–72. <http://doi.org/10.1590/s0036-46652015000100009>
- [36] Corrêa Scheffer K, Iamamoto K, Miyuki Asano K, Mori E, Estevez Garcia AI, Achkar SM, et al. (2014) Murciélagos hematófagos como reservorios de la rabia. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*.31(2), p.302-309.
- [37] Cox, R., Plemper, R. K. (2015). The paramyxovirus polymerase complex as a target for therapeutics. *Front. Microbiol.* 6:459. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00459>
- [38] Bose, S., Jardetzky, T. S., & Lamb, R. A. (2016). Timing is everything: Fine-tuned molecular machines orchestrate paramyxovirus entry, *Virology*, 518–531. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.037.Timing>

- [39] Najjar, F. El, Schmitt, A. P., & Dutch, R. E. (2014). Paramyxovirus Glycoprotein Incorporation, Assembly and Budding: A Three Way Dance for Infectious Particle Production. *Viruses*, 6, 3019–3054. <http://doi.org/10.3390/v6083019>
- [40] Plattet, P., & Plemper, R. K. (2013). Envelope protein dynamics in paramyxovirus entry. *mBio*, 4(4), 1–9. <http://doi.org/10.1128/mBio.00413-13>
- [41] Cox, R. M., & Plemper, R. K. (2017). ScienceDirect Structure and organization of paramyxovirus particles. *Current Opinion in Virology*, 24, 105–114. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.05.004>
- [42] Fearn, R., & Plemper, R. K. (2017). Polymerases of paramyxoviruses and pneumoviruses. *Virus Research*. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.008>
- [43] Lamb R. A, Kolalofsky, D. (1996) *Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication*. En: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., et al. *Fields Virology Volume 1*. Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia, p. 1121-1135.
- [44] Harrison M. S., Sakaguchi, T., Schmitt A. P. (2010) Paramyxovirus Assembly and Budding: Building Particles that Transmit Infections. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 September ; 42(9): 1416–1429. doi:10.1016/j.biocel.2010.04.005.
- [45] Alfonso C. L, et al (2016). Taxonomy of the order Mononegavirales : update 2016. *Springer*. <http://doi.org/10.1007/s00705-016-2880-1>
- [46] Longhi, S. (2015). Structural disorder within paramyxoviral nucleoproteins. *FEBS Letters*, 589(19), 2649–2659. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.055>
- [47] Parks, G. D., & Alexander-miller, M. A. (2014). Paramyxovirus Activation and Inhibition of Innate Immune Responses, *NIH Public Access*, 425(24), 4872–4892. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.015.Paramyxovirus>
- [48] Marsh, G. A., de Jong, C., Barr, J. A., Tachedjian, M., Smith, C., et al. (2012). Cedar Virus : A Novel Henipavirus Isolated from Australian Bats. *PLoS Pathog*. 8(8). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002836>
- [49] Broder, C. C., Weir, D., Reid, P. A. (2016) Hendra Virus and Nipah Virus Animal Vaccines. *Vaccine*. June; 34 (30), p.3525-3554. doi:10.1016/j.vaccine.2016.03.075.
- [50] Bellini, W. J., Harcourt, B. H., Bowden, N., Rota, P. A. (2005). Nipah virus : An emergent paramyxovirus causing severe encephalitis in humans. *Journal of NeuroVirology*, 11, p.481-487. <http://doi.org/10.1080/13550280500187435>
- [51] Clayton, B. A. (2017). Nipah virus : transmission of a zoonotic paramyxovirus. *Current Opinion in Virology*. 22, p.97-104. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.12.003>
- [52] Abdullah, S., Tan, C. T. (2014). Henipavirus encephalitis. En: Tselis, A. C., Booss, J. *Handbook of Clinical Neurology, Neurovirology* (1st ed., Vol. 123). Elsevier B.V., p.663-670. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-53488-0.00032-8>

- [53] Wild, T. F. (2009). Henipaviruses: A new family of emerging Paramyxoviruses. *Pathologie Biologie*, 57, p.188-196. <http://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.04.006>
- [54] Drexler, J. F., Corman, V. M., Müller, M. A., Maganga, G. D., Vallo, P., Binger, T., ... Drosten, C. (2012). Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nature Communications*, 3, 796. <http://doi.org/10.1038/ncomms1796>
- [55] Hagmaier, K., Stock, N., Precious, B., Childs, K., Wang, L., Goodbourn, S., & Randall, R. E. (2007). Mapuera virus, a rubulavirus that inhibits interferon signalling in a wide variety of mammalian cells without degrading STATs. *Journal of General Virology*, 88, p.956-966. <http://doi.org/10.1099/vir.0.82579-0>
- [56] Wang, L. F., Hansson, E., Yu, M., Chua, K. B., Mathe, N., Cramer, G., ... Eaton, B. T. (2007). Full-length genome sequence and genetic relationship of two paramyxoviruses isolated from bat and pigs in the Americas. *Arch Virol*, 152(7), p.1259-1271. <http://doi.org/10.1007/s00705-007-0959-4>
- [57] Organización Panamericana de la Salud, Comisión Nacional de Zoonosis. Guía práctica de hidiatidosis y zoonosis desatendidas. Disponible en: [http://www.zoonosis.gub.uy/webzoonosis/materiales/pdf/guia\\_practica\\_zoonosis.pdf](http://www.zoonosis.gub.uy/webzoonosis/materiales/pdf/guia_practica_zoonosis.pdf)
- [58] Guarino, H., Castilho, J. G., Souto, J., Oliveira, R. D. N., Carrieri, M. L., & Kotait, I. (2013). Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Uruguay. *Virus Research*, 173(2), 415–420. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.013>
- [59] Botto Nuñez, Germán. Detección de anticuerpos antirrábicos en quirópteros del Uruguay: un aspecto para la Vigilancia Epidemiológica de Rabia Silvestre. Tesina de grado, Facultad de Ciencias, UdelaR.
- [60] Página Web Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. República Oriental del Uruguay, 2017. <http://www.mgap.gub.uy/noticias-area-tematica/ganaderia?page=2>
- [61] Bordignon, J., Brasil-Dos-Anjos, G., Bueno, C. R., Salvatiera-Oporto, J., Dávila, a M. R., Grisard, E. C., & Zanetti, C. R. (2005). Detection and characterization of rabies virus in Southern Brazil by PCR amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. *Archives of Virology*, 150(4), 695–708. <http://doi.org/10.1007/s00705-004-0448-y>
- [62] Beltran, F. J., Dohmen, F. G., Del Pietro, H., & Cisterna, D. M. (2014). Diagnosis and molecular typing of rabies virus in samples stored in inadequate conditions. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(8), 1016–21. <http://doi.org/10.3855/jidc.4136>
- [63] Heaton, P. R., Johnstone, P., McElhinney, L. M., Cowley, R., O'Sullivan, E., & Whitby, J. E. (1997). Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2762–2766.
- [64] Tong, S., Chern, S. W. W., Li, Y., Pallansch, M. A., & Anderson, L. J. (2008). Sensitive and Broadly Reactive Reverse Transcription-PCR Assays To Detect Novel Paramyxoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8), 2652–2658. <http://doi.org/10.1128/JCM.00192-08>

