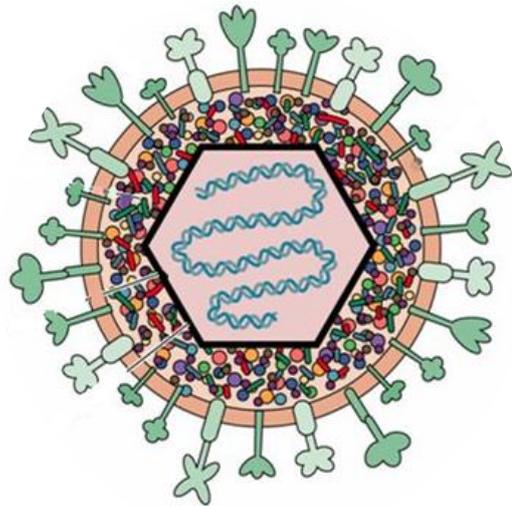


TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DetECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HERPESVIRUS EN
MURCIÉLAGOS DEL URUGUAY
COMO POTENCIALES
HOSPEDADORES VIRALES

Bach. Lucía Moreira Marrero



Orientadora: Dra. Sandra Frabasile
Co-orientadora: Dra. Adriana Delfraro

2019

*“La ciencia está hecha de errores,
pero son errores que son útiles cometer,
porque guían poco a poco a la virtud”*

Julio Verne

ÍNDICE

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | RESUMEN | 5 |
| 2 | INTRODUCCION | 6 |
| 2.1 | Murciélagos como hospedadores de virus | 6 |
| 2.1.1 | Orden Chiroptera | 7 |
| 2.1.2 | Características que hacen a los murciélagos buenos hospedadores | 9 |
| 2.1.3 | Respuesta inmune | 11 |
| 2.1.4 | Interfaz virus- murciélagos y humanos..... | 11 |
| 2.2 | Herpesvirus (HV)..... | 13 |
| 2.2.1 | ¿Por qué estudiar Herpesvirus en murciélagos? | 13 |
| 2.2.2 | Clasificación | 13 |
| 2.2.3 | Tropismo celular | 14 |
| 2.2.4 | Epidemiología | 15 |
| 2.2.5 | Características del virión y genoma | 15 |
| 2.2.6 | Propiedades biológicas..... | 17 |
| 2.2.7 | Ciclo biológico | 18 |
| 2.2.8 | Interacción y coevolución virus-hospedero | 21 |
| 2.2.9 | Antecedentes de Herpesvirus en murciélagos..... | 21 |
| 2.3 | Hipótesis..... | 22 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 23 |
| 4 | MATERIALES Y METODOS | 24 |
| 4.1 | Producción de control positivo | 24 |
| 4.1.1 | Cultivo celular e infección | 24 |
| 4.1.2 | Extracción de ADN total de infección en cultivo celular | 25 |
| 4.2 | Procesamiento de las muestras..... | 26 |
| 4.2.1 | Captura de ejemplares y toma de muestras de saliva..... | 26 |
| 4.2.2 | Extracción de material genómico de las muestras | 26 |
| 4.3 | Análisis moleculares | 27 |
| 4.3.1 | Puesto a punto para la amplificación del ADN viral control | 27 |
| 4.3.2 | Secuenciación de muestras positivas | 27 |
| 4.3.3 | Análisis de secuencias | 27 |
| 5 | RESULTADOS..... | 29 |
| 5.1 | Producción de control positivo en cultivo celular..... | 29 |
| 5.2 | Puesta a punto de PCR para la amplificación del ADN viral | 30 |
| 5.3 | Procesamiento de las muestras por PCR | 30 |
| 5.4 | Secuenciación | 32 |
| 5.5 | Análisis filogenéticos..... | 33 |
| 6 | DISCUSIÓN | 35 |
| 7 | CONCLUSIONES | 40 |
| 8 | PERSPECTIVAS A FUTURO..... | 41 |
| 9 | BIBLIOGRAFIA..... | 42 |
| 10 | ANEXO..... | 46 |
| 11 | AGRADECIMIENTOS..... | 51 |

ABREVIATURAS

| | | | |
|----------------|--------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico | L | Litro |
| ARN | Ácido ribonucleico | MEM | Medio mínimo esencial |
| AlfaHV | Alfaherpesvirus | µg | Microgramos |
| BetaHV | Betaherpesvirus | µL | Microlitros |
| CMV | Citomegalovirus | mM | Milimolar |
| Co-V | Coronavirus | MPM | Marcador de peso molecular |
| dNTPS | Desoxinucleótidos | nt | Nucleótidos |
| EBV | Epstein Barr Virus | ORF | Marco abierto de lectura |
| ECP | Efecto citopático | pb | pares de base |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetracético | PBS | Buffer fosfato salino |
| EtOH | Etanol | PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| GammaHV | Gammaherpesvirus | rpm | Revoluciones por minuto |
| HV | Herpesvirus | s | Segundo |
| HSV | Herpes Simplex Virus | SARS | Síndrome Respiratorio Agudo Severo |
| kb | kilobases | TAE | Tris Acetato EDTA |
| Km | Kilómetro | | |

1 RESUMEN

Los murciélagos (Orden Chiroptera) representan el 20% de los mamíferos, constituyendo el grupo más diverso y geográficamente disperso de mamíferos. En Uruguay se han identificado 22 especies pertenecientes al suborden Microchiroptera de las familias Vespertilionidae, Molossidae y Phyllostomidae, con tres tipos de dieta: insectívora, frugívora y hematófaga.

En las últimas décadas el contacto murciélago-humano ha aumentado, lo que trajo aparejado un incremento en el interés por la biología y la ecología de los murciélagos ya que los mismos han sido reconocidos como reservorios de algunas zoonosis virales asociadas a enfermedades infecciosas emergentes. Al momento, se conocen 50 familias virales capaces de infectar 75 géneros de murciélagos, con representantes de virus ADN como Adeno-, Papilloma- y Herpesviridae, virus ARN como Retro-, Toga-, Flavi-, y Picornaviridae, entre otros. Varios estudios de secuenciación de alto rendimiento para la identificación de virus, que incluyen virus de ADN, han reportado Herpesvirus de las subfamilias Alfa-, Beta-, y Gammaherpesvirinae en murciélagos insectívoros, frugívoros y hematófagos de varias especies.

El objetivo de este trabajo fue la detección y caracterización genética de Herpesvirus de la familia *Herpesviridae* mediante extracción de ácidos nucleicos totales, amplificación genómica por PCR anidada de una región conservada de la ADN polimerasa, secuenciación y análisis filogenético. La búsqueda de genomas de Herpesvirus se realizó sobre muestras de hisopados bucales de murciélagos provenientes de diferentes poblaciones uruguayas.

El 66% de los individuos analizados resultaron positivos y pertenecen a 8 especies: *Desmodus rotundus*, *Tadarida brasiliensis*, *Myotis spp*, *Eptesicus furinalis*, *Eptesicus diminutus*, *Molossops temminckii* y *Molossus (molossus y rufus)*. Las secuencias se compararon con Alfa-, Beta- y Gammaherpesvirus de murciélagos y otros vertebrados obtenidas de GenBank. El análisis mostró que el 43% pertenece a la subfamilia Gammaherpesvirinae y el 57 % a Betaherpesvirinae. A su vez, se pudieron identificar diferentes clados independientes dentro de cada subfamilia sugiriendo distintas variantes de Herpesvirus con divergencia variable (entre 70 y 80%) respecto a otros previamente descritos. Dentro de los Gammaherpesvirus identificados solamente los asociados a *D. rotundus* comparten 96,6% de identidad con HV-5v aislado de *P. giganteus*.

2 INTRODUCCION

2.1 Murciélagos como hospedadores de virus

En las últimas décadas el contacto murciélago-humano ha aumentado debido a los avances en la urbanización, obras de infraestructura, ganadería, expansión agropecuaria, eliminación de bosques por tala e inundación y por otras actividades humanas asociadas a uso y/o modificaciones de los ambientes naturales. Esto ha traído aparejado un aumento en el interés por la biología y la ecología de los murciélagos ya que los mismos han sido reconocidos como reservorios de algunas zoonosis virales asociadas a enfermedades infecciosas emergentes [1,2].

La búsqueda de virus en estos mamíferos mostró que los mismos pueden albergar más virus zoonóticos por especie que los roedores [3]. Al momento, se conocen 15 familias virales capaces de infectar 75 géneros de murciélagos, con representantes de virus ADN como Adeno-, Papilloma-, Herpesviridae, y representantes de virus ARN como Toga-, Retro-, Flavi- y Picornaviridae, entre otros [4,7]. Estudios de secuenciación de alto rendimiento para la identificación de virus, que incluyen virus de ADN, han reportado Herpesvirus de las subfamilias Alfa-, Beta-, y Gammaherpesvirinae en murciélagos insectívoros, frugívoros y hematófagos de varias especies [8,9].

Dentro de los virus ARN se han detectado virus pertenecientes a los géneros Lyssa-, Henipa- y Filovirus, causantes de enfermedades infecciosas emergentes y el coronavirus responsable del Síndrome Respiratorio Agudo Severo, SARS-CoV (SARS). En el brote de SARS-CoV del sur de China y Hong Kong en 2003, se dedujo que la adaptación del virus para la infección en humanos fue a través de un hospedero intermediario, que se supuso fue la civeta de la palma (*Paguma sp.*) al identificar individuos infectados que estaban en contacto con humanos. Posteriores análisis identificaron al murciélago de la fruta *Rousettus leschenaultii* como el reservorio natural de los coronavirus de tipo SARS [1,7,10,11]. Los virus se encuentran bien adaptados a sus hospedadores reservorio por lo que muestran estabilidad dentro de su entorno a nivel celular y ecológico, causando poca o ninguna manifestación clínica en estos individuos. Sin embargo, cuando estos virus se transmiten a los humanos u otros animales domésticos y causan morbilidad y/o mortalidad, se convierten en una preocupación para la salud pública y para la sanidad animal. El papel que juegan o la importancia relativa de estos o de otros hospederos silvestres en las enfermedades infecciosas emergentes causadas por zoonosis aún no es del todo claro [3].

Otro ejemplo de virus ARN, es el virus de la rabia (género Lyssavirus), una zoonosis que ha ido en aumento en América Latina en cuanto al número de casos reportados tanto en humanos como bovinos [12]. Mientras se controla la rabia urbana transmitida por perros, los murciélagos se están convirtiendo en el principal reservorio. La reducción de colonias de murciélagos hematófagos ha sido la principal medida de control en el continente. No obstante, hay autores que sugieren que esta estrategia no es efectiva a largo plazo y que podría aumentar la persistencia del virus en las poblaciones [12].

En Uruguay se han identificado 22 especies pertenecientes al suborden Yangochirptra de las familias Vespertilionidae, Molossidae y Phyllostomidae, con tres tipos de dieta: insectívora, frugívora y hematófaga. El territorio representa el límite austral de la distribución de varias especies como *Platyrrhinus lineatus*, *Sturnira lilium*, *Myotis riparius* y *Promops centralis*. La distribución de las especies es heterogénea, pero en conjunto cubren todo el territorio del país [12].

Tabla 1. Murciélagos autóctonos.

| Familia | Género | Especie | Dieta |
|-------------------------|---------------------|-------------------------|--------------|
| Phyllostomidae | <i>Desmodus</i> | <i>D. rotundus</i> | Hematófaga |
| | <i>Sturnira</i> | <i>S. lillium</i> | Frugívora |
| | <i>Platyrrhinus</i> | <i>P. lineatus</i> | Frugívora |
| Molossidae | <i>Eumops</i> | <i>E. bonariensis</i> | Insectívora |
| | | <i>E. patagonicus</i> | Insectívora |
| | <i>Molossops</i> | <i>M. temminckii</i> | Insectívora |
| | <i>Molossus</i> | <i>M. molossus</i> | Insectívora |
| | | <i>M. rufus</i> | Insectívora |
| | <i>Nyctinomops</i> | <i>N. laticuadatus</i> | Insectívora |
| | <i>Tadarida</i> | <i>T. brasiliensis</i> | Insectívora |
| | <i>P. centralis</i> | Insectívora | |
| Vespertilionidae | <i>Eptesicus</i> | <i>E. furinalis</i> | Insectívora |
| | | <i>E. diminutus</i> | Insectívora |
| | <i>Lasiurus</i> | <i>L. blossevilli</i> | Insectívora |
| | <i>Histiotus</i> | <i>H. montanus</i> | Insectívora |
| | | <i>H. velatus</i> | Insectívora |
| | <i>Myotis</i> | <i>M. albescens</i> | Insectívora |
| | | <i>M. levis</i> | Insectívora |
| | | <i>M. nigricans</i> | Insectívora |
| | | <i>M. riparius</i> | Insectívora |
| | <i>Dasypterus</i> | <i>D. ega</i> | Insectívora |
| | <i>Aeorestes</i> | <i>A. villosissimus</i> | Insectívora |

Consultado de Botto Nuñez, G., E. M. González & A. L. Rodales. [12]

En nuestro país los estudios virológicos relacionados a murciélagos han sido realizados principalmente en torno al virus rábico en el vampiro común (*Desmodus rotundus*, Figura 2A) por ser el principal transmisor de rabia paralítica en Sudamérica, adicionalmente este virus fue detectado en ejemplares de otras tres especies: *Molossus molossus*, *Tadarida brasiliensis* y *Myotis spp.* [46]. En octubre de 2007 se confirmó el primer borte de rabia paralítica bovina en el país, no asociada a rabia canina, según lo que había sido descrito en casos anteriores. Fue a partir de este brote y de las medidas de control que se constató la presencia de ejemplares de *Desmodus rotundus* infectados, confirmándose esta especie como origen del brote [16].

2.1.2 Características que hacen a los murciélagos buenos hospedadores

Se conoce que los murciélagos reúnen ciertas características que les dan la capacidad de adaptación a hospedar y dispersar más virus zoonóticos y no zoonóticos que otras especies. Otros mamíferos, como ciertas especies de roedores y carnívoros poseen rasgos en común con especies de murciélagos, por ejemplo, la capacidad de hibernar, pero ningún grupo de mamíferos comparte el conjunto completo de atributos que hacen a los murciélagos únicos y que podrían explicar el rol que cumplen en el mantenimiento y la transmisión de los virus [17-19]:

Viven en colonias de hasta millones de individuos en diferentes entornos y refugios muy variados desde árboles, cuevas, casas abandonadas, cielos rasos, entre otros. Los refugios pueden alojar diversos ensambles de especies de murciélagos. Forman algunas de las mayores agrupaciones no humanas de mamíferos y pueden estar entre los grupos más abundantes de mamíferos cuando se miden en número de individuos (Figura 2B) [14]. Estos mamíferos son únicos en su capacidad de vuelo autónomo mediante vuelo batido, lo que les permite desplazarse a grandes distancias diariamente en busca de alimento o durante las migraciones estacionales. Esta habilidad juega un papel fundamental en su distribución mundial y potencialmente permitiría la dispersión a largas distancias del agente infeccioso. Dentro de la misma especie, los diferentes patrones de migración pueden permitir el intercambio de nuevos virus o variantes de virus entre subpoblaciones migratorias y no migratorias de conspecíficos o murciélagos de otras especies. El contacto directo, los artrópodos o incluso los aerosoles también podrían servir como vectores y/o vehículos para la transmisión dentro de la colonia u a otras especies [1,14,17-19].

Son animales longevos que viven en promedio tres veces y media más que otro mamífero de tamaño similar. Muchos microquirópteros pueden llegar a vivir más de 25 años, el registro de mayor longevidad fue para un murciélago pequeño marrón de 35 años. Esta característica junto con la posibilidad de que pueden desarrollar infecciones persistentes con ciertos virus promueve su persistencia en el hospedero por más tiempo aumentando así su potencial de transmisión a otros vertebrados. Además, cuanto mayor es la duración de la infección o mayor prevalencia en una población puede aumentar el potencial de infecciones secundarias desde un solo individuo infectado a una población de individuos susceptibles. Dependiendo de la especie, la estación y la localización del refugio, el tamaño de la población puede ir desde pocos individuos hasta miles. El gran número de individuos que conviven puede contribuir considerablemente a la potencial transmisión de virus intra e interespecies y también facilitar la entrada o la dispersión a través del movimiento de individuos entre colonias, sobre todo si migran. Por lo tanto, la simpatria dentro del orden taxonómico también puede ser un rasgo importante en la riqueza viral zoonótica [14,17-20,43].

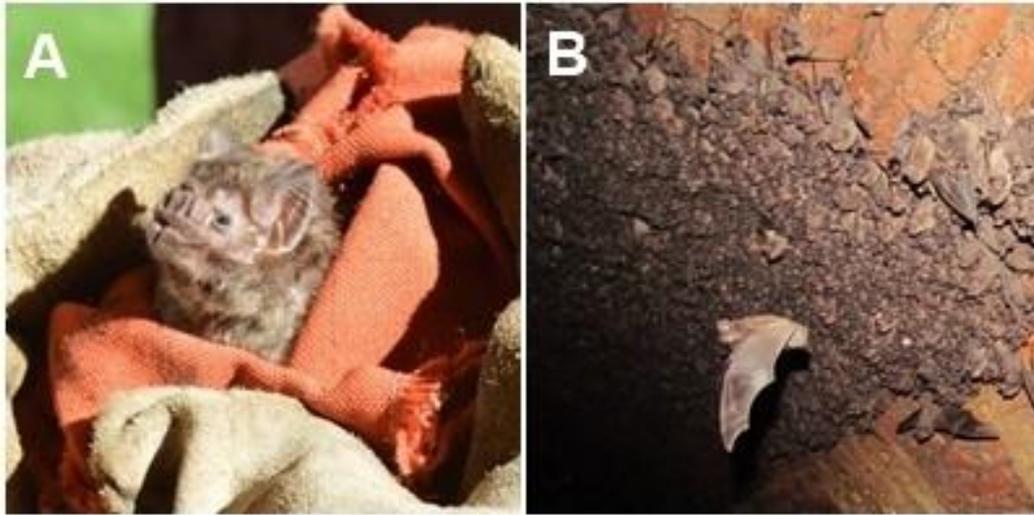


Figura 2. (A) Vampiro común (*Desmodus rotundus*) capturado en las Grutas de Salamanca, Maldonado, Uruguay. Foto: Lucía Moreira. **(B)** Colonia de *Tadarida brasiliensis*, Foto: Lic. María José Rodríguez.