- [65] BLAST - Basic Local Alignment Search Tool: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine.
- [66] GenBank®: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine.
- [67] Grupo de Investigación de los Murciélagos (2006) Boletín Electrónico. Año 1. Número 2. Mayo 2006. [www.mec.gub.uy/munhina/pdf/boletinGIM\\_2.pdf](http://www.mec.gub.uy/munhina/pdf/boletinGIM_2.pdf)
- [68] Klug, B. J., Turmelle, A. S., Ellison, J. A., Erin, F. B, Barclay, R. M. R. (2011). Rabies Prevalence in Migratory Tree-Bats in Alberta and the Influence of Roosting Ecology and Sampling Method on Reported Prevalences of Rabies in Bats. *Journal of Wildlife Diseases*, 47(1), p 64-77. DOI: <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-47.1.64>
- [69] Piñero C, Gury Dohmen F, Beltran F, Martinez L, Novaro L, et al. (2012) High Diversity of Rabies Viruses Associated with Insectivorous Bats in Argentina: Presence of Several Independent Enzootics. *PLoS Negl Trop Dis* 6(5): e1635. doi:10.1371/journal.pntd.0001635
- [70] Guarino, H., Rodriguez, S., Willat, G., Botto, G., Favi, M., Koitait, I. (2008) Surveillance of enzootic rabies in non-hematophagous bat population in Montevideo, Uruguay. RITA XIX. International Conference on Rabies in the Americas. Atlanta, GA 2008. Abstracts book. p 108.
- [71] Echevarría, J. E., Avellón, A., Juste, J., Vera, M., Ibáñez, C. (2001) Screening of Active Lyssavirus Infection in Wild Bat Populations by Viral RNA Detection on Oropharyngeal Swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), p. 3678–3683. <http://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3678>

## ◆ AGRADECIMIENTOS

*Dras. Sandra Frabasile y Adriana Delfraro*

A mis tutoras, gracias por darme la oportunidad de iniciarme en este camino y de creer que era posible. Gracias por la confianza, el apoyo y el ánimo que permitieron el desarrollo de este proyecto, y que aportaron a mi formación como persona y profesional.

*Dr. Juan Arbiza*

Gracias por permitirme transcurrir esta etapa en el Laboratorio y formar parte de un equipo de científicos y seres humanos de gran valor.

*Lic. Germán Botto y Dra. Helena Guarino*

Gracias por sus contribuciones invaluable a este trabajo, sin ellas no hubiera sido posible.

*Dr. Santiago Mirazo y Lic. Natalia Ramos*

Gracias por estar siempre dispuestos, por su ayuda y buenos aportes.

*MSc. Andrés Cabrera*

Gracias por aceptar el desafío de orientarnos en nuestros primeros pasos por el Laboratorio, y por ser el guía inicial de esta aventura. Gracias por tus consejos.

*A todos los compañeros del Laboratorio de Virología*

Gracias por el lindo ambiente, las ayudas desinteresadas y los tiempos compartidos; sin ello este trabajo hubiese sido menos rico y entretenido.

*Darío, Romi y Flo*

Gracias por hacer de esta etapa algo divertido, por las jornadas de risas y alegrías y hacer fácil lo difícil. Gracias por el humor multicolor de Boloneno, Ottonzoña y Porlkestein, y sus mil variantes siempre auténticas. Gracias por la complicidad y por estar siempre ahí. Gracias por estos VLPs tan lindos, me hacen bien.

*Paty*

Amiga, gracias por ser mi compañera de ruta todos estos años. Gracias por esas jornadas de estudio con días interminables y noches largas, que se volvieron amistad. Gracias por compartir las alegrías que nos regaló la carrera, pero por sobre todo, gracias por estar ahí en los momentos que nos costó afrontar.

*A mis amigos*

Gracias por acompañarme en este camino, deseando e imaginando este día tanto como yo. Gracias por bancarme en las mil y una vez que les dije que no y las otras tantas que dejé que la Facultad se interpusiera entre nosotros. Gracias por poner el alma para escucharme, contenerme y reír conmigo. Gracias por siempre encontrar en Uds. una sonrisa cómplice, una mano tendida y un abrazo apretado. Gracias por compartir nuestros logros. Soy feliz de tenerlos.

*A mi familia*

Gracias infinitas. Gracias por confiar y creer en mí, incluso cuando yo menos lo hacía. Gracias por hacerme ver que iba a lograrlo y no dejarme bajar los brazos. Gracias por anhelar este día y celebrarlo como propio. Gracias por ser los promotores de mis sueños e inculcarme siempre a ir tras lo que me hace feliz. Gracias por estar conmigo en cada paso, combatiendo mis temores y compartiendo mis risas. Gracias por darlo todo para que pudiera dedicarme a lo que elegí. Son mi pilar fundamental, mi sostén y mi referente. Como decimos siempre “lo que ha de ser, será”, y supo ser. Los amo.

## **ANEXO**

◆ <b>Tabla 1A.</b> Virus encontrados en murciélagos.....	50
◆ <b>Tabla 2A.</b> Taxonomía de la familia <i>Rhabdoviridae</i> .....	55
◆ <b>Tabla 3A.</b> Especies de murciélagos positivas para rabia en América Latina y el Caribe.....	58
◆ <b>Tabla 4A.</b> Taxonomía de las familias <i>Paramyxoviridae</i> y <i>Pneumoviridae</i> .....	61

**Tabla 1A.** Virus encontrados en murciélagos

Familia Viral	Género	Virus	Origen	
<b>Adenoviridae</b>	<i>Mastadenovirus</i>	Ryukyu	Ryukyu flying-fox ( <i>Pteropus dasymallus yayeyamae</i> )	
		Bat adenovirus 2	Common pipistrelle ( <i>Pipistrellus pipistrellus</i> )	
		BtAdV 4	Leschenault's rousette ( <i>Rousettus leschenaultii</i> )	
<b>Arenaviridae</b>	<i>Arenavirus</i>	Tacaribe	Jamaican fruit-eating bat ( <i>Artibeus jamaicensis</i> )	
<b>Astroviridae</b>	<i>Mamastrovirus</i>	Many	Numerous genera and species	
<b>Bornaviridae</b>	<i>Género sin nombre</i>	Bat bornavirus b1	Common pipistrelle ( <i>P. pipistrellus</i> )	
<b>Bunyaviridae</b>	<i>Orthobunyavirus</i>	Catu	Thomas's mastiff bat ( <i>Molossus currentium</i> )	
		Guama	Unidentified bat	
		Nepuyo	Jamaican fruit-eating bat ( <i>A. jamaicensis</i> )	
		Mojui dos Campos	Unidentified bat	
		Kaeng khoi	Wrinkled-lipped free-tailed bat ( <i>Chaerephon plicatus</i> )	
		<i>Hantavirus</i>	Araraquara	Tailed tailless bat ( <i>Anoura caudifer</i> ) Hairy-legged vampire bat ( <i>Diphylla ecaudata</i> )
			Hantaan	Common serotine ( <i>Eptesicus serotinus</i> )
			Huangpi	Japanese pipistrelle ( <i>Pipistrellus abramus</i> )
			Longquan	Horseshoe bats ( <i>Rhinolophus affinis</i> , <i>Rhinolophus sinicus</i> , <i>Rhinolophus monoceros</i> )
			Magboi	Hairy slit-faced bat ( <i>Nycteris hispida</i> )
	Mouyassué		Banana pipistrelle ( <i>Neoromicia nanus</i> )	
	Xuan son		Pomona leaf-nosed bat ( <i>Hipposideros pomona</i> )	
	<i>Phlebovirus</i>		Rift Valley fever	Peters's lesser epauletted fruit bat ( <i>Micropteropus pusillus</i> )
			Toscana	Kuhl's pipistrelle ( <i>Pipistrellus kuhlii</i> )
			Malsoor	Leschenault's rousette ( <i>R. leschenaultii</i> )
	<i>Nairovirus</i>	Ahun	Whiskered myotis ( <i>Myotis mystacinus</i> )	
		Gossas	Free-tailed bat ( <i>Tadarida</i> sp.)	
		Keterah	Lesser Asiatic yellow house bat ( <i>Scotophilus kuhlii</i> )	
		Issyk-kul	Common noctule ( <i>Nyctalus noctula</i> )	

**Tabla 1A.** Virus encontrados en murciélagos (cont.)

<b>Familia Viral</b>	<b>Género</b>	<b>Virus</b>	<b>Origen</b>	
<b>Flaviviridae</b>	<i>Flavivirus</i>	Phnom-Penh bat	Lesser short-nosed fruit bat ( <i>C. brachyotis</i> )	
		Rio bravo	Mexican free-tailed bat ( <i>T. brasiliensis mexicana</i> )	
		Saboya	Gambian slit-faced bat ( <i>Nycteris gambiensis</i> )	
		St. Louis encephalitis	Mexican free-tailed bat ( <i>T. brasiliensis mexicana</i> )	
		Sokuluk	Common pipistrelle ( <i>P. pipistrellus</i> )	
		Tamana bat	Common mustached bat ( <i>Pteronotus parnellii</i> )	
		Usutu	Common pipistrelle ( <i>P. pipistrellus</i> )	
		West Nile	Big brown bat ( <i>Eptesicus fuscus</i> )	
		Yellow fever	Little epauletted fruit bat ( <i>Epomophorus labiatus</i> )	
		Yokose	Schreibers's long-fingered bat ( <i>Miniopterus schreibersii fuliginosus</i> )	
		<i>Hepacivirus</i>	Hepatitis C (clado A)	Striped leaf-nosed bat ( <i>Hipposideros vittatus</i> )
			Hepatitis C (clado C)	Large-eared giant mastiff bat ( <i>Otomops martiensseni</i> )
			Hepatitis C (clado D)	Striped leaf-nosed bat ( <i>H. vittatus</i> )
<i>Pegivirus</i>	Gbv-d	Indian flying-fox ( <i>Pteropus giganteus</i> )		
	Pegivirus clados G, H, K	Numerous		
<i>Pestivirus</i>	Ra pestivirus 1	Intermediate horseshoe bat ( <i>R. affinis</i> )		
<b>Hepadnaviridae</b>	<i>Orthohepadnavirus</i>	Sin Nombre	Schreibers's long-fingered bat ( <i>M. schreibersii fuliginosus</i> )	
		Hepatitis B	Common tent-making bat ( <i>Uroderma bilobatum</i> )	
		Hepatitis B	Noack's leaf-nosed bat ( <i>Hipposideros cf. ruber</i> )	
		Hepatitis B	Halcyon horseshoe bat ( <i>Rhinolophus alcyone</i> )	
		Kolente Roundleaf bat (Hipposideros sp.)	Roundleaf bat (Hipposideros sp.)	
<b>Hepeviridae</b>	<i>Género sin nombre</i>	Hepatitis E virus-like	Bechstein's myotis ( <i>Myotis bechsteinii</i> )	

**Tabla 1A.** Virus encontrados en murciélagos (cont.)

<b>Familia Viral</b>	<b>Género</b>	<b>Virus</b>	<b>Origen</b>	
<b>Herpesviridae</b>	<i>(Alpha-herpesvirinae) Simplexvirus</i>	Parixa	Thomas's nectar bat ( <i>Lonchophylla thomasi</i> )	
	<i>(Beta-herpesvirinae) género sin nombre</i>	Agua preta	Gray short-tailed bat ( <i>Carollia subrufa</i> )	
	<i>Cytomegalovirus</i>	'A cytomegalovirus'	Little brown myotis ( <i>M. lucifugus</i> )	
	<i>(Gammaherpesvirinae) Percavirus, Rhadinovirus, Macavirus</i>	Many	Bats of different species	
<b>Nodaviridae</b>	<i>Nodavirus</i>	Sers nodavirus	Common serotine ( <i>E. serotinus</i> )	
<b>Orthomyxoviridae</b>	<i>Influenzavirus A</i>	Influenza virus A (H17N10)	Little yellow-shouldered bat ( <i>Sturnira lilium</i> )	
		Influenza virus A	Spix's artibeus ( <i>Artibeus planirostris</i> )	
<b>Papillomaviridae</b>	<i>Omegapapillomavirus</i>	MRPV-1	Rickett's big-footed bat ( <i>Myotis ricketti</i> )	
	¿Género nuevo?	MSPV-1	Schreibers's long-fingered bat ( <i>M. schreibersii</i> )	
<b>Paramyxoviridae</b>	<i>Morbillivirus</i>	Canine distemper-like	Common vampire bat ( <i>Desmodus rotundus</i> )	
		<i>Henipavirus</i>	Hendra	Gray-headed flying-fox ( <i>Pteropus poliocephalus</i> )
	<i>Rubulavirus</i>	Nipah	Variable flying-fox ( <i>Pteropus hypomelanus</i> )	
		Cedar	Black flying-fox ( <i>Pteropus alecto</i> )	
		Achimota virus 1	African straw-coloured fruit bat ( <i>Eidolon helvum</i> )	
		Mapuera	Little yellow-shouldered bat ( <i>S. lilium</i> )	
		Menangle	Black flying-fox ( <i>P. alecto</i> )	
		Mumps	Epauletted fruit bat ( <i>Epomophorus</i> sp.)	
		Sosuga	Egyptian rousette ( <i>R. aegyptiacus</i> )	
		Tioman	Variable flying-fox ( <i>P. hypomelanus</i> )	
		Tuhokovirus 1	Leschenault's rousette ( <i>R. leschenaultii</i> )	
		Tuhokovirus 2	Leschenault's rousette ( <i>R. leschenaultii</i> )	
		Tuhokovirus 3	Leschenault's rousette ( <i>R. leschenaultii</i> )	
		<i>Pneumovirus</i>	Unnamed	African straw-coloured fruit bat ( <i>E. helvum</i> )
		<i>Sin Asignar</i>	'A paramyxovirus'	Leschenault's rousette ( <i>R. leschenaultii</i> )
<b>Parvoviridae</b>	<i>Dependovirus</i>	BtAAV-YNM	Rickett's big-footed bat ( <i>M. ricketti</i> )	
	<i>Bocavirus</i>	MmBoV-1	Mouse-eared myotis ( <i>Myotis myotis</i> )	
	Sin nombre tipo PARV4	Eh-BtPV-1	African straw-coloured fruit bat ( <i>E. helvum</i> )	