La estructura espacial y demográfica de las poblaciones de murciélagos son lo suficientemente variables para ofrecer oportunidades a virus que causan infecciones tanto agudas como persistentes. Dentro de determinadas regiones las poblaciones pueden ser panmícticas o existir como metapoblaciones, brindando el potencial para la transmisión de virus estacionales y brotes anuales, así como el potencial de brotes periódicos entre poblaciones discretas [18].

En cuanto a los patrones de actividad, la mayoría son nocturnos, pero los hay también parcial o completamente diurnos. Todos poseen ojos funcionales, sin embargo, en los microquirópteros la visión no está muy desarrollada, a cambio utilizan un sistema de sonar conocido como ecolocalización, único entre los mamíferos terrestres [13,15]. Estas señales de ecolocalización se producen en la laringe, con la ayuda de los músculos de la pared abdominal, emitiéndose a través de la boca o las fosas nasales. La producción de estos fuertes sonidos podría generar gotitas o aerosoles de fluidos orofaríngeos (moco o saliva) permitiendo la transmisión de virus entre individuos que se encuentran cercanos [18].

Un rasgo importante que comparten las familias *Vespertilionidae*, *Rhinolophidae* y *Molossidae* es su capacidad para ingresar en torpor diario o en hibernación estacional (estado caracterizado por una gran disminución de la actividad fisiológica, donde se reduce la temperatura corporal y tasa metabólica) para conservar energía durante las noches frías y los meses de invierno. El impacto de estos estados en la patogénesis y el mantenimiento de las infecciones virales en los murciélagos no se han estudiado ampliamente. Los estudios de anticuerpos y aislamiento de virus sugieren que muchos virus pueden causar infecciones persistentes en murciélagos, quizás las temperaturas frías pueden disminuir la replicación viral y suprimir la respuesta inmune, que de lo contrario podría controlar la viremia. Esto permitiría que los virus persistan y reemerjan cuando las condiciones ambientales sean favorables para su transmisión [17,18].

La rica diversidad dietética que incluye insectos, frutas, hojas, flores, néctar, polen, semillas, peces, ranas, otros vertebrados y sangre es otra característica que los pueden llevar a distribuir y transmitir los virus durante su proceso de alimentación, por ejemplo, dejando frutas e insectos a medio comer contaminadas

con partículas virales, o por mordedura directa como lo hacen las especies hematófagas (vampiros) [41-43].

2.1.3 Respuesta inmune

Para el establecimiento de la relación virus- huésped es esencial un equilibrio entre la respuesta del huésped y la replicación del virus. Es probable que los murciélagos y los virus que hospedan se hayan adaptado conjuntamente dando lugar a una relación que limite la manifestación clínica y la respuesta inmune. Todos los virus zoonóticos son por definición patógenos para los humanos; sin embargo, por lo general no son patógenos o son mínimamente patógenos en los hospederos reservorio [21,22].

En cuanto a su respuesta inmunológica, se conoce muy poco sobre el sistema inmune de los murciélagos, varios estudios sugieren similitudes con los mamíferos que evolucionaron posteriormente a los quirópteros en términos de los genes inmunológicos y los ARN no codificantes que poseen. Por ejemplo, se purificaron a partir de suero de grandes murciélagos de la fruta inmunoglobulinas de tipo G (IgG), A (IgA) y M (IgM). También se identificaron en la médula ósea de zorros voladores macrófagos, células similares a linfocitos B y T y células que expresan inmunoglobulinas de superficie [21].

Se han propuesto hipótesis sobre por qué los murciélagos albergan tantos agentes infecciosos sin causarles enfermedad. Una de esas hipótesis es que las elevadas temperaturas corporales y las altas tasas metabólicas durante el vuelo imitan la respuesta de la fiebre, sirviendo como un adyuvante evolutivo para su sistema inmunológico (Tabla 1 Anexo), esto contribuiría al estado de reservorio de los murciélagos por tolerar mayor cantidad de virus. Según estas hipótesis, esta condición podría ayudar a entender por qué los virus de murciélagos que han evolucionado con ellos causan una alta patogenicidad cuando se transmiten a otros mamíferos, ya que estos virus son más virulentos por derivar de condiciones febriles. Cuando un murciélago se enfrenta a un antígeno viral, el aumento proporcional en el metabolismo para provocar una respuesta inmune puede ser insignificante en comparación con el gran aumento en el costo metabólico que se producen durante el vuelo, incluso su naturaleza cíclica diaria también podría permitir que algunos virus persistan dentro de los murciélagos y tal vez volverse resistente a esta parte de la respuesta inmune innata [21,22].

2.1.4 Interfaz virus- murciélagos y humanos

Los murciélagos son sensibles a los cambios inducidos por el hombre a los ecosistemas [14]. A nivel mundial, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) identificó como las principales amenazas para las especies de murciélagos el uso de la tierra (tala, cultivos, ganadería, incendios, plantaciones para madera), urbanización, caza y persecución, e intrusiones humanas en general en hábitat de murciélagos [13]. Todos estos factores extrínsecos, sumados a eventos climáticos, pueden actuar como estresores que afectan la interfaz virus-murciélago. Ciertas actividades humanas seleccionan especies sinantrópicas que se benefician de vivir cerca de los humanos, además de aumentar artificialmente las densidades de los animales al cambiar el uso de la tierra, dando como resultado un aumento del contacto entre humanos, animales domésticos y murciélagos. Los cambios en el hábitat como

la deforestación en los sitios de descanso, pueden alterar la distribución de las poblaciones y los patrones migratorios de los murciélagos. Estas actividades antropogénicas pueden afectar el ecosistema perturbando el equilibrio, lo que podría aumentar el riesgo de transmisión de enfermedades [13].

Las características del virus y del hospedero también juegan un rol importante. La edad, la condición corporal, el estado reproductivo, el sexo y hasta el estado social son algunos factores que pueden verse afectados por el estrés. Por ejemplo, la inanición y la temporada de reproducción de los machos pueden desempeñar un papel importante en la epidemiología de la enfermedad ya que el sistema inmune puede debilitarse y ser más susceptibles a las infecciones. Las luchas de dominio por cambios de jerarquía en la colonia, durante el cortejo y en el apareamiento, entre otras, son situaciones donde podría ocurrir la transmisión de virus [1].

El riesgo de transmisión desde los murciélagos a los humanos es relativamente bajo, ya que para que un virus de murciélago se transmita a humanos se requieren ciertas condiciones que conecten a los hospedadores reservorio y la infección viral en ellos con la exposición y susceptibilidad de los hospedadores receptores. Para muchos de estos virus emergentes también se requiere la dispersión viral desde los murciélagos y la supervivencia del virus en el ambiente. Raramente se comprenden los eventos que llevan a la interacción entre las especies de origen y el receptor, posiblemente porque estos eventos ocurren en muchas escalas de tiempo, espacio y organización ecológica, como son la evolución del patógeno dentro del hospedero hasta otros procesos como uso e invasión del hábitat [23].

2.2 Herpesvirus (HV)

2.2.1 ¿Por qué estudiar Herpesvirus en murciélagos?

Los HV son agentes virales de alta prevalencia en la población mundial tanto humana como en otros animales, incluidos los murciélagos. Sin embargo, nada se conoce sobre su presencia en murciélagos en Uruguay. Además de una primera caracterización, aunque en esta investigación no se aborda de forma explícita, estos datos podrían brindar información sobre la conectividad entre las colonias de murciélagos, utilizando el virus como un predictor de contacto entre las mismas y de posible transmisión de otros virus que utilicen la misma vía de contagio en el mismo evento de contacto [35].

2.2.2 Clasificación

El orden de los Herpesvirales es un grupo de virus de ADN que se encuentra altamente distribuido en la naturaleza, capaces de infectar un amplio rango de especies animales. Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) en total el orden cuenta con 19 géneros y se han identificado más de 200 especies [25]. La clasificación en especies distintas se basa en varios aspectos: a) si presentan diferencias nucleotídicas que representen un linaje de replicación independiente, b) en si tienen características biológicas o epidemiológicas diferentes y c) en si sus hospederos naturales son distintos, los que los lleva por lo tanto a ocupar nichos diferentes [27]. Actualmente, el orden está integrado por 3 familias y la asignación a las mismas se establece sobre criterios morfológicos del virión [10,25]: Los *Alloherpesviridae* son capaces de infectar peces y anfibios, los *Malacoherpesviridae* infectan invertebrados, al momento se conoce un único virus del herpes de este grupo (de la Ostra) [26, 27], y los *Herpesviridae* infectan una gran cantidad de animales vertebrados como mamíferos, aves y reptiles. A su vez esta familia se encuentra dividida en 3 subfamilias Alfa-, Beta- y Gammaherpesvirinae, clasificadas así por la arquitectura de su genoma, la similitud de la secuencia y las propiedades biológicas, incluyendo tropismo celular, ciclo reproductivo y citopatogenicidad [8]. En la figura 3, se muestran dos árboles filogenéticos; en el A, se representa la clasificación del orden Herpesvirales donde se divide a nivel de subfamilia, género y hospedero que naturalmente infectan, mientras que el B es de la familia *Herpesviridae*, compuesto por 46 especies y las subfamilias a las que pertenecen.

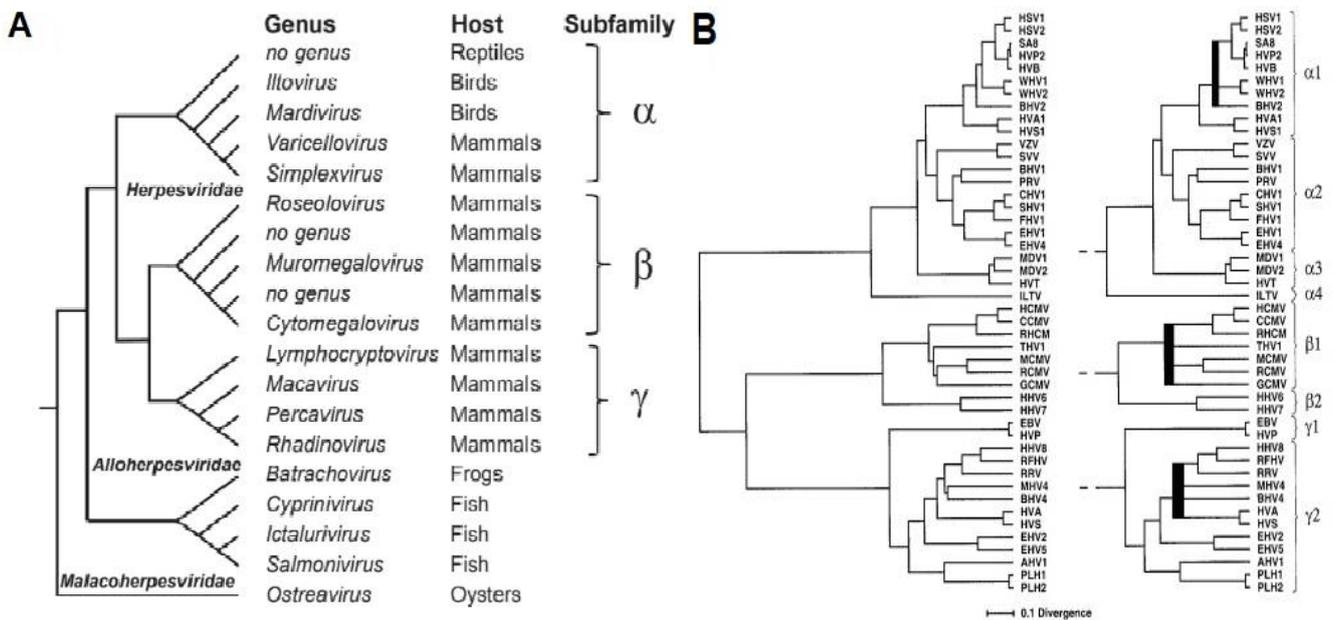


Figura 3. (A) Árbol filogenético del orden de los Herpesvirales, se muestran las divisiones a nivel de familias, géneros y subfamilias, así como el tipo de hospedero que infectan naturalmente. Extraído de Fields of virology 6th ed, pág.1804 [25]. **(B)** Árbol de la familia *Herpesviridae* compuesto por 46 especies, se muestra las divisiones en subfamilias, extraído de McGeoch, D. J y col. [37].

2.2.3 Tropismo celular

Dentro de los *Herpesviridae*, las tres subfamilias varían en su capacidad para infectar diferentes tipos celulares:

- Alfaherpesvirinae:** son capaces de infectar un variado rango de tipos celulares, presentan ciclos reproductivos cortos, se propagan rápidamente en cultivos celulares, destruyen las células a las que infectan y son capaces de establecer infecciones latentes principalmente en ganglios sensoriales. Ejemplo: Herpes simplex 1 y 2 (HSV), Virus de varicela-zoster (VZV) [25].
- Betaherpesvirinae:** estos virus tienen un rango de hospedero menor a nivel celular, aunque no es una característica exclusiva de la subfamilia. Establecen ciclos reproductivos más largos (mayores a 7 días) y la propagación en cultivos es menor que en los Alfaherpesvirinae. Pueden establecer latencia en glándulas secretoras, riñones y otros tejidos. Ejemplo: Citomegalovirus (CMV), 25,39].

- c. **Gammaherpesvirinae**: el rango de hospedero está restringido a la familia u orden del hospedero natural. Usualmente infectan específicamente linfocitos T o B y la latencia se establece en el tejido linfoide. Ejemplo: Virus del Epstein Barr (EBV) causante de la enfermedad mononucleosis Herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) [25].

2.2.4 Epidemiología

La infección por HV humano es muy frecuente y de distribución mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimaciones realizadas al 2012, 3700 millones de personas menores de 50 años (el 67% de la población) tenían infección por HSV-1. La prevalencia estimada de la infección era más elevada en África (87%) y más baja en las Américas (40%-50%). En las Américas, las estimaciones por regiones de la prevalencia de HSV-1 en la población de 0 a 49 años, es de 178 millones de mujeres (49%) y 142 millones de hombres (39%) [29].

La infección por HSV-1 es muy contagiosa, frecuente y endémica en todo el mundo. Se adquiere mayoritariamente durante la infancia y dura toda la vida. La transmisión puede realizarse a través del contacto directo con saliva, por vía genital, por trasplante de órganos o por transfusiones sanguíneas. Debido a su envoltura se pueden denominar virus lábiles (ya que son sensibles a la desecación) sin embargo pueden resistir cierto tiempo en el medio exterior permitiendo la vehiculización de la infección por las manos, objetos contaminados, lesiones o secreciones infectadas [28,29].

Durante la infección latente, se excretan partículas virales de manera intermitente sin signos clínicos de enfermedad, lo que puede explicar su gran difusión a nivel poblacional [30].

2.2.5 Características del virión y genoma

Todos los HV comparten la misma morfología general del virión que consta de una cápside icosaédrica de aproximadamente 100 nm de diámetro y una cavidad que recorre su eje largo con una estructura que sirve como portal para el empaquetado y liberación del genoma viral (ver portal vertex en la figura 4A). El core está compuesto por una molécula lineal de ADN de doble cadena (ADNdc) de 125 a 295 kb. Al conjunto de la cápside y el core se le denomina nucleocápside y está rodeada, de adentro hacia afuera, por un material amorfo compuesto por proteínas denominado tegumento y luego una envoltura de membrana lipídica que contiene asociada espículas de glicoproteínas virales en la superficie (glycoproteinas B (gB), H (gH), L (gL), M (gM) y N (gN) algunas son responsables de la fijación del virus a la célula (figura 4 A y B). Estas espículas son más cortas y numerosas que en otros virus. El número varía entre los diferentes HV, en el caso de Herpes Simplex se han identificado al menos 11 diferentes y el número de copias por virión pueden ser más de 1000 [25].

El tamaño del virión maduro varía desde 120 a 260 nm, esto se debe en parte a la variabilidad en el grosor del tegumento y al estado en que se encuentra la envoltura, adoptando una morfología desde esférica hasta pleomórfica [24,25].

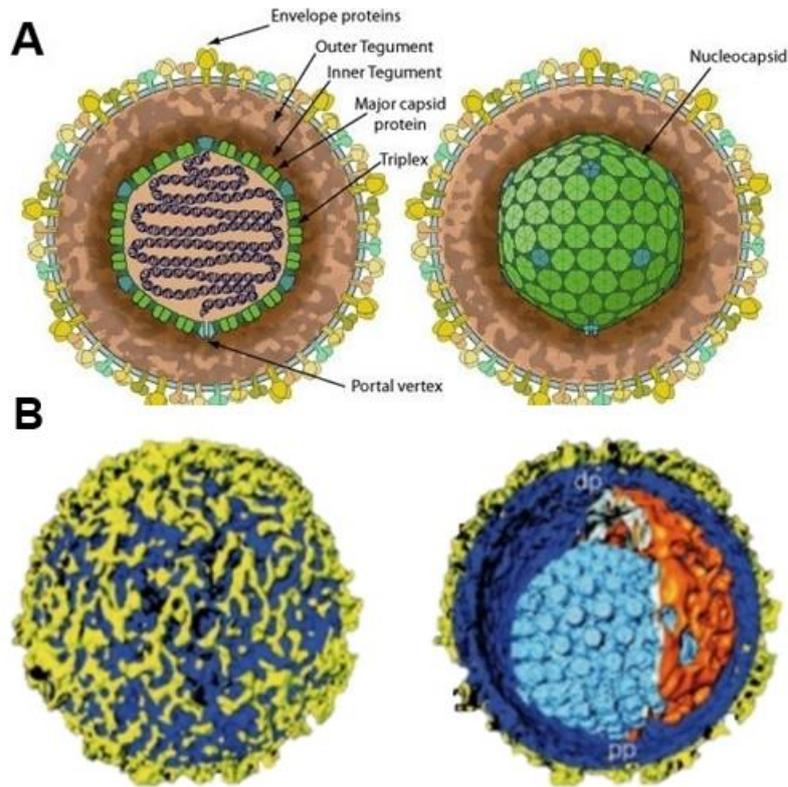


Figura 4. (A) Esquema general de un virión de la familia *Herpesviridae*, se muestra la nucleocápside rodeada por la envoltura plasmática con sus glicoproteínas asociadas y las proteínas del tegumento interno y externo. Extraído de Viral Zone (<https://viralzone.expasy.org/>) [24]. **(B)** Morfología de un HV a partir de microscopía electrónica de transmisión. Se muestra la cápside (celeste) y el tegumento (naranja) dentro de la envoltura (azul y amarillo), barra= 100 nm. Extraído de Fields of virology 6th ed, pág 1825 [25].