**Tabla 1A.** Virus encontrados en murciélagos (cont.)

Familia Viral	Género	Virus	Origen
<i>Parvoviridae</i>	Sin determinar	Aj-BtPV-1	Jamaican fruit-eating bat ( <i>A. jamaicensis</i> )
<i>Picobirnaviridae</i>	<i>Picobirnavirus</i>	Sin nombre	Common pipistrelle ( <i>P. pipistrellus</i> )
<i>Picornaviridae</i>	<i>Kobuvirus</i>	<i>E. helvum</i> kobuvirus	African straw-coloured fruit bat ( <i>E. helvum</i> )
	<i>Sin Clasificar</i>	C16A	Multiple bat sources
		Ms picornavirus 1	Schreibers's long-fingered bat ( <i>M. schreibersii</i> )
		la io picornavirus 1	Great evening bat ( <i>la io</i> )
		Ra picornavirus 1	Intermediate horseshoe bat ( <i>R. affinis</i> )
<i>Polyomaviridae</i>	<i>Sin determinar</i>	Juruaca 'A polyomavirus'	Undetermined bat Little brown myotis ( <i>M. lucifugus</i> )
<i>Poxviridae</i>	Chordopoxvirinae ( <i>Molluscipoxvirus</i> )	Molluscum contagiosum-like	African straw-coloured fruit bat ( <i>E. helvum</i> )
	Chirotopoxvirinae	Eptesipox	Big brown bat ( <i>E. fuscus</i> )
<i>Reoviridae</i>	<i>Orbivirus</i>	Fomede	Dwarf slit-faced bat ( <i>Nycteris nana</i> )
		Ife	African straw-coloured fruit bat ( <i>E. helvum</i> )
	<i>Orthoreovirus</i>	Japanaut	Southern blossom bat ( <i>Syconycteris australis crassa</i> )
		Broome	Little red flying-fox ( <i>Pteropus scapulatus</i> )
		Nelson bay	Gray-headed flying-fox ( <i>P. poliocephalus</i> )
		Pulau	Variable flying-fox ( <i>P. hypomelanus</i> )
		Xi river	Leschenault's rousette ( <i>R. leschenaultii</i> )
	<i>Rotavirus</i>	Bat/KE4852/07	African straw-coloured fruit bat ( <i>E. helvum</i> )
		Maule	Whiskered myotis ( <i>M. mystacinus</i> )
		RVA/Bat-tc/MYAS33	Stoliczka's Asian trident bat ( <i>Aselliscus stoliczkanus</i> )
<i>Retroviridae</i>	<i>Betaretrovirus</i>	Endogenous	Bats of different species (from genome databases)
	<i>Spumavirus</i>	RaFV-1	Intermediate horseshoe bat ( <i>R. affinis</i> )
	<i>Gammaretrovirus</i>	Sers gammaretrovirus	Common serotine ( <i>E. serotinus</i> )
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	Rabies	Common vampire bat ( <i>D. rotundus</i> )
		Lagos bat	African straw-coloured fruit bat ( <i>E. helvum</i> )
		Duvenhage	Schreibers's long-fingered bat ( <i>M. schreibersii</i> )

**Tabla 1A.** Virus encontrados en murciélagos (cont.)

<b>Familia Viral</b>	<b>Género</b>	<b>Virus</b>	<b>Origen</b>	
<b>Rhabdoviridae</b>	<i>Lyssavirus</i>	European bat lyssavirus 1	Common serotine ( <i>E. serotinus</i> )	
		European bat lyssavirus 2	Daubenton's bat ( <i>Myotis daubentonii</i> )	
		Aravan	Lesser mouse-eared bat ( <i>Myotis blythii</i> )	
		Australian bat lyssavirus	Black flying-fox ( <i>P. alecto</i> )	
		Khujand	Whiskered myotis ( <i>M. mystacinus</i> )	
		Irkut	Greater tube-nosed bat ( <i>Murina leucogaster</i> )	
		West Caucasian bat	Schreibers's long-fingered bat ( <i>M. schreibersii</i> )	
		Bokeloh virus	Natterer's myotis ( <i>Myotis nattereri</i> )	
		Shimoni bat	Commerson's leaf-nosed bat ( <i>Hipposideros commersoni</i> )	
		Lleida bat lyssavirus	Schreibers's long-fingered bat ( <i>M. schreibersii</i> )	
		<i>Vesiculovirus</i>	American bat vesiculovirus	Big brown bat ( <i>E. fuscus</i> )
		<i>Sin Asignar</i>	Fikirini	Striped leaf-nosed bat ( <i>H. vittatus</i> )
			Kern canyon	Yuma myotis ( <i>Myotis yumanensis</i> )
			Mount Elgon bat	Eloquent horseshoe bat ( <i>Rhinolophus eloquens</i> )
			Oita 296	Little Japanese horseshoe bat ( <i>Rhinolophus cornutus</i> )
<b>Togaviridae</b>	<i>Alphavirus</i>	Chikungunya	Unidentified bat	
		Sindbis	Pool of roundleaf bat ( <i>Hipposideros</i> sp.) and horseshoe bat ( <i>Rhinolophus</i> sp.)	
		Cabassou (VEE V)	Unidentified bat	
		Venezuelan equine encephalitis (VEE) IA-B	Common vampire bat ( <i>D. rotundus</i> )	
		VEE (IE)	Common tent-making bat ( <i>U. bilobatum</i> )	
		VEE (IF)	Seba's short-tailed bat ( <i>Carollia perspicillata</i> )	
<b>Totiviridae</b>	<i>Totivirus</i>	Tianjin totivirus	Faeces from unidentified bats	

Extraído y modificado de: Moratelli et al, 2015.

**Tabla 2A.** Taxonomía de la Familia *Rhabdoviridae*.

Género	Especie	Virus	
<b>Almendravirus</b>	<i>Arboretum almindravirus</i>	Arboretum virus (ABTV)	
	<i>Balsa almindravirus</i>	Balsa virus (BALV)	
	<i>Coot Bay almindravirus</i>	Coot Bay virus (CBV)	
	<i>Puerto Almendras almindravirus*</i>	Puerto Almendras virus (PTAMV)	
	<i>Rio Chico almindravirus</i>	Rio Chico virus (RCHV)	
<b>Curiovirus</b>	<i>Curionopolis curiovirus*</i>	Curionopolis virus (CURV)	
	<i>Iriri curiovirus</i>	Iriri virus (IRIRV)	
	<i>Itacaiunas curiovirus</i>	Itacaiunas virus (ITAV)	
	<i>Rochambeau curiovirus</i>	Rochambeau virus (RBUV)	
<b>Cytorhabdovirus</b>	<i>Alfalfa dwarf cytorhabdovirus</i>	alfalfa dwarf virus (ADV)	
	<i>Barley yellow striate mosaic cytorhabdovirus</i>	barley yellow striate mosaic virus (BYSMV)	
	<i>Broccoli necrotic yellows cytorhabdovirus</i>	broccoli necrotic yellows virus (BNYV)	
	<i>Colocasia bobone disease-associated cytorhabdovirus</i>	Colocasia bobone disease-associated virus (CBDaV)	
	<i>Festuca leaf streak cytorhabdovirus</i>	festuca leaf streak virus (FLSV)	
	<i>Lettuce necrotic yellows cytorhabdovirus*</i>	lettuce necrotic yellows virus (LNYV)	
	<i>Lettuce yellow mottle cytorhabdovirus</i>	lettuce yellow mottle virus (LYMoV)	
	<i>Northern cereal mosaic cytorhabdovirus</i>	northern cereal mosaic virus (NCMV)	
	<i>Sonchus cytorhabdovirus 1</i>	sonchus virus (SonV)	
<i>Strawberry crinkle cytorhabdovirus</i>	strawberry crinkle virus (SCV)		
	<i>Strawberry crinkle cytorhabdovirus</i>	strawberry crinkle virus (SCV)	
<b>Dichorhavirus</b>	<i>Coffee ringspot dichorhavirus</i>	coffee ringspot virus (CoRSV)	
	<i>Orchid fleck dichorhavirus*</i>	orchid fleck virus (OFV) <sub>9</sub>	
<b>Ephemerovirus</b>	<i>Adelaide River ephemerovirus</i>	Adelaide River virus (ARV)	
	<i>Berrimah ephemerovirus</i>	Berrimah virus (BRMV)	
	<i>Bovine fever ephemerovirus*</i>	bovine ephemeral fever virus (BEFV) <sup>10</sup>	
	<i>Kimberley ephemerovirus</i>	Kimberley virus (KIMV)	
		<i>Malakal virus (MALV)</i>	
		<i>Koolpinyah ephemerovirus</i>	Koolpinyah virus (KOOLV)
		<i>Kotonkan ephemerovirus</i>	kotonkan virus (KOTV)
		<i>Obodhiang ephemerovirus</i>	Obodhiang virus (OBOV)
	<i>Yata ephemerovirus</i>	Yata virus (YATV)	
<b>Hapavirus</b>	<i>Flanders hapavirus</i>	Flanders virus (FLAV)	
	<i>Hart Park hapavirus</i>	Hart Park virus (HPV)	
	<i>Gray Lodge hapavirus</i>	Gray Lodge virus (GLOV)	
	<i>Joinjakaka hapavirus</i>	Joinjakaka virus (JOIV)	
	<i>La Joya hapavirus</i>	La Joya virus (LJV)	
	<i>Kamese hapavirus</i>	Kamese virus (KAMV)	
	<i>Landjia hapavirus</i>	Landjia virus (LANV = LJAV)	
	<i>Manitoba hapavirus</i>	Marco hapavirus Marco virus (MCOV)	
	<i>Mosqueiro hapavirus</i>	Mosqueiro virus (MQOV)	
	<i>Mossuril hapavirus</i>	Mossuril virus (MOSV)	
	<i>Ngaingan hapavirus</i>	Ngaingan virus (NGAV)	
	<i>Ord River hapavirus</i>	Ord River virus (ORV)	
	<i>Parry Creek hapavirus</i>	Parry Creek virus (PCV)	
	<i>Wongabel hapavirus*</i>	Wongabel virus (WONV)	
<b>Ledantevirus</b>	<i>Barur ledantevirus</i>	Barur virus (BARV)	
	<i>Fikirini ledantevirus</i>	Fikirini virus (FKRV)	
	<i>Fukuoka ledantevirus</i>	Fukuoka virus (FUKV)	
	<i>Kern Canyon ledantevirus</i>	Kern Canyon virus (KCV)	
	<i>Keuraliba ledantevirus</i>	Keuraliba virus (KEUV)	
	<i>Kolente ledantevirus</i>	Kolente virus (KOLEV)	
	<i>Kumasi ledantevirus</i>	Kumasi rhabdovirus (KRV)	
	<i>Le Dantec ledantevirus*</i>	Le Dantec virus (LDV)	
	<i>Mount Elgon bat ledantevirus</i>	Mount Elgon bat virus (MEBV)	
	<i>Nkolbisson ledantevirus</i>	Nkolbisson virus (NKOV)	
	<i>Nishimuro ledantevirus</i>	Nishimuro virus (NISV) <sup>11</sup>	
	<i>Oita ledantevirus</i>	Oita virus (OITAV)	
	<i>Wuhan ledantevirus</i>	Wuhan louse fly virus 5 (WLFV-5)	
	<i>Yongjia ledantevirus</i>	Yongjia tick virus 2 (YTV-2)	