En lo que respecta a su estructura genética, la molécula de ADNdc presenta muchos genes que se encuentran superpuestos, pocos de ellos están empalmados. La mayoría de estos genes contienen una secuencia promotora-reguladora, una caja TATA, un sitio de iniciación de la transcripción, una secuencia líder en 5' de 30-300 pb no codificante, otra en la región 3' de 10-30 pb y una señal canónica de poliadenilación. Además, algunos de los ORFs (open reading frame o marco abierto de lectura) son anti sentido entre sí, contando alguno de estos con más de un promotor para su expresión. Los genomas de los HV codifican entre 70 y 200 proteínas. Cada transcripción generalmente codifica para una única proteína, aunque en algunas instancias se puede encontrar una segunda unidad transcripcional integrada en la secuencia de codificación de la proteína mayor, así se produce un polipéptido más corto con diferente función [24,25].

Otra de la característica de los genomas es que contienen secuencias repetidas internas y terminales mayores a 100 pb que pueden variar en número de copia, a partir de esto los HV pueden dividirse en 6 grupos nombrados de A a F de acuerdo a su presencia y ubicación [10,25, 27].

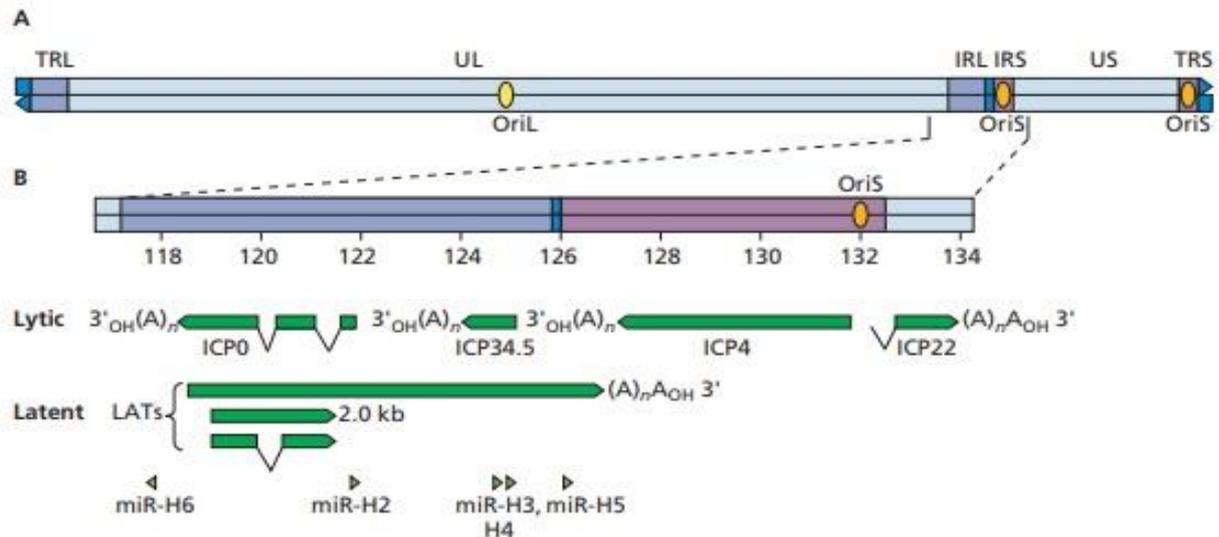


Figura 5. (A)- Diagrama del genoma de Herpes Simplex tipo 1, mostrando los segmentos únicos cortos y largos (US y UL), los repetidos terminales (TRL y TRS), las secuencias repetidas internas (IRL e IRS) y los orígenes de replicación OriL y OriS. **(B)** - Mapa extendido de las regiones mostradas en la escala de kilo bases. Esta región codifica para las *proteínas tempranas inmediatas* las cuales juegan un rol importante en establecer una infección productiva. Abajo se muestran las posiciones de las secuencias que codifican los principales LATs (genes asociados a mantener el virus en estado latente). Extraído de Principles of virology 4th ed, [38].

2.2.6 Propiedades biológicas

Los *Herpesviridae* comparten algunas propiedades biológicas generales:

1. Codifican para una gran cantidad de enzimas implicadas en el metabolismo del ácido nucleico, de la síntesis de ADN y del procesamiento de las proteínas [25].
2. La expresión de los genes, la replicación del ADN y el ensamblaje de la nucleocápside ocurre dentro del núcleo y, la mayoría adquieren al menos parte de su tegumento y envoltura en el citoplasma [18].
3. La producción de progenie viral infectiva viene acompañada generalmente de la destrucción de la célula infectada, lo que representa un ciclo lítico. Esto se lleva a cabo mediante la expresión regulada de los genes virales, de la replicación, del ensamblaje del virión, de la salida de la célula y de la transmisión, mientras se controlan una gran cantidad de actividades del hospedero y de sus defensas [25].
4. Por otro lado, son capaces de permanecer latentes en su hospedero natural, donde el genoma viral se replica como un episoma junto con el ADN de la célula huésped, utilizando la maquinaria de replicación de la misma. Los factores que desencadenan la reactivación son muy variables y poco conocidos, por ejemplo, estímulos nerviosos (HSV) [24,25, 30].

Muchos de estos virus inducen a la transformación maligna de cultivos celulares in vitro y el EBV está asociado al carcinoma rinofaríngeo y linfoma de Burkitt en humanos [30].

Así mismo, los HV pueden diferir entre sí en cuanto a sus propiedades biológicas, por ejemplo, algunos como el virus del Herpes Simplex Humano 1 y 2 presentan un amplio rango de células hospederas donde se multiplican rápidamente y destruyen las células infectadas. En cambio, otros como el EBV son capaces de infectar un restringido rango de células huésped, o establecen un ciclo replicativo largo como el Citomegalovirus. También pueden presentar diferencias en los mecanismos que utilizan para evadir la respuesta del hospedero, así como en las manifestaciones clínicas de la enfermedad que causan [25].

2.2.7 Ciclo biológico

El ciclo biológico del virus se puede dividir en 3 grandes fases (figuras 6 y 7):

a. Inicio de la infección

Comienza con la adsorción por intermedio de las glicoproteínas de superficie del virus (gB, gC, gD y gH, una o combinadas) con los receptores en la superficie celular. Esta unión va a provocar la penetración por endocitosis o la fusión con la membrana plasmática para liberar la cápside y las proteínas del tegumento en el citoplasma celular. La cápside se transporta al poro nuclear donde libera el ADN viral que se circulariza dentro del núcleo [25].

b. Replicación lítica

La síntesis de proteínas está regulada en el tiempo y se sintetizan tres tipos diferentes en la célula.

Primero, se da la transcripción de los llamados *genes tempranos inmediatos*, estos genes promueven la transcripción de otros *genes tempranos* además de proteger al virus contra la inmunidad innata del hospedero. La transcripción del ARNm viral la lleva a cabo la ARN polimerasa II del huésped, estos mensajeros codifican para proteínas implicadas en la replicación del ADN viral. Las proteínas tempranas participan en la replicación viral y los *genes tardíos* codifican para proteínas estructurales.

Por último, se va a dar el ensamblaje de los virus en las llamadas fábricas virales nucleares, la liberación se produce por gemación a través de la lámina interna de la membrana nuclear, la cual ha sido modificada por la inserción de glicoproteínas del virus en el Golgi. Los viriones atraviesan el citoplasma celular por el retículo endoplásmico y finalmente la célula termina siendo destruida [24,25, 28].

c. Latencia

En esta etapa se está restringiendo la activación de los genes de expresión lítica y se están expresando solamente los genes asociados a mantenerse en estado latente para el mantenimiento del genoma, el control de la célula y las defensas del hospedero. Bajo determinadas condiciones puede reactivarse y establecer un ciclo infectivo lítico. Miembros de algunos géneros codifican para muchas proteínas que son expresadas en el mantenimiento del estado de latencia, como EBV, en cambio otros como HSV no requieren expresión de ninguna proteína [25,28].

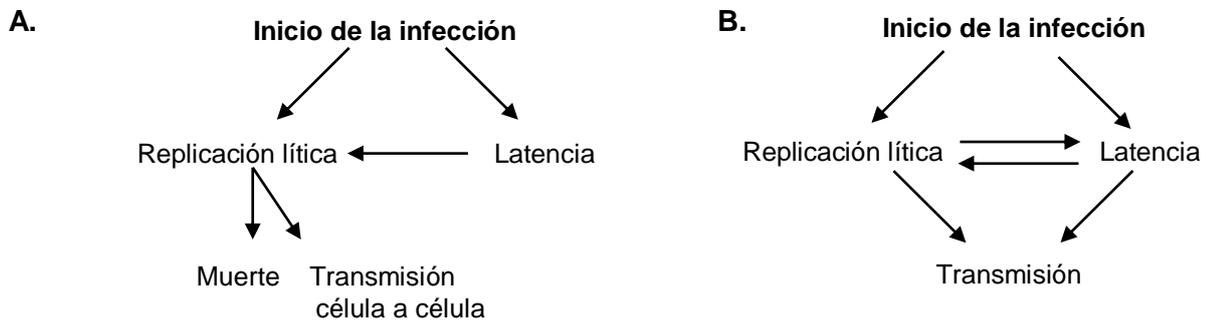


Figura 6. Esquema del resultado de la infección lítica y latente a nivel celular (A) y de los organismos (B). Extraído y adaptado de Fields of Virology, 6th ed, pág 1804 [25].

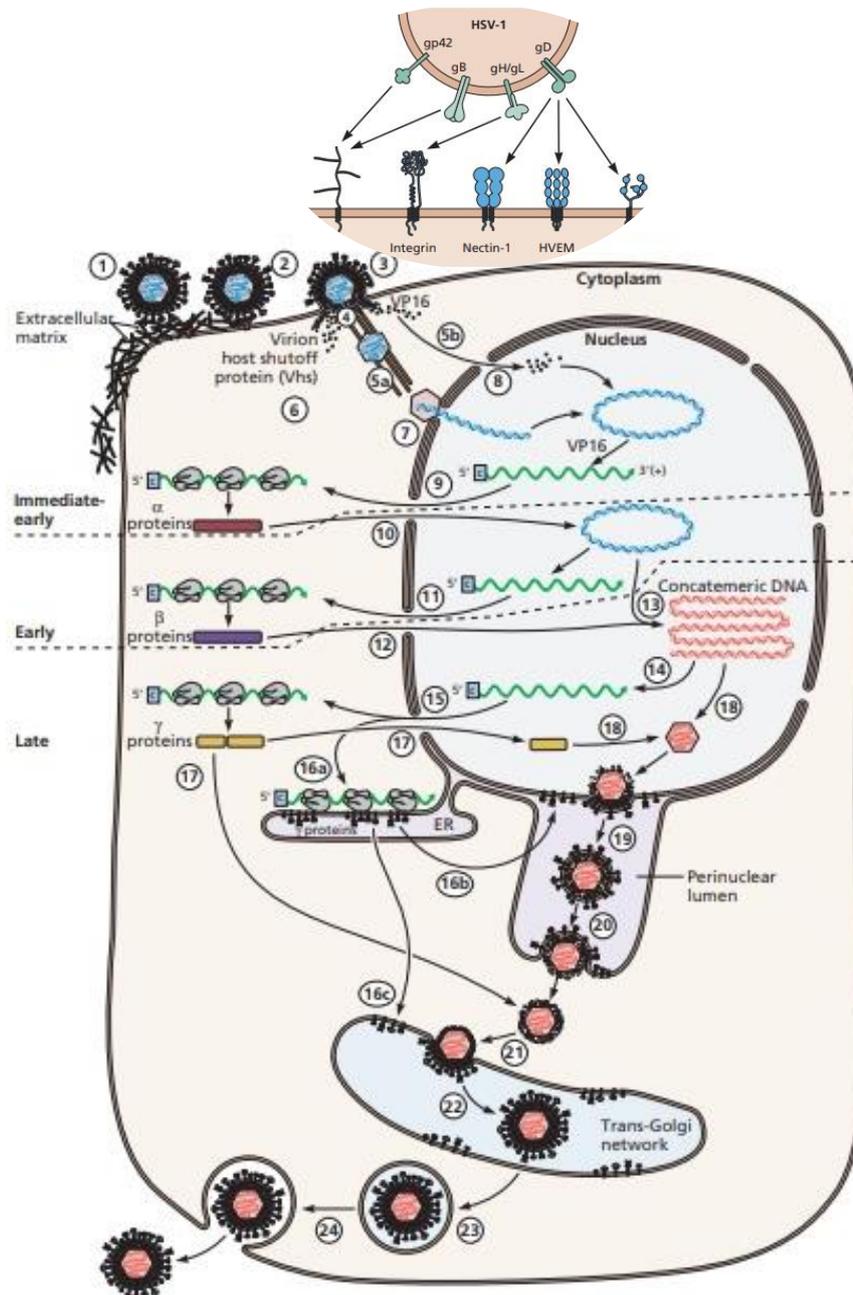


Figura 7. Ciclo reproductivo unicelular del virus del Herpes Simplex tipo 1. Brevemente, se esquematiza el ciclo de infección del virus desde que se une a la membrana celular a través de las glicoproteínas de superficie, ingresa a través de la fusión de membranas independiente de pH o por endocitosis, se libera la cápside y las proteínas del tegumento al citoplasma, ingresa el material genómico al núcleo (1 a 8). Luego comienzan la transcripción y traducción de los genes tempranos inmediatos, tempranos y tardíos (9 a 12). En paralelo se sintetiza el ADN viral, la replicación y la recombinación del ADN producen ADN concatémico largo, la plantilla para la expresión génica tardía. Los genes tardíos serán proteínas estructurales y proteínas que servirán para el ensamblaje y egreso del virión (13 a 15). Finalmente se da el ensamblaje de la cápside con el ADN viral y algunas proteínas del tegumento en el núcleo y en el citoplasma pasa por el Golgi donde adquiere la membrana con las glicoproteínas de superficie (16 a 22). Por último, la partícula de virus envuelta se transforma en una vesícula que se transporta a la membrana plasmática para su liberación por exocitosis (23 a 24). Extraído de *Principles of Virology*, 4th ed. Pág. 515 [38].

2.2.8 Interacción y coevolución virus-hospedero

Los HV pueden interactuar con el hospedero a diferentes niveles: Inhibiendo la respuesta inmune innata y adaptativa, modulando o inhibiendo la apoptosis, modulando el ciclo celular, e inhibiendo el “splicing” del ARN del hospedador [24]

Existe una relación muy estrecha entre el virus y el hospedero, ya que el virus precisa de éste para multiplicarse, esto conlleva a la evolución en paralelo entre ellos. La presencia en el hospedero durante mucho tiempo puede tender a determinar una atenuación del patógeno y una resistencia del hospedero al mismo. En contraste con algunos virus que han evolucionado para propagar rápidamente nuevos genotipos en la población hospedera, como lo hace el virus de influenza, los HV se han mantenido relativamente estables en sus hospedadores durante el curso del tiempo y/o muestran una distribución de genotipos definida geográficamente. Los HV están bien adaptados a sus anfitriones, han adquirido genes y funciones que permiten una interacción más finamente regulada entre virus y hospedero, lo que resulta en una relación HV-hospedero a largo plazo. Por consiguiente, el hospedero natural es inmunocompetente y las infecciones productivas con formación de nuevas partículas infecciosas son raras [25,31].

2.2.9 Antecedentes de Herpesvirus en murciélagos

Al momento se han reportado diversos trabajos de detección de Herpesvirus en murciélagos [7-10, 17, 21,8, 40 y 44] pertenecientes a las tres subfamilias Alfa-, Beta- y Gammaherpesvirinae, a partir de muestras de heces, sangre, hisopados anales y saliva en diferentes especies de murciélagos mediante PCR y por aislamiento en cultivos celulares [9,10].

A modo de ejemplo, estudios realizados en Guatemala sobre la diversidad microbológica en *D. rotundus* detectaron dos HV (DrHV-1 y DrHV-2) mediante PCR para la región de la ADN polimerasa. De un total de 396 muestras, 35 de ellas fueron positivas para HV, las cuales pertenecían a 33 individuos siendo el virus mayormente encontrado. Se analizaron diferentes tipos de muestras: heces, sangre e hisopado bucal comprobando que este último tipo de muestra fue el más efectivo para la detección, obteniéndose 30 positivos de 103 muestras de saliva. Los análisis filogenéticos de esta región los ubican a lo HV detectados dentro de la subfamilia Gamma y Betaherpesvirinae respectivamente [7].

En cuanto a los diferentes tipos de muestras otros trabajos también han reportado la presencia de HV en saliva. Un análisis de comparación del viroma de *D. rotundus* y *M. molossus* (especie insectívora de la familia *Molossidae*) determinó que la mayoría de los HV fueron detectados en las muestras de saliva de *M. molossus* [10].

Como se mencionó anteriormente los HV han sido detectados en una gran variedad de tipos de muestras y provenientes de murciélagos con diferentes tipos de dietas: hematófagos, insectívoros y hasta frugívoros. Ejemplo de este último es un análisis realizado en murciélagos de la fruta de Indonesia (*Pteropodidae*) donde se aisló un HV de la subfamilia Alfaherpesvirinae previamente desconocido, el

mismo fue caracterizado como un miembro del género Simplexvirus, el cual incluye virus humanos comunes como HSV 1 y 2. Si bien los Alfa herpesvirus se diseminan en humanos y otros animales, hay poca información sobre su distribución en murciélagos [8].