**Tabla 2A.** Taxonomía de la Familia *Rhabdoviridae*. (cont.)

Género	Especie	Virus
<b>Lyssavirus</b>	<i>Aravan lyssavirus</i>	Aravan virus (ARAV)
	<i>Australian bat lyssavirus</i>	Australian bat lyssavirus (ABLV)
	<i>Bokeloh bat lyssavirus</i>	Bokeloh bat lyssavirus (BBLV)
	<i>Duvenhage lyssavirus</i>	Duvenhage virus (DUVV)
	<i>European bat 1 lyssavirus</i>	European bat lyssavirus 1 (EBLV-1)
	<i>European bat 2 lyssavirus</i>	European bat lyssavirus 2 (EBLV-2)
	<i>Ikoma lyssavirus</i>	Ikoma lyssavirus (IKOV)
	<i>Irkut lyssavirus</i>	Irkut virus (IRKV)
	<i>Khujand lyssavirus</i>	Khujand virus (KHUV)
	<i>Lagos bat lyssavirus</i>	Lagos bat virus (LBV)
	<i>Mokola lyssavirus</i>	Mokola virus (MOKV)
	<i>Rabies lyssavirus</i>	rabies virus (RABV)
	<i>Shimoni bat lyssavirus</i>	Shimoni bat virus (SHIBV)
<i>West Caucasian bat lyssavirus</i>	West Caucasian bat virus (WCBV)	
<b>Novirhabdovirus</b>	<i>Hirame novirhabdovirus</i>	Hirame rhabdovirus (HIRV)
	<i>Piscine novirhabdovirus</i>	viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)
	<i>Salmonid novirhabdovirus</i>	infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)
	<i>Snakehead novirhabdovirus</i>	snakehead rhabdovirus (SHRV)
<b>Nucleorhabdovirus</b>	<i>Datura yellow vein nucleorhabdovirus</i>	datura yellow vein virus (DYVV)
	<i>Eggplant mottled dwarf nucleorhabdovirus</i>	eggplant mottled dwarf virus (EMDV)
	<i>Maize fine streak nucleorhabdovirus</i>	maize fine streak virus (MSFV)
	<i>Maize Iranian mosaic nucleorhabdovirus</i>	maize Iranian mosaic virus (MIMV)
	<i>Maize mosaic nucleorhabdovirus</i>	maize mosaic virus (MMV)
	<i>Potato yellow dwarf nucleorhabdovirus</i>	potato yellow dwarf virus (PYDV)
	<i>Rice yellow stunt nucleorhabdovirus</i>	rice yellow stunt virus (RYSV)
		rice transitory yellowing virus (RTYV)
	<i>Sonchus yellow net nucleorhabdovirus</i>	sonchus yellow net virus (SYNV)
	<i>Sowthistle yellow vein nucleorhabdovirus</i>	sowthistle yellow vein virus (SYVV)
<i>Taro vein chlorosis nucleorhabdovirus</i>	taro vein chlorosis virus (TaVCV)	
<b>Perhabdovirus</b>	<i>Anguillid perhabdovirus</i>	eel virus European X (EVEX)
	<i>Perch perhabdovirus</i>	perch rhabdovirus (PRV)
	<i>Sea trout perhabdovirus</i>	lake trout rhabdovirus (LTRV)
<b>Sigmavirus</b>	<i>Drosophila affinis sigmavirus</i>	<i>Drosophila affinis</i> sigmavirus (DAffSV)
	<i>Drosophila ananassae sigmavirus</i>	<i>Drosophila ananassae</i> sigmavirus (DAnaSV)
	<i>Drosophila immigrans sigmavirus</i>	<i>Drosophila immigrans</i> sigmavirus (DIImmSV)
	<i>Drosophila melanogaster sigmavirus</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> sigmavirus (DMelSV)
	<i>Drosophila obscura sigmavirus</i>	<i>Drosophila obscura</i> sigmavirus (DObsSV)
	<i>Drosophila tristis sigmavirus</i>	<i>Drosophila tristis</i> sigmavirus (DTrisSV)
	<i>Muscina stabulans sigmavirus</i>	<i>Muscina stabulans</i> sigmavirus (MStaSV)
<b>Sprivirus</b>	<i>Carp sprivirus</i>	spring viremia of carp virus (SVCV)
	<i>Pike fry sprivirus</i>	grass carp rhabdovirus (GrCRV)
		pike fry rhabdovirus (PFRV)
		tench rhabdovirus (TenRV)
<b>Sripuvirus</b>	<i>Almpiwar sripuvirus</i>	Almpiwar virus (ALMV)
	<i>Chaco sripuvirus</i>	Chaco virus (CHOV)
	<i>Niakha sripuvirus</i>	Niakha virus (NIAV)
	<i>Sena Madueira sripuvirus</i>	Sena Madueira virus (SMV)
	<i>Sripur sripuvirus</i>	Sripur virus (SRIV)
<b>Tibrovirus</b>	<i>Bas-Congo tibrovirus</i>	Bas-Congo virus (BASV)
	<i>Coastal Plains tibrovirus</i>	Coastal Plains virus (CPV)
	<i>Ekpoma 1 tibrovirus</i>	Ekpoma virus 1 (EKV-1)
	<i>Ekpoma 2 tibrovirus</i>	Ekpoma virus 2 (EKV-2)
	<i>Sweetwater Branch tibrovirus</i>	Sweetwater Branch virus (SWBV)
	<i>Tibrogargan tibrovirus</i>	Bivens Arm virus (BAV)
	Tibrogargan virus (TIBV)	
<b>Tupavirus</b>	<i>Durham tupavirus</i>	Durham virus (DURV)
	<i>Klamath tupavirus</i>	Klamath virus (KLAV)

**Tabla 2A.** Taxonomía de la Familia *Rhabdoviridae*. (cont.)

<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Virus</b>
<b><i>Tupavirus</i></b>	<i>Tupaia tupavirus</i>	tupaia virus (TUPV)
<b><i>Varicosavirus</i></b>	<i>Lettuce big-vein associated varicosavirus</i>	lettuce big-vein associated virus (LBVaV)
<b><i>Vesiculovirus</i></b>	<i>Alagoas vesiculovirus</i>	vesicular stomatitis Alagoas virus (VSAV)
	<i>American bat vesiculovirus</i>	American bat vesiculovirus (ABVV)
	<i>Carajas vesiculovirus</i>	Caraja's virus (CJSV)
	<i>Chandipura vesiculovirus</i>	Chandipura virus (CHPV)
	<i>Cocal vesiculovirus</i>	Cocal virus (COCV)
	<i>Indiana vesiculovirus</i>	vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV)
	<i>Isfahan vesiculovirus</i>	Isfahan virus (ISFV)
	<i>Jurona vesiculovirus</i>	Jurona virus (JURV)
	<i>Malpais Spring vesiculovirus</i>	Malpais Spring virus (MSPV)
	<i>Maraba vesiculovirus</i>	Maraba virus (MARAV)
	<i>Morreton vesiculovirus</i>	Morreton virus (MORV)
	<i>New Jersey vesiculovirus</i>	vesicular stomatitis New Jersey virus (VSNJV)
	<i>Perinet vesiculovirus</i>	Perinet virus (PERV)
	<i>Piry vesiculovirus</i>	Piry virus (PIRYV)
	<i>Radi vesiculovirus</i>	Radi virus (RADV)
	<i>Yug Bogdanovac vesiculovirus</i>	Yug Bogdanovac virus (YBV)
<b><i>Sin asignar</i></b>	<i>Moussa virus</i>	Moussa virus (MOUV)

Extraído de: Amarasinghe et al, 2017.

**Tabla 3A.** Especies de murciélagos positivas para rabia en América Latina y el Caribe.

Insectívoros	Frugívoros	Nectívoros	Omnívoros	Carnívoros	Hematófagos	AgV
<b>Argentina</b>						
<i>E. auripendulus</i>						
<i>E. patagonicus</i>						
<i>H. montanus</i>						
<i>Myotis sp</i>						V3
<i>M. nigricans</i>						V4
<i>T. brasiliensis</i>	<i>A. lituratus</i>				<i>D. rotundus</i>	V6
<i>E. furinalis</i>						E
<i>M. molossus</i>						H
<i>L. blossevillii</i>						M
<i>L. cinereus</i>						
<i>L. ega</i>						
<b>Belice</b>						
<i>M. fortidens</i>						
<i>M. nigricans</i>	<i>A. jamaicensis</i>		<i>P. discolor</i>		<i>D. rotundus</i>	-
<i>M. molossus</i>	<i>A. lituratus</i>					
<i>M. sinaloae</i>						
<b>Bolivia</b>						
	<i>A. jamaicensis</i>				<i>D. rotundus</i>	V3
	<i>A. lituratus</i>					V5
<b>Brasil</b>						
<i>C. abrasus</i>						
<i>C. planirostris</i>						
<i>E. diminutus</i>						
<i>E. furinalis</i>						
<i>E. brasiliensis</i>						
<i>E. glaucinus</i>						
<i>E. perotis</i>						
<i>E. auripendulus</i>						
<i>H. velatus</i>						
<i>L. blossevillii</i>						
<i>L. cinereus</i>	<i>A. jamaicensis</i>					V3
<i>L. ega</i>	<i>A. lituratus</i>					V4
<i>L. egregius</i>	<i>A. planirostris</i>					V5
<i>L. aurita</i>	<i>C. perspicillata</i>	<i>A. caudifer</i>	<i>P. hastatus</i>	<i>C. auritus</i>	<i>D. rotundus</i>	V6
<i>L. brasiliense</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>A. geoffroyi</i>		<i>T. cirrhosus</i>	<i>D. youngi</i>	E
<i>M. megalotis</i>	<i>S. lilium</i>	<i>G. soricina</i>			<i>D. ecaudata</i>	H
<i>M. molossus</i>	<i>U. bilobatum</i>					Eu
<i>M. neglectus</i>	<i>V. caraccioli</i>					N
<i>M. rufus</i>						Lb
<i>M. sinaloae</i>						
<i>M. albescens</i>						
<i>M. levis</i>						
<i>M. nigricans</i>						
<i>M. riparius</i>						
<i>N. laticaudatus</i>						
<i>N. macrotis</i>						
<i>P. nasutus</i>						
<i>T. brasiliensis</i>						
<b>Colombia</b>						
<i>E. brasiliensis</i>	<i>C. perspicillata</i>				<i>D. rotundus</i>	V3
<i>M. molossus</i>						V4
<b>Costa Rica</b>						
					<i>D. rotundus</i>	V3
<b>Cuba</b>						
<i>E. fuscus</i>						-
<i>E. glaucinus</i>						

**Tabla 3A.** Especies de murciélagos positivas para rabia en América Latina y el Caribe. (cont).

Insectívoros	Frugívoros	Nectívoros	Omnívoros	Carnívoros	Hematófagos	AgV
<b>Chile</b>						
<i>H. macrotus</i>						
<i>H. montanus</i>						M
<i>L. borealis</i>						V4
<i>L. cinereus</i>						V6
<i>M. chiloensis</i>						H
<i>T. brasiliensis</i>						
<b>Ecuador</b>						
					<i>D. rotundus</i>	V3
<b>El Salvador</b>						
					<i>D. rotundus</i>	-
<b>Guatemala</b>						
<i>M. sinaloae</i>					<i>D. rotundus</i>	-
<i>M. fortidens</i>						
<b>French Guyana</b>						
					<i>D. rotundus</i>	V3
<b>Honduras</b>						
<i>M. sinaloae</i>					<i>D. rotundus</i>	-
<b>México</b>						
<i>A. pallidus</i>						
<i>E. fuscus</i>						
<i>L. blossevillii</i>						
<i>L. cinereus</i>						
<i>L. ega</i>						
<i>L. intermedius</i>						
<i>L. seminolus</i>						
<i>M. waterhousii</i>						V3
<i>M. rufus</i>						V4
<i>M. megalophylla</i>	<i>A. jamaicensis</i>	<i>G. soricina</i>			<i>D. rotundus</i>	V5
<i>M. velifer</i>	<i>A. lituratus</i>	<i>L. nivalis</i>	<i>P. discolor</i>	<i>N. leporinus</i>	<i>D. youngi</i>	V6
<i>N. laticaudatus</i>	<i>C. subrufa</i>	<i>L. yerbabuenae</i>			<i>D. ecaudata</i>	V8
<i>N. macrotis</i>						V9
<i>P. personatus</i>						V11
<i>P. subflavus</i>						
<i>P. parnellii</i>						
<i>P. davyi</i>						
<i>R. párvula</i>						
<i>R. tumida</i>						
<i>T. brasiliensis</i>						
<b>Nicaragua</b>						
					<i>D. rotundus</i>	-
<b>Panamá</b>						
<i>C. planirostris</i>						
<i>M. megalotis</i>						
<i>M. coibensis</i>	<i>A. jamaicensis</i>				<i>Noctilio sp</i>	
<i>M. currentium</i>	<i>U. bilobatum</i>					
<i>M. molossus</i>						
<i>M. nigricans</i>						
<b>Paraguay</b>						
<i>L. ega</i>						V6
<i>T. brasiliensis</i>	<i>A. jamaicensis</i>				<i>D. rotundus</i>	V3
<b>Perú</b>						
	<i>Artibeus sp.</i>					
	<i>A. concolor</i>					
<i>M. nigricans</i>	<i>A. lituratus</i>			<i>P. hastatus</i>		
<i>M. megalotis</i>	<i>Carollia spp</i>	<i>G. soricina</i>		<i>P. elongatus</i>	<i>D. rotundus</i>	V3
<i>M. molossus</i>	<i>C. perspicillata</i>					
	<i>Platyrrhinus sp</i>					