Los estudios de genomas de HV reportados de diferentes especies hospedadoras mostraron que los mismos presentaban regiones muy similares entre ellas, esto indicaría que la evolución de los diferentes HV se ha dado a través de las especies animales que los hospedan. Por lo tanto, una mejor caracterización y estudio de los genomas de diferentes HV animales podría ayudar al entendimiento de la evolución de los HV en general y en particular de los HV humanos [32].

2.3 Hipótesis

Los Herpesvirus son capaces de infectar murciélagos de diversas especies y de amplia distribución geográfica. Nuestras poblaciones de quirópteros no serían una excepción, por lo tanto, esperamos detectar en ellas a virus de la familia *Herpesviridae* y analizar su variabilidad genética. Para ello, nos propusimos analizar un conjunto de muestras de saliva de murciélagos insectívoros y hematófagos colectados en diferentes regiones de nuestro país.

3 OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Detección y caracterización de Herpesvirus a partir de muestras de saliva de murciélagos insectívoros y hematófagos colectados en diferentes zonas del territorio uruguayo.

- **Objetivos específicos**

-  Producción de control positivo de Virus del Herpes Simplex 1 humano (HSV-1) en cultivos celulares, mediante infección de la línea celular Vero.
-  Puesta a punto de una PCR en tiempo final a fin de amplificar una región filogenéticamente informativa de la polimerasa de HV.
-  Análisis de hisopados bucales de murciélagos autóctonos mediante PCR para la detección de HV.
-  Secuenciación de las muestras positivas para su identificación, caracterización y estudios filogenéticos.

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 Producción de control positivo

4.1.1 Cultivo celular e infección

Para la producción del control de virus se realizó la propagación de una cepa de referencia de Herpes Simplex tipo 1 humano (HSV-1) de la familia *Herpesviridae*, en cultivo celular en monocapa de células Vero (línea celular continua derivada de riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*) existente en el laboratorio

Los procedimientos aquí descriptos fueron realizados en cabina de bioseguridad de clase II de la Sección de Virología de Facultad de Ciencias.

Las células fueron crecidas en medio mínimo esencial (MEM) con sales de Earle, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de glutamina y 1% de antibiótico. Se incubaron en estufa a 37°C y una atmósfera de CO₂ al 5%. Los subcultivos se realizaron cada 48-72 hs, despegando las células del sustrato con una solución de tripsina 1X en PBS. Se prepararon dos placas p60, una para control de infección y la otra para infección. Cuando el cultivo celular alcanzó un estado de confluencia de alrededor del 80%, se realizó la infección con la cepa de HSV-1.

Brevemente;

1. Se descartó el medio de cultivo, se lavó la monocapa celular con 1mL de PBS y se agregó 100µL de inóculo de virus y 900µL de medio sin SFB (MEM 0%). La placa control se manejó en paralelo, y en lugar de agregar virus y medio solo se agregó medio sin suero fetal y se incubó durante 1 hora en estufa a 37°C y 5% de CO₂, moviendo las placas cada 15 minutos por agitación suave para que mejore la adsorción a toda la monocapa celular.
2. Se descartó el inóculo y se adicionó 5 mL de MEM-E con 2% de SFB (MEM 2%) y se dejó incubando en estufa 37°C y 5% de CO₂ hasta la aparición de efecto citopático (ECP).
3. A las 72 hs, cuando se observó el ECP característico del virus, que consta de la formación de racimos con células redondeadas y desprendidas del sustrato.
4. Se cosecharon las células infectadas mediante raspado y se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos, descartando el sobrenadante y congelando el pellet celular para su conservación a -80°C hasta su utilización.

4.1.2 Extracción de ADN total de infección en cultivo celular

La extracción del ADN viral, se realizó por dos diferentes métodos de extracción con el fin de obtener una cantidad y calidad óptima de ADN para ser usada como control.

Se utilizó el método del Trizol®, y un kit de extracción de ARN de Zymo Research®. Además, ambas pruebas se combinaron con diferentes buffers para resuspender el pellet celular, con PBS o buffer de lisis AVL® (QIAmp Viral RNA de Qiagen).

- Extracción con Trizol®:

1. Se resuspendió y homogeneizó el pellet celular con 200 µL de Trizol y se incubó por 5 minutos. Se agregaron 40 µL de cloroformo se incubó 3 minutos y se centrifugó por 15 minutos a 12000 rpm a 4°C. Al separarse las distintas fases, se descartó la fase acuosa, y se reservó la interfase y la fase fenólica.
2. Se agregó 60 µL de etanol 100% para precipitar el ADN y se mezcló por inversión incubando por 3 minutos. Luego se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm a 4°C y se descartó la fase fenol-etanol (sobrenadante).
3. Se resuspendió el pellet en 200 µL de citrato de sodio 0,1 M en etanol 10 %, pH 8.5, se dejó incubar por 3 minutos mezclando de vez en cuando por inversión suave. Se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante (se repite este punto).
4. Luego se resuspendió el pellet en 400 µL de etanol 75% y se dejó por 20 minutos, mezclando por inversión. Se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet de ADN se dejó secar al aire durante 10 minutos.
5. Se resuspendió el pellet en 0,3 mL de NaOH 8 mM, se centrifugó por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C y luego se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo para almacenar a -20°C.

- Extracción con kit de extracción de ARN de Zymo Research®:

Se utilizó el Kit (Quick-RNA™ MiniPrep Catalog Nos. R1054 & R1055) y se siguió el protocolo descrito por el fabricante, omitiendo los pasos de remoción de ADN genómico y del tratamiento con ADNasa I.

4.2 Procesamiento de las muestras

4.2.1 Captura de ejemplares y toma de muestras de saliva

Se analizaron un total de 71 hisopados bucales de murciélagos capturados entre los años 2013 y 2015 por Lic. Germán Botto, (colaborador del laboratorio e integrante del PCMU, Programa para la Conservación de Murciélagos de Uruguay), pertenecientes al banco de muestras de la Sección Virología de Facultad de Ciencias. Los individuos muestreados pertenecen a las tres familias reportadas para Uruguay y se clasificaron morfológicamente como: *Tadarida brasiliensis* (N=28), *Desmodus rotundus* (N=14), *Myotis sp.* (N=15), *Eptesicus furinalis* (N=5), *Molossus molossus* (N=4), *Eumops diminutus* (N=1), *Molossops temminckii* (N=2), *Eumops bonariensis* (N=1) y *Molossus rufus* (N=1) (Anexo tabla 2).

Los murciélagos fueron capturados en distintas zonas de nuestro país (departamentos de Artigas, Rivera, Maldonado, Montevideo y Rocha). Las capturas se realizaron utilizando redes de niebla colocadas a la entrada de los refugios identificados o en zonas de posible pasaje de los animales en vuelo. Las muestras de saliva se tomaron utilizando hisopos de algodón estériles. Los mismos se colocaron en criotubos con buffer de lisis viral (Buffer AVL®, Qiagen, Hilden, Alemania) para mantener intacta la integridad de los ácidos nucleicos, una vez en el laboratorio fueron guardados a -80°C para la conservación del material genómico [16,33]. Además, por cada individuo se registraron datos como sexo, localidad.

4.2.2 Extracción de material genómico de las muestras

Las muestras a utilizar en este trabajo fueron previamente analizadas para la búsqueda de rhabdovirus y pneumovirus [33]. En dicho estudio se realizó la extracción de ARN total, el cual fue obtenido a partir de los hisopados bucales utilizando el kit para fluidos QIAmp Viral RNA (Qiagen, Hilden, Alemania). Aunque este kit está optimizado para extraer mayoritariamente ARN total, por estar basado en el método de Boom y col. [34] también permite la extracción simultánea de ADN. Los hisopados bucales obtenidos en los años 2013 y 2015 fueron sumergidos en 200 µL de buffer AVL (Qiagen). Al momento de realizar la extracción, 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 [33].

4.3 Análisis moleculares

4.3.1 Puesto a punto para la amplificación del ADN viral control

Se realizó una PCR anidada descrita por VandenVanter y col. [32] con 5 oligonucleótidos degenerados dirigidos a la región genómica de la ADN polimerasa viral, en la tabla 2 se detallan las secuencias, la polaridad y la ronda de PCR en la que se utilizan.

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen de la ADN polimerasa viral.

| Oligonucleótido | Secuencia (5'-3') | Polaridad | Ronda de PCR |
|-----------------|---------------------------------|-----------|--------------|
| DFA | GAYTTGCNAGYYTNTAYCC | + | 1° |
| ILK | TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA | + | 1° |
| KG1 | GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT | - | 1° |
| TGV | TGTA ACTCGGTGTAYGGNTTYACN GGNGT | + | 2° |
| IYG | CACAGAGTCCGTRTCNC CRTADAT | - | 2° |

Brevemente, en la primera ronda de PCR en la mezcla de reacción se colocó 12.65µL de H₂O ultrapura, 2.5µL de Buffer de PCR 10X, 0.75µL de MgCl₂ (50mM), 0.5µL de dNTPs (10mM), 2.5µL de los oligonucleótidos DFA, ILK y KG1 (10 µM) en un formato multiplex, 1.1µL de Taq Platinum® y 1µL de extracto de ADN, en un volumen final de 25µL. Para la segunda ronda se siguió el mismo protocolo utilizando 2.5µL de los oligonucleótidos TGV e IYG (10 µM), una alícuota de 2.5µL de la primera ronda de PCR y 13.65µL de H₂O ultrapura.

El protocolo de ciclado es igual para ambas PCRs y consta de 45 ciclos de 94°C - 30 segundos, 45°C - 1 minuto, 72°C - 1 minuto, y una extensión final de 72 °C - 7 minutos.

Los productos de la PCR anidada son fragmentos de entre 215 y 315 pb [9] y se visualizaron en geles de agarosa al 1% en TAE 1X y teñidos con SYBR® Safe (Invitrogen) utilizando como marcador de peso molecular GeneRuler 100pb DNA Ladder (Thermo Scientific).

4.3.2 Secuenciación de muestras positivas

En las muestras donde se observó un amplicón de un tamaño aproximado entre 200 y 300 pb, similar al obtenido con el control positivo, se enviaron a purificar y secuenciar con los oligonucleótidos de la segunda ronda de PCR (TGV e IYG) a Macrogen Inc. (Corea del Sur) según sus requisitos de envío.

4.3.3 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas a partir del cromatograma recibido desde Macrogen, se ensamblaron y corrigieron utilizando el programa BioEdit, luego de obtener las secuencias consenso para cada muestra, se compararon con la base de datos del NCBI-Genbank mediante BLAST (Basic Alignment Search Tool). Para la construcción de la filogenia se utilizaron las secuencias obtenidas en este trabajo, las que resultaron con mayor valor de homología y cobertura por BLAST, y las secuencias reportadas por Wray y col. y Zheng y col. Los alineamientos se llevaron a cabo con 3 programas diferentes: MAFFT, Clustal W y Muscle, estos dos últimos fueron los que resultaron mejores para nuestro conjunto de secuencias. Los

análisis filogenéticos se realizaron utilizando el criterio de máxima verosimilitud, a través del programa PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>), siendo el modelo de sustitución nucleotídica más ajustado a los datos el GTR (General Time Reversible). Los soportes estadísticos de los nodos se calcularon mediante aLRT (approximate-likelihood ratio test).

5 RESULTADOS

5.1 Producción de control positivo en cultivo celular

Se propagó una cepa control de HSV-1 humano en células Vero, consecuentemente, a las 24hs post-infección (figura 8B) se comenzó a observar efecto citopático que consta de células redondeadas, mientras que a las 48hs ya se presentan agrupadas en racimos (figura 8C y D) en comparación con el crecimiento confluyente del cultivo sin infectar (figura 8A).

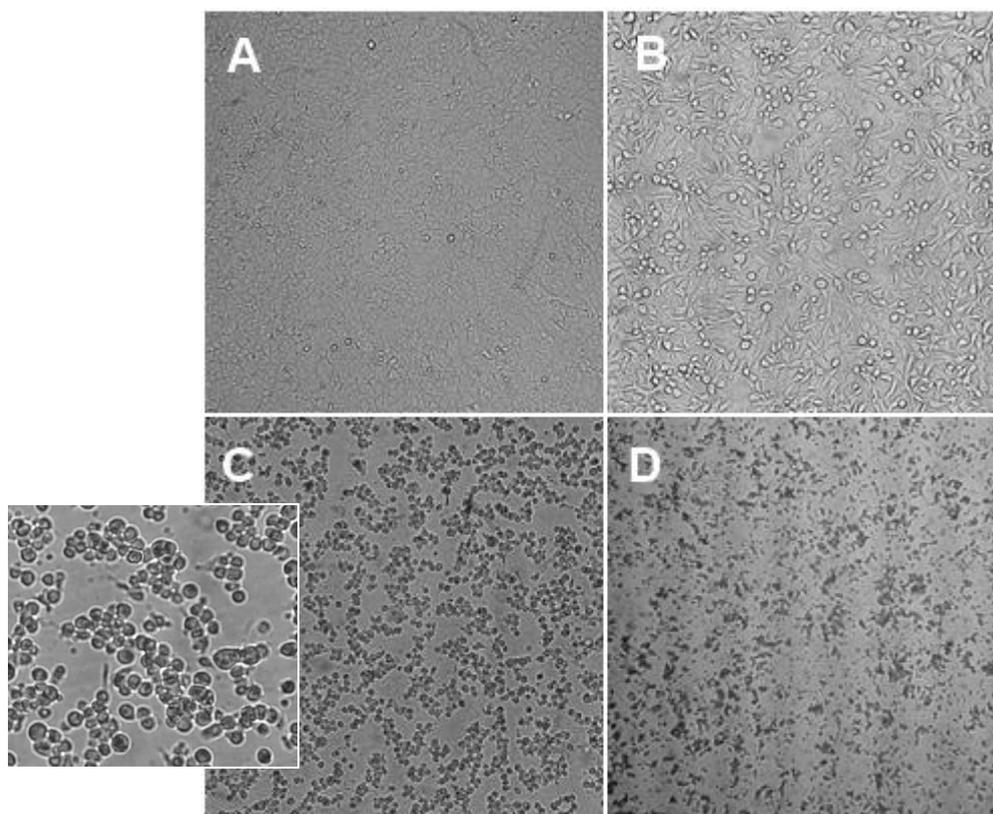


Figura 8. Etapas del proceso de infección con HSV-1 en cultivos de células VERO.

A- Control sin infectar; B, C y D- 24, 42 y 72 hs post infección, se puede observar las células redondeadas y agrupadas en racimos. Fotos: Lucía Moreira.

Finalmente, la cosecha se realizó a las 72 hs y se centrifugaron las células. Los pellets celulares se resuspendieron con 2 buffers diferentes, PBS y AVL® (tampón de lisis utilizado para purificar ácidos nucleicos virales). Luego, se prosiguió a realizar las extracciones con Trizol® y el kit comercial de Zymo Research® en combinación con ambos buffers (Trizol® / Kit- PBS, Trizol® / Kit- AVL®).

5.2 Puesta a punto de PCR para la amplificación del ADN viral

Las extracciones fueron utilizadas de forma exitosa para la puesta a punto de los ensayos de PCR anidada. Se amplificó la región genómica de la ADN polimerasa viral con los oligonucleótidos degenerados diseñados para dirigirse específicamente a secuencias que codifican motivos de aminoácidos altamente conservados que cubren una región de aproximadamente 800 pb [32]. Finalmente, los 5 oligonucleótidos utilizados en un formato múltiplex dan como producto un amplicón de entre 215 y 315 pb (Figura 9).

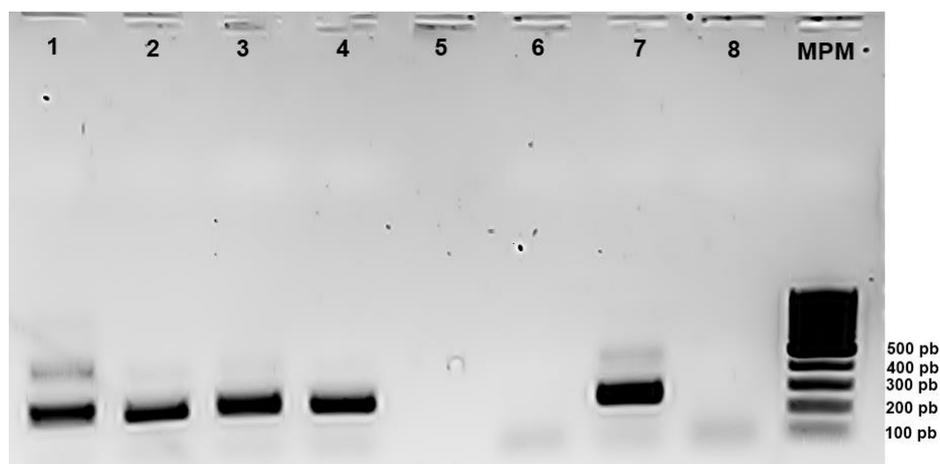


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR Safe.

Amplificación de las extracciones realizadas a partir de las infecciones en cultivo celular con HSV-1. **1-** Kit-PBS; **2-** Trizol- PBS; **3-** Kit- AVL; **4-** Trizol- AVL; **5-** carril vacío; **6-** Control de células sin infectar Trizol-PBS; **7-** Trizol-PBS; **8-** Control negativo de PCR; **MPM-** Marcador de peso molecular de 100 pb. El tamaño del gen detectado es de entre 200-300pb.

5.3 Procesamiento de las muestras por PCR

En total fueron analizadas por PCR un total de 71 muestras de saliva provenientes de hisopados faríngeos de un total de 9 especies de murciélagos de diferentes zonas del país (departamentos de Artigas, Rivera, Rocha, Maldonado y Montevideo).

A partir de la PCR anidada se detectaron mediante visualización por electroforesis, 48 muestras con bandas correspondientes al tamaño esperado (200- 300 pb). En la figura 10 se muestra el amplicón de algunas muestras positivas y el control.

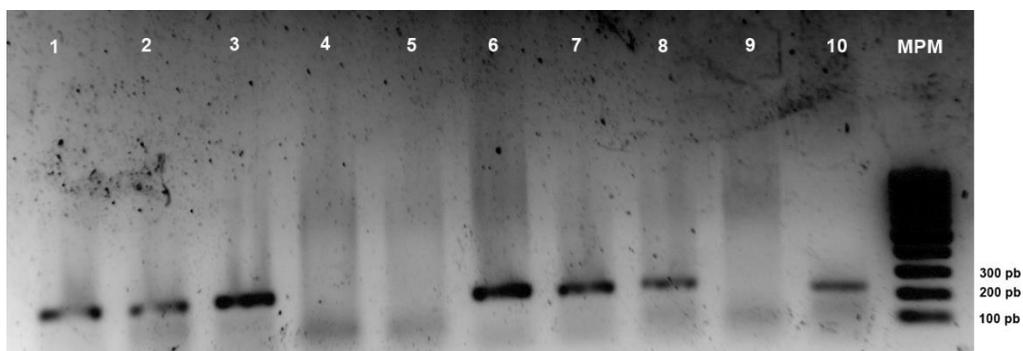


Figura 10. Detección del gen de la ADN polimerasa de HV en gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR Safe. Carriles: 1,2 y 3- muestras; 4 y 5- controles negativos; 6, 7 y 8- muestras; 9- control negativo; 10- control positivo (HSV-1); MPM- marcador de peso molecular GeneRuler de 100 pb (Thermo Scientific).

En la tabla 3 se muestra la cantidad de muestras positivas por total de muestras analizadas de cada especie y la localidad donde fueron colectadas. De las 9 especies analizadas, solamente 1 (*E. bonaerensis*) resultó negativa por PCR. La detección por PCR de HV resultó de ser de un 68% en total para los 5 departamentos muestreados.

Tabla 3. Muestras analizadas por PCR.

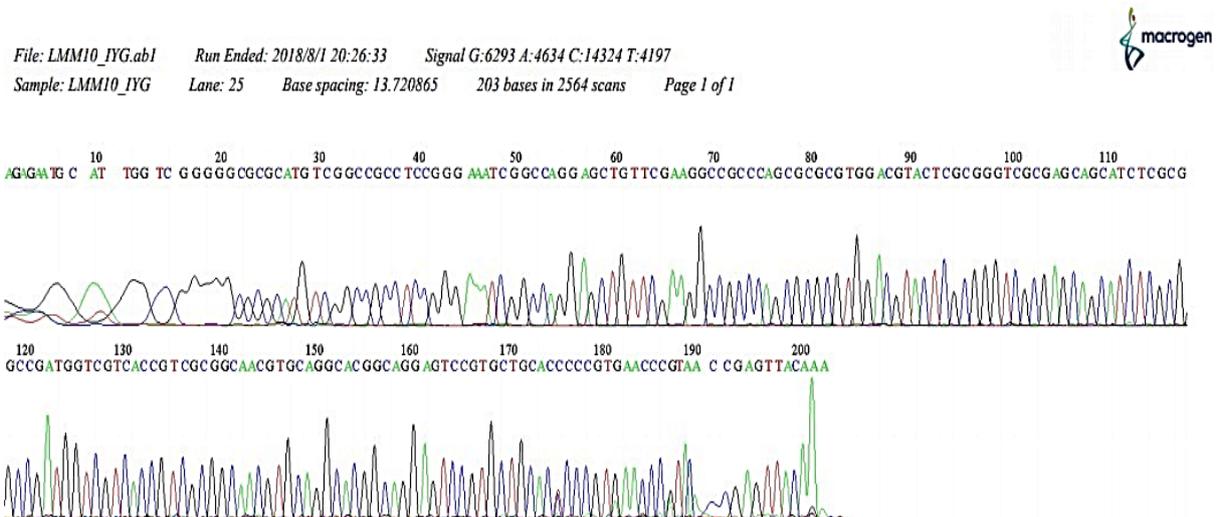
| Especies | Cantidad positivas/analizadas | Localidad |
|------------------------|-------------------------------|------------|
| <i>T. brasiliensis</i> | 25/28 | Rivera |
| <i>D. rotundus</i> | 6/14 | Maldonado |
| <i>Myotis spp.</i> | 8/13 | Rivera |
| | 0/2 | Artigas |
| <i>E. furinalis</i> | 1/2 | Artigas |
| | 0/2 | Rocha |
| | 1/1 | Montevideo |
| <i>M. molossus</i> | 3/3 | Rocha |
| | 1/1 | Artigas |
| <i>E. diminutus</i> | 1/1 | Artigas |
| <i>M. temminckii</i> | 1/2 | Artigas |
| <i>E. bonaerensis</i> | 0/1 | Artigas |
| <i>M. rufus</i> | 1/1 | Artigas |
| | Total: 48/71 | |



5.4 Secuenciación

Los amplicones obtenidos para las 48 muestras positivas, así como el control HSV-1, se enviaron a purificar y secuenciar a Macrogen Inc Korea con los oligonucleótidos TGV e IYG (tabla 2 de materiales y métodos).

A



B

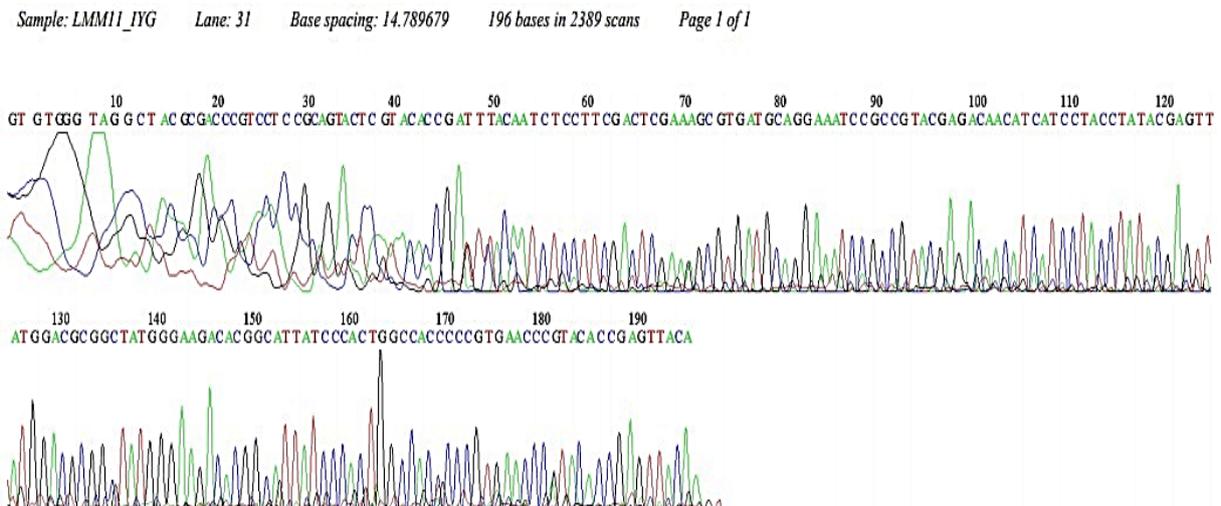


Figura 11. Cromatograma de las secuencias génicas obtenidas por secuenciación con el oligonucleótido IYG correspondientes al control de HSV-1 (A) y de una muestra positiva (B) recibidas desde Macrogen Inc antes de procesarlas.

La figura 11 se muestran ejemplos de los cromatogramas recibidos desde MacroGen correspondientes a las secuencias de HSV-1 (control- Figura 11A) y de una muestra positiva (Figura 11B). Luego de editar las secuencias en el programa BioEdit, se realizó la búsqueda de secuencias homólogas con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Las secuencias resultantes alinearon exitosamente con la región de la ADN polimerasa de diversos HV reportados, a excepción de una muestra cuya secuencia resultó de mala calidad y fue descartada para los posteriores análisis (LMM4). Como era de esperarse, el control alineó completamente con un Herpes Simplex humano tipo 1.

5.5 Análisis filogenéticos

Las secuencias parciales del gen de la ADN polimerasa obtenidas fueron editadas y alineadas junto con 72 secuencias del GenBank representativas de la familia *Herpesviridae* publicadas previamente, las cuales fueron obtenidas de ejemplares de murciélagos y otros vertebrados. El árbol filogenético realizado (figura 12) muestra que las secuencias se subdividen en las 3 subfamilias Alfa-, Beta- y Gammaherpesvirinae.

La cepa control de HSV-1 cae dentro de la subfamilia Alfaherpesvirinae, 20 de las muestras positivas se agrupan dentro del grupo correspondiente a la subfamilia Gammaherpesvirinae, y 27 a la subfamilia Betaherpesvirinae (Tabla 4). Estas se diferencian en el árbol en color rojo, indicando género y especie de los individuos de donde fueron extraídas las muestras, la localidad de colecta y el número de referencia de la secuencia (LMM*). Otras secuencias correspondientes a murciélagos se encuentran indicadas por género y especie o como Murciélago Herpesvirus. Todas las secuencias extraídas de la base de datos del GenBank se encuentran referenciadas con sus respectivos números de acceso.

Tabla 4. Cantidad de muestras positivas por especie para las subfamilias Beta- y Gammaherpesvirinae.

| Especie | Betaherpesvirinae | Gammaherpesvirinae |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>T. brasiliensis</i> | 15 | 9 |
| <i>Myotis spp.</i> | 7 | 2 |
| <i>D. rotundus</i> | 0 | 6 |
| <i>M. molossus</i> | 2 | 1 |
| <i>M. rufus</i> | 0 | 1 |
| <i>M. temminckii</i> | 1 | 0 |
| <i>E. diminutus</i> | 1 | 0 |
| <i>E. furinalis</i> | 1 | 1 |

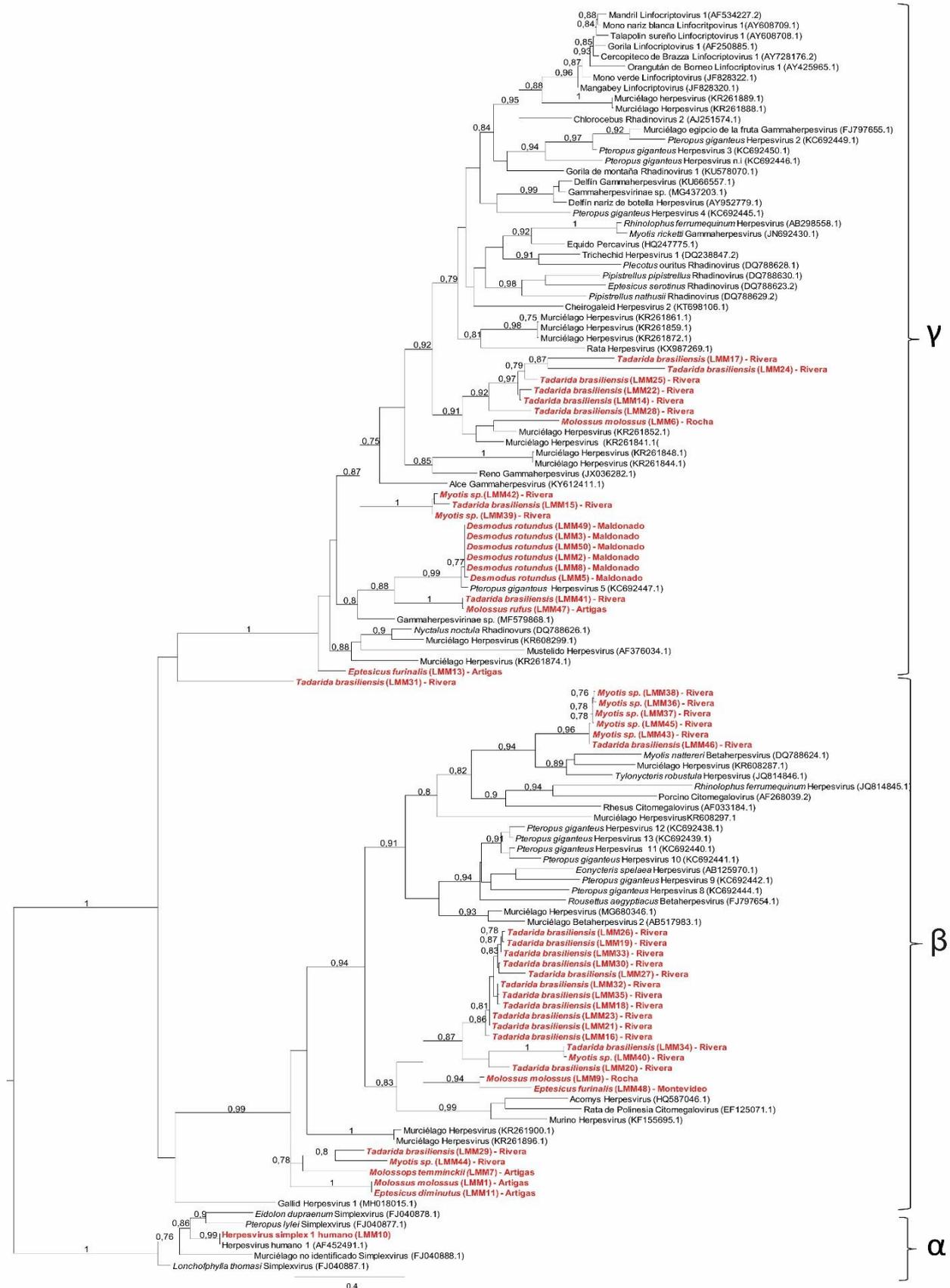


Figura 12. Árbol filogenético de secuencias parciales del gen de la ADN polimerasa de las muestras positivas junto con otras secuencias representativas de la familia *Herpesviridae*. El árbol fue inferido por método de distancia y máxima verosimilitud con modelo GTR y soporte de nodos por aLRT (se muestran los valores > a 0.75). Las secuencias están identificadas por el N° de acceso del NCBI, nombre común de la especie que fue aislado, género y especie en caso de tratarse de murciélagos y las obtenidas en este trabajo resaltadas en rojo y con n° de referencia (LMM*).

6 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se procesaron un total de 71 muestras de saliva pertenecientes a murciélagos de 9 especies de las 3 familias presentes en Uruguay (Phyllostomidae, Molossidae y Vespertilionidae) colectadas en los departamentos de Artigas, Rivera, Rocha, Maldonado y Montevideo. 47 (66%) de los 71 de los individuos analizados mediante amplificación de una región conservada de la ADN polimerasa de Herpesvirus (HV) resultaron positivos para Beta- o Gammaherpesvirus y pertenecen a 8 especies: *Desmodus rotundus*, *Tadarida brasiliensis*, *Myotis spp*, *Eptesicus furinalis*, *Eptesicus diminutus*, *Molossops temminckii* y *Molossus molossus* y *Molossus rufus*.

Los extractos de material genómico fueron previamente procesados para la búsqueda de pneumo- y rhabdovirus, igualmente se detectó un alto porcentaje de HV en estas muestras.

Las muestras de saliva han demostrado ser una alternativa eficaz frente a las muestras de sangre que pueden resultar dolorosas y estresantes para los animales, y más complicados de tomar para el investigador. En cambio, las muestras de saliva para la obtención de ADN permiten que el manejo y la toma sea más fácil, es indoloro y no invasivo, y además la muestra es estable a temperatura ambiente en buffer adecuado para su conservación, lo que facilita el transporte. La mayoría de las detecciones reportadas en la literatura han sido a partir de muestras de sangre, por lo que se ha visto en aumento el número de HV gamma-linfotrópicos y BetaHV. Una expansión en la búsqueda de muestras como saliva o frotis de garganta y ganglios probablemente conduzca también a la detección de nuevos virus incluyendo AlfaHV [25] aunque no han sido reportados en este trabajo.

Previo a los análisis moleculares de las muestras, se realizó la propagación exitosa de una cepa de referencia de Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) en cultivo celular en monocapa de la línea Vero para usar como control positivo de referencia en la PCR. La extracción de ADN total del cultivo se realizó mediante dos métodos diferentes de extracción combinados con diferentes buffers (PBS y AVL®), con el fin de comparar rendimiento ya que las muestras procedentes del campo se conservaban en AVL®. A partir de la electroforesis obtenida de la prueba con los controles (figura 9), podemos concluir que los dos métodos de extracción (Trizol® y kit comercial) y la puesta a punto de la PCR funcionaron exitosamente, debido a que se pueden observar bandas correspondientes a los amplicones de entre 200 y 300 pb esperadas. Con respecto a la comparación de rendimiento, no hubo diferencia observable entre el método de Trizol® y Kit con las respectivas combinaciones de PBS y AVL® ya que se logró amplificar en todos los casos y las intensidades en las bandas fueron similares. Además, la secuencia génica obtenida para el control de HSV-1 nos confirma su identidad y garantiza el proceso de aislamiento y extracción del material genético.

La amplificación por PCR utilizando cebadores degenerados dirigidos a regiones conservadas de los genes del core, como el gen de la ADN polimerasa ha permitido el descubrimiento de nuevos HV. Esta región se encuentra flanqueada por motivos conservados y las diferencias de codificación de aminoácidos dentro de esta región para todas las especies de HV puede proporcionar una identificación de secuencias de ADN conocidas y nuevas [32]. Las 71 muestras fueron procesadas por PCR y secuenciación de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos, de éstas se obtuvo un alto número de muestras positivas

N=47, 66%. Las secuencias obtenidas permitieron a su vez identificar **27 (57%)** pertenecientes a la subfamilia Betaherpesvirinae y **20 (43%)** a los Gammaherpesvirinae. Los amplicones obtenidos son menores a 400 pb de largo, pero resultan de información suficiente y confiable para la caracterización a nivel de subfamilia. Para obtener una identificación a nivel de género sería necesario incluir más información de secuencia.

Como se mencionó antes la filogenia se construyó con las secuencias obtenidas en el presente estudio y otras reportadas previamente (figura 12). El árbol filogenético muestra que las secuencias se dividen en las 3 subfamilias de la familia Herpesviridae (Alfa-, Beta- y Gammaherpesvirinae), mostrando además una gran diversidad genética a la interna de cada grupo, con diferentes HV aislados de vertebrados de varias especies. Para garantizar la fiabilidad de las secuencias positivas y la correcta construcción del árbol, se puede observar que la secuencia control de HSV-1 (LMM10) cae dentro de la subfamilia Alfaherpesvirinae junto con otra secuencia de AlfaHV humano 1 (AF452491.1) descartando así una posible contaminación de las muestras.