**Tabla 3A.** Especies de murciélagos positivas para rabia en América Latina y el Caribe. (cont.)

Insectívoros	Frugívoros	Nectívoros	Omnívoros	Carnívoros	Hematófagos	AgV
	<i>P. lineatus</i> <i>Uroderma</i> sp.					
<b>Dominican Republic</b>						
	<i>T. brasiliensis</i>					-
<b>Trinidad y Tobago</b>						
<i>D. albus</i>	<i>A. jamaicensis</i>				<i>D. rotundus</i>	V3
<i>M. molossus</i>	<i>A. lituratus</i>					
<i>P. davyi</i>	<i>C. perspicillata</i>					
<i>P. parnellii</i>						
<b>Uruguay</b>						
<i>L. cinereus</i>						
<i>L. ega</i>						
<i>M. molossus</i>					<i>D. rotundus</i>	V3
<i>Myotis</i> spp.						V4
<i>T. brasiliensis</i>						
<b>Venezuela</b>						
<i>M. rufus</i>					<i>D. ecaudata</i>	M
					<i>D. rotundus</i>	V3
						V5

Extraído y modificado de: Escobar et al, 2015

**Tabla 4A.** Taxonomía de las Familias *Paramyxoviridae* y *Pneumoviridae*

Familia	Género	Especie	Virus	
<b><i>Paramyxoviridae</i></b>	<b><i>Aquaparamyxovirus</i></b>	<i>Salmon aquaparamyxovirus</i>	Atlantic salmon paramyxovirus (AsaPV)	
		<b><i>Avulavirus</i></b>	<i>Avian avulavirus 1</i>	avian paramyxovirus 1 (APMV-1)
			<i>Avian avulavirus 2</i>	avian paramyxovirus 2 (APMV-2)
			<i>Avian avulavirus 3</i>	avian paramyxovirus 3 (APMV-3)
			<i>Avian avulavirus 4</i>	avian paramyxovirus 4 (APMV-4)
			<i>Avian avulavirus 5</i>	avian paramyxovirus 5 (APMV-5)
			<i>Avian avulavirus 6</i>	avian paramyxovirus 6 (APMV-6)
			<i>Avian avulavirus 7</i>	avian paramyxovirus 7 (APMV-7)
			<i>Avian avulavirus 8</i>	avian paramyxovirus 8 (APMV-8)
			<i>Avian avulavirus 9</i>	avian paramyxovirus 9 (APMV-9)
			<i>Avian avulavirus 10</i>	avian paramyxovirus 10 (APMV-10)
			<i>Avian avulavirus 11</i>	avian paramyxovirus 11 (APMV-11)
			<i>Avian avulavirus 12</i>	avian paramyxovirus 12 (APMV-12)
		<i>Avian avulavirus 13</i>	avian paramyxovirus 13 (APMV-13)	
	<b><i>Ferlavirus</i></b>	<i>Reptilian ferlavirus</i>	Fer-de-Lance virus (FDLV)	
	<b><i>Henipavirus</i></b>	<i>Cedar henipavirus</i>	Cedar virus (CedV)	
		<i>Ghanaian bat henipavirus</i>	Kumasi virus (KV)	
		<i>Hendra henipavirus</i>	Hendra virus (HeV)	
		<i>Mojiang henipavirus</i>	Mójiāng virus (MojV)	
		<i>Nipah henipavirus</i>	Nipah virus (NiV)	
	<b><i>Morbillivirus</i></b>	<i>Canine morbillivirus</i>	canine distemper virus (CDV)	
		<i>Cetacean morbillivirus</i>	cetacean morbillivirus (CeMV)	
		<i>Feline morbillivirus</i>	feline morbillivirus (FeMV)	
		<i>Measles morbillivirus</i>	measles virus (MeV)	
		<i>Small ruminant morbillivirus</i>	peste-des-petits-ruminants virus (PPRV)	
		<i>Phocine morbillivirus</i>	phocine distemper virus (PDV)	
		<i>Rinderpest morbillivirus</i>	rinderpest virus (RPV)	
	<b><i>Respirovirus</i></b>	<i>Bovine respirovirus 3</i>	bovine parainfluenza virus 3 (BPIV-3)	
		<i>Human respirovirus 1</i>	human parainfluenza virus 1 (HPIV-1)	
		<i>Human respirovirus 3</i>	human parainfluenza virus 3 (HPIV-3)	
		<i>Porcine respirovirus 1</i>	porcine parainfluenza virus 1 (PPIV-1)	
		<i>Murine respirovirus</i>	Sendai virus (SeV)	
	<b><i>Rubulavirus</i></b>	<i>Achimota rubulavirus 1</i>	Achimota virus 1 (AchPV-1)	
		<i>Achimota rubulavirus 2</i>	Achimota virus 2 (AchPV-2)	
		<i>Bat mumps rubulavirus</i>	bat mumps virus (BMV)	
		<i>Canine rubulavirus</i>	parainfluenza virus 5 (PIV-5)	
		<i>Human rubulavirus 2</i>	human parainfluenza virus 2 (HPIV-2)	
		<i>Human rubulavirus 4</i>	human parainfluenza virus 4a (HPIV-4a) human parainfluenza virus 4b (HPIV-4b)	
		<i>Mapuera rubulavirus</i>	Mapuera virus (MapV)	
		<i>Menangle rubulavirus</i>	Menangle virus (MenPV)	
		<i>Mumps rubulavirus</i>	mumps virus (MuV)	
		<i>Porcine rubulavirus</i>	La Piedad Michoacán Mexico virus (LPMV)	
		<i>Simian rubulavirus</i>	simian virus 41 (SV-41)	
		<i>Sosuga rubulavirus</i>	Sosuga virus	
		<i>Teviot rubulavirus</i>	Teviot virus (TevPV)	
		<i>Tioman rubulavirus</i>	Tioman virus (TioPV)	
		<i>Tuhoko rubulavirus 1</i>	Tuhoko virus 1 (ThkPV-1)	
		<i>Tuhoko rubulavirus 2</i>	Tuhoko virus 2 (ThkPV-2)	
		<i>Tuhoko rubulavirus 3</i>	Tuhoko virus 3 (ThkPV-3)	
<b><i>Pneumoviridae</i></b>	<b><i>Metapneumovirus</i></b>	<i>Avian metapneumovirus</i>	avian metapneumovirus (AMPV)	
		<i>Human metapneumovirus</i>	human metapneumovirus (HMPV)	
	<b><i>Orthopneumovirus</i></b>	<i>Bovine orthopneumovirus</i>	bovine respiratory syncytial virus (BRSV)	
		<i>Human orthopneumovirus</i>	human respiratory syncytial virus A2 (HRSV-A2) human respiratory syncytial virus B1 (HRSV-B1)	
		<i>Murine orthopneumovirus</i>	murine pneumonia virus (MPV)	

Extraído de: Amarasinghe et al, 2017.