Se pueden identificar diferentes clados independientes dentro de cada subfamilia (Beta y Gamma) sugiriendo distintas variantes de HV con divergencia variable (entre 70 y 80%, ver Figura 1 anexo) respecto a HV previamente descritos, que a su vez se corresponden con diferentes especies y/o localidades donde se tomaron las muestras.

Las secuencias obtenidas de *Desmodus rotundus* (LMM 2,3,5,8,49 y 50) corresponden todas a Gammaherpesvirus y son las únicas que se encuentran directamente emparentados con un HV-5 aislado de *Pteropus giganteus* (detectado de muestras de Bangladesh por Anthony y col. 2013b). Tanto en el alineamiento como en Blast, se observa que las mismas comparten un 96% de identidad de secuencia (figura 12 y Figura 1A anexo). Previamente Wray y col. reportaron un HV en *D. rotundus* de Guatemala con la misma identidad de secuencia que el aislado en *P.giganteus*. En su trabajo también encontraron una secuencia idéntica proveniente de muestras procedentes de Brasil en 2011. Esta similitud en las secuencias podría significar que, si bien las especies se encuentran muy distantes geográficamente, la región amplificada se encuentra muy conservada. Wray y col. sugieren que el descubrimiento de virus tan similares pero lejanos geográficamente y en murciélagos de especies distantes puede atribuirse a la dispersión de los HV en la naturaleza, alternativamente es posible que el reservorio de estos virus podrían no ser los murciélagos, sino algún vertebrado doméstico con amplia distribución geográfica u otro grupo de animales que también entre en contacto *D. rotundus* y *P. giganteus* [7].

Las muestras correspondientes a *Tadarida brasiliensis* y *Myotis sp* que fueron colectadas en el mismo refugio, en la Usina de Cuñapirú (Rivera) se encuentran distribuidas entre las subfamilias Beta- y Gammaherpesvirinae. Dentro de los pertenecientes a los GammaHV se destaca un grupo de virus de *T. brasiliensis* (LMM 17,24,25,22,14 y 28) que forman a un clado monofilético independiente. Las secuencias más cercanas corresponden a HV aislados de *Hipposideros larvatus* y *Rinolophus blythi* (KR261841 y 52) en China por Zheng, X.Y y col., sin embargo, considerando la homología observada cuando se analiza por

Blast (70-73%), es posible que nuestras secuencias correspondan a una variante diferente de HV (Figura 1B anexo).

Las secuencias de *T. brasiliensis* (LMM15) y *Myotis spp.* (LMM 42 y 39), se agrupan juntas con un alto soporte estadístico (1) representando variantes más ancestrales con respecto a los virus antes mencionadas. Estos murciélagos de dos especies diferentes fueron capturados en el mismo refugio, y se pueden encontrar formando grandes colonias mixtas, por lo que podría ocurrir transmisión de virus entre ellos. La secuencia *T. brasiliensis* (LMM 41) se encuentra junto con una secuencia de *Molossus rufus* (LMM 47) colectado en Artigas, estas secuencias se encuentran emparentadas mostrando un valor de soporte de 1. Además, comparten el mismo ancestro con las descritas para *D. rotundus*, pero no serían la misma variante viral, dado que se encuentran en clados separados, y pertenecen a localidades lejanas. A su vez, en el análisis de Blast, la secuencia con mayor homología (72,6%) corresponde a un GammaHV de *Neoromyia helios* (MF579868) (Figura 1C anexo).

Por último, dentro de la subfamilia Gammaherpesvirinae, las secuencias *T. brasiliensis* (LMM31) y *E. furinalis* (LMM13), se encuentran más divergentes con respecto a los otros GammaHV, en caso de la secuencia LMM31 el blast muestra homología con un HV del Gorila de la montaña (KU578070.1) con un 84% de identidad, y la LMM13 con un HV aislado de *Neoromicia helios* (MF579568.1) con un 79% de identidad (Figura 1 D y E respectivamente del anexo). Sin embargo, la topología de la filogenia las coloca divergentes y basales, además el fragmento en el cual se alinean es más corto. Para definir la posición definitiva de estas variantes es necesario obtener mayor información de secuencia.

Con respecto a la subfamilia Betaherpesvirinae, se pueden distinguir 3 variantes diferentes de HV asociadas a *Myotis sp* y *T. brasiliensis*. La primera correspondería al grupo de *Myotis spp.* (LMM 38,36,37,45,43) y un *T. brasiliensis* (LMM46) que conforman un grupo monofilético donde su secuencia más homóloga (70,5%) y con mayor cobertura corresponde a un HV aislado de *Tylonycteris robustula* (JQ814846.1) (Figura 1 F anexo).

La segunda variante correspondería al gran grupo compuesto por *T. brasiliensis* (LMM 26,19,33,30,27,32,35,18,23,21,16,34, y 20) y *Myotis sp* (LMM40). Este grupo tiene un soporte de 0,87 y aparece como hermano a dos secuencias de *Molossus molossus* y *Eptesicus furinalis*, pero con valor de aLRT no significativo. Si consideramos los resultados de Blast, la secuencia que muestra mayor homología (77%) y cobertura corresponde a un HV murino (Figura 1 G anexo).

Emparentados a este grupo se pueden observar otras variantes de BetaHV asociados a *M. molossus* (LMM 9) colectado en Rocha, el cual agrupa con LMM48 de un *E. furinalis* colectado en Montevideo, aunque este último parece ser más divergente al presentar un tamaño de rama más largo.

La tercera variante, está asociada a *T. brasiliensis* (LMM29) y *Myotis spp.* (LMM44), y son las más basales dentro de los virus de murciélagos en la subfamilia, sugiriendo que son ancestrales a otros BetaHV

analizados. Estos virus se agrupan emparentados a otros provenientes de murciélagos de Uruguay (*Molossops temminckii*, *Molossus molossus* y *Eptesicus diminutus*) pero separados por la localidad, dado que éstos últimos provienen de Artigas.

Al igual que en los GammaHV, de nuevo se observa una misma variante viral en murciélagos de diferente especie. En el caso de *Tadarida-Myotis* conviven en el mismo refugio (Usina de Cuñapirú- Rivera) y resultaron positivos para virus que aparecen indistintamente en cualquiera de las 2 especies. Además, en el mismo refugio hay circulación de varios clados de HV de Beta y Gamma. Debido al sesgo mencionado en materiales y métodos, donde en caso de coinfección solamente se detectará Gamma, se podría sugerir una posible coinfección de Gamma- BetaHV, y que este último es de circulación más frecuente debido a que hubo mayor cantidad de individuos positivos y/o que los GammaHV se encuentran en muy baja concentración para que la técnica no los detecte. Sin embargo, para confirmar esto habría que profundizar en los estudios para confirmar.

En el caso de *Molossus- Eptesicus* se distinguen diferentes variantes asociados a ellos. Incluso en aquellos casos que en nuestro análisis no comparten refugio, se ubican juntos en el árbol. Esto se puede explicar por ser, junto a *Tadarida* y *Myotis*, el otro par frecuente de murciélagos de diferentes especies que ecológicamente se encuentran muy asociados al compartir refugios como construcciones suburbanas, casas, cielos rasos, paredes dobles, etc. Sus secuencias se ubican juntas en el análisis viral incluso cuando provienen de lugares distintos, esto se puede interpretar de manera que la similitud ecológica está jugando un rol muy fuerte en la selectividad del virus. Ya que se infectan porque circulan en los mismos lugares y luego el virus circularía en la población de *Molossus- Eptesicus* como un complejo, sin importar la diferencia taxonómica entre ellos (Molossidos y Vespertilionidos diferentes familias alejadas taxonómicamente).

En ambos casos se puede observar una transmisión dentro de los refugios donde los diferentes tipos de contacto sirven como vectores y/o vehículos para la transmisión intra o interespecies confirmando que la simpatria dentro del orden taxonómico también puede ser un rasgo importante en la riqueza viral zoonótica [14, 17-20].

Por otro lado, a diferencia de los *Desmodus rotundus*, que son portadores de una única variante de GammaHV, los *Tadarida brasiliensis* presentarían una diversidad mayor de virus, cabe destacar que el número de muestras para esta especie es mayor al resto, por lo que sería necesario aumentar el N de las otras para hacer una mejor comparación. Los *T. brasiliensis* se encuentran distribuidos en ambas subfamilias y a su vez en diferentes clados dentro de ellas. De igual modo, los *Myotis spp.*, *Molossus molossus* y *Eptesicus furinalis* son portadores de diversas variantes virales, tanto dentro de los Gamma como de los Betaherpesvirinae.

En suma, este trabajo ha permitido identificar por primera vez a Herpesvirus en murciélagos del Uruguay. Donde se observó una gran diversidad genética, encontrándose murciélagos positivos de 8 especies

diferentes. Se identificó la presencia de un Gammaherpesvirus previamente descrito en la literatura como Guatemala tipo 1 (Wray y col.2016) en *Desmodus rotundus*. Asimismo, fue posible identificar otros Beta y Gammaherpesvirus que podrían ser potencialmente clasificados como nuevos HV de murciélagos, dada su posición en la filogenia y la divergencia de secuencia observada en la polimerasa viral. Estos se encontraron asociados fundamentalmente a *Tadarida brasiliensis* y *Myotis sp.* Para definir si efectivamente se trata de nuevos HV de murciélagos es necesario continuar con la caracterización genética de los mismos, obteniendo mayor información de secuencia.

Al igual que se da la propagación de HV entre murciélagos, también podrían estar ocurriendo en el mismo evento de contacto la transmisión de otros virus. Por lo tanto, la identificación de las especies que puedan actuar como posibles reservorios virales y las características de los patógenos asociados a ellos, así como los mecanismos de perpetuación, son clave para establecer un marco predictivo que permita controlar las enfermedades virales infecciosas emergentes y futuras especies reservorio [12,17].

Adicionalmente, durante el transcurso de esta tesis participé en diferentes salidas de campo hacia las Grutas de Salamanca- Maldonado donde se encuentra una gran colonia de vampiros (*D. rotundus*), los cuales se capturaron con redes de niebla colocadas en las entradas de los refugios y calderines en el interior de ellos. Luego de esto los individuos fueron manipulados en un laboratorio armado en el campo, donde se le tomaron muestras de saliva por hisopado bucal en conjunto con otros datos. Aunque estas muestras no fueron utilizadas en este trabajo, el procedimiento realizado fue el mismo que en los años 2013 y 2015 para las 71 muestras mencionadas anteriormente.

7 CONCLUSIONES

- Se logró generar control positivo de ADN viral representativo de la familia *Herpesviridae* a partir de la propagación de una cepa de HSV-1 en cultivo celular de línea Vero.
- Se obtuvo exitosamente la extracción de ADN total de la infección en cultivo celular utilizando dos métodos diferentes de extracción, resultando ambos igual de eficientes.
- Se puso a punto una PCR anidada contra una región conservada de la ADN polimerasa, que permite identificar y caracterizar a nivel de subfamilia (Alfa-, Beta- y Gammaherpesvirinae).
- Se buscó, detectó y caracterizó por primera vez en Uruguay herpesvirus en murciélagos autóctonos a partir de muestras de saliva.
- Las muestras de saliva demostraron ser una alternativa eficaz para la obtención de ácidos nucleicos, con un manejo fácil, indoloro y no invasivo.
- Se obtuvo un árbol filogenético con altos valores de soporte que permite distinguir las tres subfamilias y diferenciar entre ellas una gran diversidad y divergencia de Herpesvirus.
- La prevalencia de HV resultó de un 66% (N=47) en un total de 71 muestras que corresponden a 8 especies de quirópteros: *Tadarida brasiliensis*, *Myotis spp.*, *Desmodus rotundus*, *Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Eptesicus furinalis*, *Eptesicus diminutus*, y *Molossops temmincki*.
- De las 47 muestras positivas 27 muestras corresponden a Betaherpesvirinae y 20 a Gammaherpesvirinae, con una alta diversidad genética dentro de cada grupo.
- Las muestras de *Desmodus rotundus* son las únicas que se encuentran directamente emparentados con un HV-5 aislado de *Pteropus giganteus* con un 96% de homología de secuencia.
- Se identificaron posibles nuevos Beta- y Gammaherpesvirus asociados principalmente a *Tadarida brasiliensis*, *Myotis spp.*
- *Molossus molossus* y *Eptesicus furinalis* también resultaron ser portadores de diversas variantes virales, tanto dentro de los Gamma como de los Betaherpesvirinae.
- Este trabajo también pretende ser una primera aproximación a la relación entre virus y ecología de estos animales, utilizando herpesvirus como posible marcador de conectividad entre colonias de murciélagos en pro de su conservación.

8 PERSPECTIVAS A FUTURO

A partir de los resultados obtenidos, se crea un panorama nuevo de posibles estudios a futuro:

- a. Ampliar la visión general de los HV en murciélagos uruguayos, aumentar el número de muestras derivadas de individuos de diferentes especies provenientes de otras localidades del territorio donde se encuentran colonias ya reportadas. Además, tomar muestras de las localidades ya analizadas en diferentes tiempos para tener un estudio temporal de las variantes circulantes.
- b. Para llevar a cabo estudios ecológicos de análisis de conectividad se debería analizar mayor cantidad de muestras de las colonias que resultaron positivas para HV y usar más información de secuencia que permita distinguir variabilidad entre secuencias provenientes de la colonia y de otras cercanas para observar si existe flujo de individuos entre ellas.
- c. Ampliar el conocimiento sobre la diversidad viral en estos animales, analizar otras familias virales para contar con un relevamiento amplio y general en las especies autóctonas de nuestro país sobre los posibles virus circundantes.
- d. Utilizar los resultados obtenidos para poder establecer estrategias de trabajo rápidas, eficientes y que causen el menor sufrimiento animal, esto con respecto a la utilización de kits de extracción que permiten obtener material genético tanto de ADN y ARN a partir de muestras de saliva por hisopado bucal.

9 BIBLIOGRAFIA

1. Smith, I. & Wang, L. F. (2013). Bats and their virome: An important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* **3**, 84–91.
2. 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>
3. Vigilato, M. A., Cosivi, O., Knöbl, T., Clavijo, A., & Silva, H. M. (2013). Rabies update for Latin America and the Caribbean. *Emerging infectious diseases*, *19*(4), 678–679. doi:10.3201/eid1904.121482
4. Schneider, M. C. y col. (2009) *Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America?* *Revista Panamericana de Salud Pública* *25*, 260-269.
5. Thomas H. Kunz and Stuart Parsons. (2009) *Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats* 2nd ed.
6. Enrique M González y Juan A. Martínez-Lafranco. (2012) *Mamíferos de Uruguay* 2da ed.
7. Wray, A. K., Olival, K. J., Morán, D., Lopez, M. R., Alvarez, D., Navarrete-Macias, I., Anthony, S. J. y col. (2016). Viral Diversity, Prey Preference, and Bartonella Prevalence in *Desmodus rotundus* in Guatemala. *EcoHealth*, *13*(4), 761–774. <https://doi.org/10.1007/s10393-016-1183-z>
8. Sasaki, M., Setiyono, A., Handharyani, E., Kobayashi, S., Rahmadani, I., Taha, S., ... Kimura, T. (2014). Isolation and Characterization of a Novel Alpha herpesvirus in Fruit Bats. *Journal of Virology*, *88*(17), 9819–9829. <https://doi.org/10.1128/JVI.01277-14>
9. Salmier, A., Tirera, S., Thoisy, B. De, Franc, A., Darcissac, E., Donato, D., ... Lavergne, A. (2017). *Virome analysis of two sympatric bat species (Desmodus rotundus and Molossus molossus) in French Guiana*. Pdf, 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186943>
10. Zhang, H., Todd, S., Tachedjian, M., Barr, J. A., Luo, M., Yu, M., ... Wang, L.-F. (2012). A Novel Bat Herpesvirus Encodes Homologues of Major Histocompatibility Complex Classes I and II, C-Type Lectin, and a Unique Family of Immune-Related Genes. *Journal of Virology*, *86*(15), 8014–8030. <https://doi.org/10.1128/JVI.00723-12>
11. Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., Wang, L. (2005). Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses, *310*(October), 676–679.
12. Botto Nuñez, G., E.M. González & A.L. Rodales. (2019). Conservación de los murciélagos (Mammalia: Chiroptera) de Uruguay: estado actual y perspectivas. *Mastozoología Neotropical* *26*(1). DOI: 10.31687/saremMN.19.26.1.0.05
13. Voigt, C. C., & Kingston, T. (2015). *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bat in a Changing World* . Retrieved from <http://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-319-25220-9>
14. Jones, G., Jacobs, D. S., Kunz, T. H., Wilig, M. R., & Racey, P. A. (2009). Carpe noctem: The importance of bats as bioindicators. *Endangered Species Research*, *8*(1–2), 93–115. <https://doi.org/10.3354/esr00182>
15. Julio C. Gonzalez (1989). *Guía para la identificación de los murciélagos del Uruguay*.

16. Botto, German. (2010). *Detección de anticuerpos antirrábicos en quirópteros silvestres de Uruguay: un aporte a la vigilancia epidemiológica de Rabia Silvestre*. Tesis de grado, Facultad de Ciencias - Universidad de la República.
17. Luis, A. D., Hayman, D. T., O'Shea, T. J., Cryan, P. M., Gilbert, A. T., Pulliam, J. R., ... Webb, C. T. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special?. *Proceedings. Biological sciences*, 280(1756), 20122753. doi:10.1098/rspb.2012.2753
18. 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. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>
19. Serra-Cobo J., López-Roig M. (2016) Bats and Emerging Infections: An Ecological and Virological Puzzle. In: Rezza G., Ippolito G. (eds) *Emerging and Re-emerging Viral Infections*. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 972. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/5584_2016_131.
20. Pulliam, Juliet R. C. Epstein, Jonathan H. Dushoff, J., Rahman, Sohayati A. Bunning, M., Jamaluddin, A. A., Hyatt, A. D., Field, H. E., Dobson, A. P., & Daszak, P. (2011). Agricultural intensification, priming for persistence and the emergence of Nipah virus: a lethal bat-borne zoonosis. *Journal of The Royal Society Interface*, (June 2011), 89–101.
21. Schountz, T. (2014). Immunology of bats and their viruses: Challenges and opportunities. *Viruses*, 6(12), 4880–4901. <https://doi.org/10.3390/v6124880>
22. Shea, T. J. O., Cryan, P. M., Cunningham, A. A., Fooks, A. R., Hayman, D. T. S., Luis, A. D., ... Wood, J. L. N. (2014). HRP450bw.PDF, 20(5), 741–745. <https://doi.org/10.3201/eid2005.130539>
23. Plowright, R. K., Eby, P., Hudson, P. J., Smith, I. L., Westcott, D., Bryden, W. L., McCallum, H. (2015). Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proceedings. Biological sciences*, 282(1798), 20142124. doi:10.1098/rspb.2014.2124
24. *Viral Zone- Herpesviridae*. https://viralzone.expasy.org/176?outline=all_by_species
25. David M. Knipe, Peter M. (2013) *Howley Fields virology– 6th ed. Pages 1802 to 1822 Herpesviridae*.
26. Davison, A. J., Trus, B. L., Cheng, N., Steven, A., Watson, M. S., Cunningham, C., ... Renault, T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology*, 86(1), 41–53. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80382-0>
27. Davison, A., & Hayward, G. S. (2005). Taxonomic Proposals From the Herpesviridae Study Group. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1–20.
28. Mattera, A., & Barrios, P. (n.d.). Capítulo 30. Herpesvirus. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 7(Cmv), 535–566.
29. Organización Mundial de la Salud (OMS) - <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/herpes/es/>
30. Elena Canepa. (2015). HERPESVIRUS Elena Cánepa GENERALIDADES, 3(1), 23.
31. Juan Arbiza & José C. Russi. (2002) *Virus al acecho*. Ediciones Universitarias De Ciencias (EUDECI). Editorial Fin de Siglo.

32. Vandevanter, D. R., Warrener, P., Bennett, L., Schultz, E. R., Coulter, S., Garber, R. L., & Rose, T. M. (1996). Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(7), 1666–1671.
33. Malta, L. (2017). *Detección molecular de rhabdovirus y pneumovirus en murciélagos del Uruguay*. Tesis de grado, Facultad de Ciencias -Universidad de la República.
34. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. *Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol.* 1990 Mar;28(3):495-503.
35. Dissertation proposal: PhD in Immunology and Infectious Diseases Effect of landscape fragmentation in bat population dynamics and disease persistence in Uruguay Germán Botto Nuñez – Plowright Lab, MBI-MSU. (n.d.).
36. Agnarsson I, Zambrana-Torrel CM, Flores-Saldana NP, May-Collado LJ. A time-calibrated species-level phylogeny of bats (Chiroptera, Mammalia). *PLoS Curr.* 2011;3:RRN1212. Published 2011 Feb 4. doi:10.1371/currents.RRN1212
37. McGeoch, D. J., Dolan, A., & Ralph, A. C. (2000). Toward a Comprehensive Phylogeny for Mammalian and Avian HVes. *Journal of Virology*, 74(22), 10401–10406. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.22.10401-10406.2000>
38. S.J. Flint y col. (2015) *Principles of virology*, 4th ed.
39. Cassar, O., Afonso, P. V., Bassot, S., Plancoulaine, S., Duprez, R., Capuano, C., ... Gessain, A. (2007). Novel human herpesvirus 8 subtype D strains in Vanuatu, Melanesia. *Emerging infectious diseases*, 13(11), 1745–1748. doi:10.3201/eid1311.070636
40. Escalera, M., Rojas, E., Sergios, K., Taboada, B., Loza, E., Mendez, M., Greenwood, A. (2016). Bats, Primates, and the Evolutionary Origins and Diversification of Mammalian Gammaherpesviruses. *MBio*, 7(6), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.01425-16>.Invited
41. 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>
42. 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>
43. 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.
44. Bergner, L. M., Orton, R. J., da Silva Filipe, A., Shaw, A. E., Becker, D. J., Tello, C., Streicker, D. G. (2018). Using noninvasive metagenomics to characterize viral communities from wildlife. *Molecular Ecology Resources*, (April). <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12946>
45. Teeling, E. C., Vernes, S. C., Dávalos, L. M., Ray, D. A., Gilbert, M. T. P., Myers, E., & Bat1K Consortium. (2018). Bat Biology, Genomes, and the Bat1K Project: To Generate Chromosome-Level Genomes for All Living Bat Species. *Annual Review of Animal Biosciences*, 6, 23–46. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022811>

46. Guarino H, Castilho JG, Souto J, Oliveira R de N, Carrieri ML, et al. (2013) Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Uruguay. *Virus Res*;173:415–420.

10 ANEXO

Tabla 1 Anexo. Se muestra los rangos de temperatura alcanzados durante el vuelo para algunas especies de murciélagos.

| Bat species (family) | Core temperature during flight, °C |
|--|------------------------------------|
| <i>Eidolon helvum</i> (Pteropidae) | 36.9–40.8 |
| <i>Hypsignathus monstrosus</i> (Pteropidae) | 37.2–40.0 |
| <i>Rousettus aegyptiacus</i> (Pteropidae) | 38.2–41.2 |
| <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> (Rhinolophidae) | 41† |
| <i>Miniopterus</i> sp. (Miniopteridae) | 41.1 ± 0.45 |
| <i>Phyllostomus hastatus</i> (Phyllostomidae) | 41.2–42.1 |
| <i>Carollia perspicillata</i> (Phyllostomidae) | 40.2 ± 0.8 |
| <i>Artibeus lituratus</i> (Phyllostomidae) | c. 41.2 ± 1 |
| <i>Stumira lilium</i> (Phyllostomidae) | c. 40.5 ± 0.3 |
| <i>Noctilio albiventris</i> (Noctilionidae) | 35.5–40.6 |
| <i>Myotis yumanensis</i> (Vespertilionidae) | 40.0–40.8 |
| <i>Eptesicus fuscus</i> (Vespertilionidae) | 41.3 ± 2.1†, 37–39.5‡ |
| <i>Mops condylurus</i> (Molossidae) | 40.5 ± 1.1 |
| <i>Tadarida brasiliensis</i> (Molossidae) | 35–42 |
| <i>Eumops perotis</i> (Molossidae) | 37.8–39.3 |
| <i>Myotis volans</i> (Vespertilionidae) | 37.4 |
| <i>Myotis evotis</i> (Vespertilionidae) | 38.3 |
| <i>Myotis californicus</i> (Vespertilionidae) | 38.4 |
| <i>Parastrellus hesperus</i> (Vespertilionidae) | 38.8 |
| <i>Eptesicus fuscus</i> (Vespertilionidae) | 41.0 |
| <i>Lasiurus cinereus</i> (Vespertilionidae) | 40.2 |
| <i>Antrozous pallidus</i> (Vespertilionidae) | 40.6 |
| <i>Tadarida brasiliensis</i> (Molossidae) | 38.0 |

*Data available from original sources are given as ranges or means ±1 SD.
†Skin temperature.
‡Body temperature.

Extraído de O'Shea y col.2014 [22].

Tabla 2 Anexo. Listado de las extracciones de las muestras de saliva, se muestran las Positivas (POS) y negativas (NEG) para PCR, código de secuencia y captura, especie, sexo, edad, localidad y fecha que fueron colectadas. Por último, se muestran los resultados de homología en BLAST.

| N° | PCR | Código | Muestra | Especie | Sexo | Edad | Localidad | Fecha | Blast |
|----|------------|------------|-------------|------------------------------|------|---------|--|-----------|--|
| 1 | POS | LMM1 | 8 | <i>Molossus molossus</i> | M | Juvenil | Colonia Juan Pablo Terra. Ruta 30 Km 108. 32 km al Oeste de Artigas. Dpto Artigas. | 2/23/2013 | Bat herpesvirus isolate CS/14GZ13 DNA polymerase gene, partial cds KR261896.1 |
| 2 | NEG | | S001 | <i>Desmodus rotundus</i> | M | Adulto | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | 4/13/2013 | |
| 3 | No se hizo | | 7 | <i>Eptesicus diminutus</i> | M | Adulto | Colonia Juan Pablo Terra. Ruta 30 Km 108. 32 km al Oeste de Artigas. Dpto Artigas. | 2/23/2013 | |
| 4 | POS | LMM2 | S008 | <i>Desmodus rotundus</i> | M | Adulto | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | 4/13/2013 | Unidentified herpesvirus isolate PqHV-5 DNA polymerase gene, partial cds KC692447.1 |
| 5 | POS | LMM3 | S006 | <i>Desmodus rotundus</i> | M | Adulto | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | 4/13/2013 | Unidentified herpesvirus isolate PqHV-5 DNA polymerase gene, partial cds KC692447.1 |
| 6 | POS | LMM4 | 14 | <i>Molossus molossus</i> | M | Adulto | Establecimiento Loma Alta - Nuevo Manantial. Ruta 9 Km 241. Dpto Rocha. | | secuencia de mala calidad |
| 7 | NEG | | S004 | <i>Desmodus rotundus</i> | M | Juvenil | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | 4/13/2013 | |
| 8 | NEG | | S010 | <i>Desmodus rotundus</i> | M | Adulto | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | 4/13/2013 | |
| 9 | POS | LMM5 | S005 | <i>Desmodus rotundus</i> | M | Adulto | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | 4/13/2013 | Unidentified herpesvirus isolate PqHV-5 DNA polymerase gene, partial cds KC692447.1 |
| 10 | POS | LMM6 | 13 | <i>Molossus molossus</i> | M | Adulto | Establecimiento Loma Alta - Nuevo Manantial. Ruta 9 Km 241. Dpto Rocha. | | Bat herpesvirus isolate RB/13H166 DNA polymerase gene, partial cds KR261896.1 |
| 11 | NEG | | 6 | <i>Myotis sp.</i> | H | Adulto | Colonia Juan Pablo Terra. Ruta 30 Km 108. 32 km al Oeste de Artigas. Dpto Artigas. | | |
| 12 | NEG | | 15 | <i>Eptesicus funnalis</i> | M | Adulto | Establecimiento Loma Alta - Nuevo Manantial. Ruta 9 Km 241. Dpto Rocha. | | |
| 13 | NEG | | S002 | <i>Desmodus rotundus</i> | M | Juvenil | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | 4/13/2013 | |
| 14 | POS | LMM7 | 4 | <i>Molossops temminckii</i> | M | Adulto | Colonia Juan Pablo Terra. Ruta 30 Km 108. 32 km al Oeste de Artigas. Dpto Artigas. | | Bat herpesvirus isolate CS/14GZ13 DNA polymerase gene, partial cds KR261896.1 |
| 15 | NEG | | S007 | <i>Desmodus rotundus</i> | M | Adulto | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | 4/13/2013 | |
| 16 | POS | LMM8 | S009 | <i>Desmodus rotundus</i> | M | Adulto | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | 4/13/2013 | Unidentified herpesvirus isolate PqHV-5 DNA polymerase gene, partial cds KC692447.1 |
| 17 | NEG | | 5 | <i>Molossops temminckii</i> | H | Juvenil | Colonia Juan Pablo Terra. Ruta 30 Km 108. 32 km al Oeste de Artigas. Dpto Artigas. | | |
| 18 | NEG | | S003 | <i>Desmodus rotundus</i> | M | Adulto | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | 4/13/2013 | |
| 19 | POS | LMM9 | 12 | <i>Molossus molossus</i> | H | Adulto | Establecimiento Loma Alta - Nuevo Manantial. Ruta 9 Km 241. Dpto Rocha. | | Unidentified herpesvirus isolate PqHV-12 DNA polymerase gene, partial cds KC692438.1 |
| 20 | NEG | | 3 | <i>Myotis sp.</i> | M | Adulto | Colonia Juan Pablo Terra. Ruta 30 Km 108. 32 km al Oeste de Artigas. Dpto Artigas. | 2/23/2013 | |
| 21 | NEG | | 2 | <i>Eptesicus funnalis</i> | H | Juvenil | Colonia Juan Pablo Terra. Ruta 30 Km 108. 32 km al Oeste de Artigas. Dpto Artigas. | 2/23/2013 | |
| 22 | NEG | | 1 | <i>Eumops bonariensis</i> | M | Adulto | Colonia Juan Pablo Terra. Ruta 30 Km 108. 32 km al Oeste de Artigas. Dpto Artigas. | 2/23/2013 | |
| 23 | POS | LMM11 Y 12 | 9 | <i>Eptesicus diminutus</i> | M | Adulto | Colonia Juan Pablo Terra. Ruta 30 Km 108. 32 km al Oeste de Artigas. Dpto Artigas. | 2/23/2013 | Bat herpesvirus isolate CS/14GZ13 DNA polymerase gene, partial cds KR261896.1 |
| 24 | NEG | | 11 | <i>Eptesicus funnalis</i> | M | Adulto | Establecimiento Loma Alta - Nuevo Manantial. Ruta 9 Km 241. Dpto Rocha. | | |
| 25 | POS | LMM13 | 10 | <i>Eptesicus funnalis</i> | H | Adulto | Colonia Juan Pablo Terra. Ruta 30 Km 108. 32 km al Oeste de Artigas. Dpto Artigas. | | Nyctalus leisleri gammaherpesvirus 1 strain psc-29 DNA polymerase gene, partial cds KR608299.1 |
| 26 | POS | LMM14 | 100 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | | | | | Bat herpesvirus isolate HL/11HV1 DNA polymerase gene, partial cds KR261841.1 |
| 27 | POS | LMM15 | B1509 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | H | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Trichechid herpesvirus 1 DNA-dependent DNA polymerase (pol) gene, partial cds DQ238847.2 |
| 28 | POS | LMM16 | B1512 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Murine herpesvirus isolate LIB008 DNA polymerase (pol) gene, partial cds KF155695.1 |
| 29 | NEG | | B1513 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | H | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | |
| 30 | POS | LMM17 | B1514 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Murine herpesvirus isolate LIB008 DNA polymerase (pol) gene, partial cds KF155695.1 |
| 31 | POS | LMM18 | B1515 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Murine herpesvirus isolate LIB008 DNA polymerase (pol) gene, partial cds KF155695.1 |
| 32 | NEG | | B1516 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | |
| 33 | POS | LMM19 | B1519 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Murine herpesvirus isolate LIB008 DNA polymerase (pol) gene, partial cds KF155695.1 |
| 34 | POS | LMM20 | B1520 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Murine herpesvirus isolate LIB008 DNA polymerase (pol) gene, partial cds KF155695.1 |
| 35 | POS | LMM21 | B1521 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Acornus herpesvirus SVMS 226 222 DNA polymerase gene, partial cds HQ87045.1 Y Murine KF155695.1 |
| 36 | POS | LMM22 | B1522 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Bat herpesvirus isolate HL/11HV1 DNA polymerase gene, partial cds KR261841.1 |
| 37 | POS | LMM23 | B1523 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Gammaherpesvirinae sp. isolate DD-230-2012 DNA polymerase (DNA-pol) gene, partial cds MG437209.1 |
| 38 | POS | LMM24 | B1501 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Bat herpesvirus isolate RB/13YF84 DNA polymerase gene, partial cds KR261887.1 |
| 39 | POS | LMM25 | B1502 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Bat herpesvirus isolate RB/13YF84 DNA polymerase gene, partial cds KR261887.1 Y KR261841 |
| 40 | POS | LMM26 | B1503 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Murine herpesvirus isolate LIB008 DNA polymerase (pol) gene, partial cds KF155695.1 |
| 41 | POS | LMM27 | B1504 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Murine herpesvirus isolate LIB008 DNA polymerase (pol) gene, partial cds KF155695.1 |
| 42 | POS | LMM28 | B1505 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Bat herpesvirus isolate HL/11HV1 DNA polymerase gene, partial cds KR261841.1 |
| 43 | POS | LMM29 | B1506 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Bat herpesvirus isolate RM16GZY473 DNA polymerase-like protein gene, partial cds KJ987269.1 |
| 44 | POS | LMM30 | B1507 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Murine herpesvirus isolate LIB008 DNA polymerase (pol) gene, partial cds KF155695.1 |
| 45 | POS | LMM31 | B1508 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | H | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Gonilla beringsi beringsi rhadinovirus 1 DNA polymerase (DPO1) gene, partial cds KU578070.1 |
| 46 | POS | LMM32 | B1510 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Acornus herpesvirus SVMS 226 222 DNA polymerase gene, partial cds Murine herpesvirus isolate LIB008 DNA polymerase (pol) gene, partial cds |
| 47 | POS | LMM33 | B1511 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Acornus herpesvirus SVMS 226 222 DNA polymerase gene, partial cds Murine herpesvirus isolate LIB008 DNA polymerase (pol) gene, partial cds |
| 48 | POS | LMM34 | B1517 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | M | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Murine herpesvirus isolate LIB008 DNA polymerase (pol) gene, partial cds KF155695.1 |
| 49 | POS | LMM35 | B1518 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | H | Adulto | Usina Cuiñapirí, Ruta 29. 15 km WNW de Minas de Corrales. Dpto. Rivera. | 7/19/2015 | Acornus herpesvirus SVMS 226 222 DNA polymerase gene, partial cds Murine herpesvirus isolate LIB008 DNA polymerase (pol) gene, partial cds |
| 50 | NEG | | B1524 | <i>Myotis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | |
| 51 | NEG | | C993 | <i>Myotis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | |
| 52 | POS | LMM36 | B1533 | <i>Myotis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | Tyloniactis robustula herpesvirus 1 glycoprotein B (gB) gene, complete cds; and DNA polymerase (pol) gene, partial cds JQ814845.1 |
| 53 | POS | LMM37 | B1534 | <i>Myotis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | Myotis caltheae betaherpesvirus 1 strain psc-17 DNA polymerase gene, partial cds KR608287.1 |
| 54 | POS | LMM38 | B1525 | <i>Myotis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | Myotis caltheae betaherpesvirus 1 strain psc-17 DNA polymerase gene, partial cds KR608287.1 |
| 55 | POS | LMM39 | C995 | <i>Myotis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | Gammaherpesvirinae sp. isolate DD-105-2011 DNA polymerase (DNA-pol) gene, partial cds MG437203.1 |
| 56 | NEG | | B1532 | <i>Myotis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | |
| 57 | NEG | | C948 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | |
| 58 | POS | LMM40 | C994 | <i>Myotis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | Murine herpesvirus isolate LIB008 DNA polymerase (pol) gene, partial cds KF155695.1 |
| 59 | POS | LMM41 | C991 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | Gammaherpesvirinae sp. strain BtHV11eoV13 DNA polymerase gene, partial cds MFS78968.1 |
| 60 | POS | LMM42 | B1531 | <i>Myotis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | Trichechid herpesvirus 1 DNA-dependent DNA polymerase (pol) gene, partial cds DQ238847.2 |
| 61 | NEG | | B1527 | <i>Myotis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | |
| 62 | POS | LMM43 | B1526 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | Myotis caltheae betaherpesvirus 1 strain psc-17 DNA polymerase gene, partial cds KR608287.1 |
| 63 | POS | LMM44 | B1530 | <i>Myotis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | |
| 64 | POS | LMM45 | C992 | <i>Myotis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | Myotis caltheae betaherpesvirus 1 strain psc-17 DNA polymerase gene, partial cds KR608287.1 |
| 65 | POS | LMM46 | B1528 | <i>Tadarida brasiliensis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | Myotis caltheae betaherpesvirus 1 strain psc-17 DNA polymerase gene, partial cds KR608287.1 |
| 66 | NEG | | C997 | <i>Myotis</i> | H | Adulto | Usina de Cuiñapirí, Ruta 29. Dpto. Rivera. Uruguay | 7/19/2015 | |
| 67 | POS | LMM47 | M. rufus | <i>Molossus rufus</i> | | | Capilla Pueblo Cuareim. Ruta 3, 4 Km al Norte de Bella Unión. Artigas. | | Gammaherpesvirinae sp. strain BtHV11eoV13 DNA polymerase gene, partial cds MFS78968.1 |
| 68 | POS | LMM48 | E. funnalis | <i>E. funnalis</i> | M | | Montevideo, Jardín Botánico | | Mund betaherpesvirus 1 isolate s09_sc3086, complete genome MH118555.1 |
| 69 | NEG | | DES H01 | <i>Desmodus rotundus</i> | H | | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | | |
| 70 | ***** | | DES H02 | <i>Desmodus rotundus</i> | H | | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | | |
| 71 | ***** | | DES H03 | <i>Desmodus rotundus</i> | H | | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | | |
| 72 | POS | LMM49 | DES H04 | <i>Desmodus rotundus</i> | H | | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | | Unidentified herpesvirus isolate PqHV-5 DNA polymerase gene, partial cds KC692447.1 |
| 73 | POS | LMM50 | DES M05 | <i>Desmodus rotundus</i> | M | | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | | Unidentified herpesvirus isolate PqHV-5 DNA polymerase gene, partial cds KC692447.1 |
| 74 | ***** | | DES M06 | <i>Desmodus rotundus</i> | M | | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | | |
| 75 | ***** | | DES M07 | <i>Desmodus rotundus</i> | M | | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | | |
| 76 | NEG | | DES M08 | <i>Desmodus rotundus</i> | M | | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | | |
| 77 | ***** | | DES M09 | <i>Desmodus rotundus</i> | M | | Grutas de Salamanca, Sierras de Sosa. 20 Km al SO de Aiguá. Dpto Maldonado. | | |

Figura 1 Anexo. Resultados representativos de los alineamientos obtenidos en BLAST, aparecen como resultado las secuencias con las que presentan mayor homología. **(A)** *Desmodus rotundus* (LMM50); **(B)** *Tadarida brasiliensis* (LMM25); **(C)** *Molossus rufus* (LMM47); **(D)** *Tadarida brasiliensis* (LMM31); **(E)** *Eptesicus furinalis* (LMM13); **(F)** *Myotis spp.* (LMM45); **(G)** *Tadarida brasiliensis* (LMM16)

A

Sequences producing significant alignments:

LMM50

Desmodus rotundus

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

| Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results | | | | | | |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
| <input type="checkbox"/> Unidentified herpesvirus isolate PgHV-5 DNA polymerase gene, partial cds | 343 | 343 | 90% | 4e-90 | 96.62% | KC692447.1 |
| <input type="checkbox"/> Shrew herpesvirus isolate SM15GZBY425 DNA polymerase-like protein gene, partial cds | 113 | 113 | 55% | 4e-21 | 79.53% | KX987261.1 |
| <input type="checkbox"/> Hedgehog herpesvirus isolate XT773-13 DNA polymerase gene, partial cds | 112 | 160 | 68% | 1e-20 | 78.74% | MG253640.1 |
| <input type="checkbox"/> Shrew herpesvirus isolate SM15GZBY390 DNA polymerase-like protein gene, partial cds | 108 | 108 | 55% | 2e-19 | 78.74% | KX987262.1 |
| <input type="checkbox"/> Shrew herpesvirus isolate SM15GZBY384 DNA polymerase-like protein gene, partial cds | 108 | 108 | 55% | 2e-19 | 78.74% | KX987260.1 |
| <input type="checkbox"/> Shrew herpesvirus isolate SM15GZBY378 DNA polymerase-like protein gene, partial cds | 108 | 154 | 68% | 2e-19 | 78.74% | KX987257.1 |
| <input type="checkbox"/> Unidentified herpesvirus isolate SM14BY7 DNA polymerase (DPOL) gene, partial cds | 108 | 108 | 55% | 2e-19 | 78.74% | KT591387.1 |

B

Sequences producing significant alignments:

LMM25

Tadarida brasiliensis

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

| Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results | | | | | | |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
| <input type="checkbox"/> Bat herpesvirus isolate HL/11HN1 DNA polymerase gene, partial cds | 130 | 130 | 91% | 5e-26 | 73.06% | KR261841.1 |
| <input type="checkbox"/> Bat herpesvirus isolate RB/13YF84 DNA polymerase gene, partial cds | 125 | 125 | 91% | 6e-25 | 72.60% | KR261887.1 |
| <input type="checkbox"/> Bat herpesvirus isolate HP/11HN110 DNA polymerase gene, partial cds | 108 | 108 | 55% | 2e-19 | 78.03% | KR261845.1 |
| <input type="checkbox"/> Bat herpesvirus isolate RB/13HN56 DNA polymerase gene, partial cds | 102 | 102 | 91% | 7e-18 | 70.91% | KR261852.1 |
| <input type="checkbox"/> Bat herpesvirus isolate MS/12HN28 DNA polymerase gene, partial cds | 97.8 | 97.8 | 91% | 3e-16 | 70.45% | KR261851.1 |
| <input type="checkbox"/> Bat herpesvirus isolate MS/11HN95 DNA polymerase gene, partial cds | 97.8 | 97.8 | 91% | 3e-16 | 70.45% | KR261846.1 |
| <input type="checkbox"/> Hedgehog herpesvirus isolate XT773-13 DNA polymerase gene, partial cds | 95.1 | 138 | 65% | 1e-15 | 76.67% | MG253640.1 |
| <input type="checkbox"/> Myotis gammaherpesvirus 8 strain My-HV8/Myotis velifer incautus/USA/FCGHV/2011, partial genome | 93.3 | 93.3 | 54% | 3e-15 | 75.57% | KU220026.1 |
| <input type="checkbox"/> Elephant gammaherpesvirus 3B isolate NAG16 DNA polymerase (U38) gene, partial cds | 90.6 | 90.6 | 58% | 4e-14 | 74.82% | KJ726839.1 |
| <input type="checkbox"/> Elephant gammaherpesvirus 3B isolate NAG15 DNA polymerase (U38) gene, partial cds | 90.6 | 90.6 | 58% | 4e-14 | 74.82% | KJ726838.1 |

C

Sequences producing significant alignments:

LMM47

Molossus rufus

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

| Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results | | | | | | |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
| <input type="checkbox"/> Gammaherpesvirinae sp. strain BiHVNeoV13 DNA polymerase gene, partial cds | 123 | 123 | 98% | 7e-24 | 72.65% | MF579868.1 |
| <input type="checkbox"/> Gammaherpesvirinae sp. strain BiHVNeoV10 DNA polymerase gene, partial cds | 123 | 123 | 98% | 7e-24 | 72.65% | MF579867.1 |
| <input type="checkbox"/> Phocid herpesvirus 6 isolate PhiHV-6nt DNA-dependent DNA polymerase gene, partial cds | 104 | 104 | 53% | 2e-18 | 79.17% | JX244194.1 |
| <input type="checkbox"/> Unidentified herpesvirus isolate PgHV-5 DNA polymerase gene, partial cds | 103 | 103 | 51% | 6e-18 | 80.17% | KC692447.1 |
| <input type="checkbox"/> Vombatid gammaherpesvirus 1 strain V3187/11, partial genome | 91.5 | 91.5 | 44% | 1e-14 | 80.00% | MG452721.1 |
| <input type="checkbox"/> Bat herpesvirus isolate HL/11HN1 DNA polymerase gene, partial cds | 90.6 | 90.6 | 47% | 4e-14 | 78.50% | KR261841.1 |

D

Sequences producing significant alignments:

LMM31

Tadarida brasiliensis

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

| Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| <input type="checkbox"/> Gorilla beringei beringei rhadinovirus 1 DNA polymerase (DPOL) gene, partial cds | 80.6 | 127 | 43% | 2e-11 | 83.78% | KU578070.1 |
| <input type="checkbox"/> Hipposideros diadema herpesvirus gB, DPOL genes for glycoprotein B, DNA polymerase, partial cds | 73.4 | 73.4 | 32% | 3e-09 | 81.33% | AB490083.2 |
| <input type="checkbox"/> Canid herpesvirus 1 DNA polymerase gene, partial cds | 69.8 | 69.8 | 42% | 4e-08 | 75.51% | EU531507.1 |
| <input type="checkbox"/> Microtus agrestis rhadinovirus 1 glycoprotein B (gB) and DNA polymerase (DPOL) genes, partial cds | 69.8 | 69.8 | 29% | 4e-08 | 82.35% | EF128052.1 |
| <input type="checkbox"/> Human herpesvirus 8 strain ZM004, partial genome | 68.9 | 68.9 | 32% | 1e-07 | 80.00% | KT271453.1 |
| <input type="checkbox"/> Macaca fuscata rhadinovirus isolate 12E2, complete genome | 67.1 | 67.1 | 32% | 5e-07 | 79.73% | JN885137.1 |
| <input type="checkbox"/> Macaca fuscata rhadinovirus isolate 3A1, complete genome | 67.1 | 67.1 | 32% | 5e-07 | 79.73% | JN885136.1 |
| <input type="checkbox"/> Rupicapra rupicapra gammaherpesvirus 1 glycoprotein B (gB) and DNA polymerase (DPOL) genes, partial cds | 67.1 | 67.1 | 32% | 5e-07 | 79.73% | DQ789369.2 |

E

Sequences producing significant alignments:

LMM13

Eptesicus furinalis

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

| Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| <input type="checkbox"/> Nyctalus leisleri gammaherpesvirus 1 strain psc-29 DNA polymerase gene, partial cds | 117 | 117 | 94% | 2e-22 | 76.43% | KR608299.1 |
| <input type="checkbox"/> Gammaherpesvirinae sp. strain BtHVNeoV13 DNA polymerase gene, partial cds | 113 | 113 | 78% | 2e-21 | 79.23% | MF579868.1 |
| <input type="checkbox"/> Hedgehog herpesvirus isolate XT773-13 DNA polymerase gene, partial cds | 109 | 109 | 74% | 3e-20 | 78.86% | MG253640.1 |
| <input type="checkbox"/> Gammaherpesvirinae sp. strain BtHVNeoV10 DNA polymerase gene, partial cds | 109 | 109 | 78% | 3e-20 | 78.46% | MF579867.1 |
| <input type="checkbox"/> Elk gammaherpesvirus isolate S249 DNA polymerase (DPOL) gene, partial cds | 101 | 101 | 77% | 2e-17 | 77.34% | KY612411.1 |
| <input type="checkbox"/> Bat herpesvirus isolate SK/13YF153 DNA polymerase gene, partial cds | 101 | 101 | 83% | 2e-17 | 76.09% | KR261869.1 |
| <input type="checkbox"/> Bat herpesvirus isolate SK/13YF146 DNA polymerase gene, partial cds | 101 | 101 | 83% | 2e-17 | 76.09% | KR261865.1 |
| <input type="checkbox"/> Bat herpesvirus isolate SK/13YF143 DNA polymerase gene, partial cds | 101 | 101 | 83% | 2e-17 | 76.09% | KR261864.1 |
| <input type="checkbox"/> Bat herpesvirus isolate SK/13YF243 DNA polymerase gene, partial cds | 100 | 100 | 81% | 2e-17 | 76.30% | KR261881.1 |

F

Sequences producing significant alignments:

LMM45

Myotis spp.

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

| Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| <input type="checkbox"/> Myotis alcaethoe betaherpesvirus 1 strain psc-17 DNA polymerase gene, partial cds | 123 | 123 | 70% | 2e-24 | 77.78% | KR608287.1 |
| <input type="checkbox"/> Myotis mystacinus betaherpesvirus 1 strain psc-18 DNA polymerase gene, partial cds | 121 | 121 | 79% | 2e-23 | 75.41% | KR608288.1 |
| <input type="checkbox"/> Myotis daubentonii betaherpesvirus 1 strain psc-14 DNA polymerase gene, partial cds | 102 | 102 | 67% | 6e-18 | 74.36% | KR608284.1 |
| <input type="checkbox"/> Tylonycteris robustula herpesvirus 1 glycoprotein B (gB) gene, complete cds, and DNA polymerase (pol) gene, partial cds | 100 | 100 | 91% | 2e-17 | 70.48% | JQ814846.1 |
| <input type="checkbox"/> Myotis emarginatus betaherpesvirus 1 strain psc-15 DNA polymerase gene, partial cds | 98.7 | 98.7 | 81% | 8e-17 | 72.77% | KR608285.1 |
| <input type="checkbox"/> Myotis myotis betaherpesvirus 1 strain psc-16 DNA polymerase gene, partial cds | 88.7 | 88.7 | 70% | 1e-13 | 72.05% | KR608286.1 |
| <input type="checkbox"/> Myotis escalerai betaherpesvirus 2 isolate psc-32 DNA polymerase gene, partial cds | 84.2 | 84.2 | 70% | 2e-12 | 71.43% | KT886844.1 |
| <input type="checkbox"/> Bat betaherpesvirus 2 gB, DPOL genes for glycoprotein B, DNA polymerase, complete and partial cds | 77.0 | 77.0 | 44% | 3e-10 | 76.70% | AB517983.1 |
| <input type="checkbox"/> Miniopterus schreibersii betaherpesvirus 2 strain psc-13 DNA polymerase gene, partial cds | 76.1 | 76.1 | 51% | 9e-10 | 73.95% | KR608283.1 |

Sequences producing significant alignments:

LMM16

Tadarida brasiliensis

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

G

| Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| <input type="checkbox"/> Murine herpesvirus isolate LIB008 DNA polymerase (pol) gene, partial cds | 97.8 | 97.8 | 42% | 3e-16 | 82.29% | KF155695.1 |
| <input type="checkbox"/> Acomys herpesvirus SVMS 226.222 DNA polymerase gene, partial cds | 92.4 | 92.4 | 53% | 1e-14 | 77.87% | HQ587046.1 |
| <input type="checkbox"/> Dipodillus herpesvirus SVMS 065.081 DNA polymerase gene, partial cds | 84.2 | 84.2 | 48% | 2e-12 | 78.18% | HQ587047.1 |
| <input type="checkbox"/> Murid betaherpesvirus 1 isolate SN51_s45_sk2703, complete genome | 79.7 | 79.7 | 48% | 7e-11 | 77.27% | MH118556.1 |
| <input type="checkbox"/> Murid betaherpesvirus 1 isolate s88_sk2733, complete genome | 79.7 | 79.7 | 48% | 7e-11 | 77.27% | MG957497.1 |
| <input type="checkbox"/> Muromegalovirus WP15B, complete genome | 79.7 | 79.7 | 48% | 7e-11 | 77.27% | EU579860.1 |

11 AGRADECIMIENTOS

A mis tutoras, Sandra y Adriana, por guiarme en toda esta etapa final y comienzo de otra más grande. Por poder canalizar lo que me gusta, ordenar mis ideas y también darme las oportunidades de hacerlas crecer.

He aprendido mucho de ustedes!

Dr. Juan Arbiza, gracias por darme la oportunidad y brindarme un espacio para liberar mi curiosidad por el mundo de los virus en el que recién entro y tanto me fascina.

A todos los compañeros de laboratorio de Virología, por su ayuda y por la complicidad de entender cuando no nos salen las cosas y alegrarnos mucho más cuando sí. Y sobre todo por las jornadas tan divertidas.

Al equipo del PCMU, un lindo grupo donde he podido combinar mi fascinación por los animales, salir al campo y la virología. Gracias por integrarme y enseñarme tanto sobre los murcis.

*A mis amigos, **por ser todo lo que está bien**. Frustrarse, alegrarse y festejar conmigo, entender las faltas de tiempo y esperarme, siempre. Gracias por su apoyo, no puedo pedir mejores personas para compartir la vida.*

*Y principalmente, a esta instancia llegué gracias a mis padres, quienes me prepararon el camino y me dieron todas las herramientas necesarias para poder formarme académicamente y sobre todo como ser humano. **¡GRACIAS!** a los tres (Mamá, Papá y Vale) por confiar en mí, darme el valor para llegar hasta el final y vivir mis logros como propios. Especialmente gracias Mamá por mostrarme el camino al encontrar esta linda facultad, que no sabía hasta último momento que existía. No podría estar en otro lugar.*

Este trabajo sólo representa una parte del esfuerzo y dedicación realizado en todos estos años de Facultad. Es lo que puedo mostrarles de lo que me he convertido y aprendido. Gracias por confiar en mí!

*“... aprender es un rito una costumbre
no le hace mal a nadie ni se olvida
aprende quien asciende hasta la cresta
pero también quien busca entre las ruinas*

*aprender es abrirse a los afanes
y ¿por qué no? también a la utopía
la enseñanza es enjambre y sus gaviotas
se posan en el alma sorprendida...”*

Mario Benedetti.

