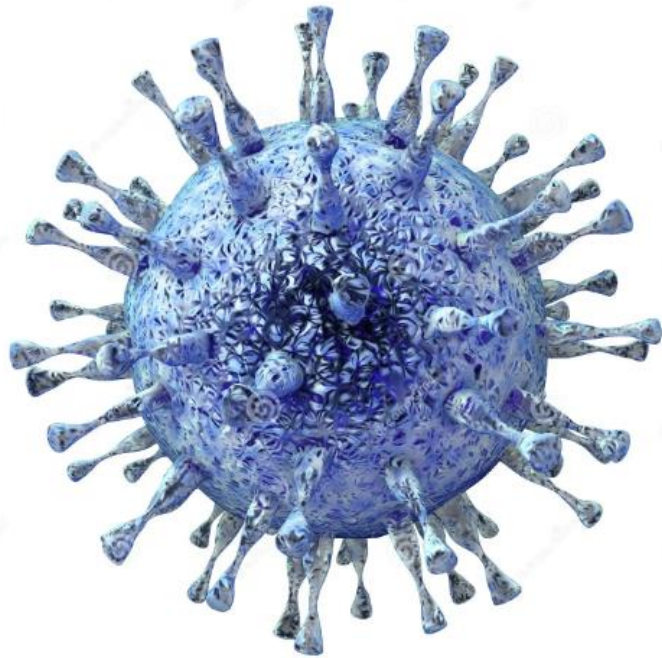


Estudio de la variabilidad genética de Herpesvirus en murciélagos del Uruguay

Lic. Natalia Montaldo Brito



Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Sub- Área Microbiología PEDECIBA

Orientadora: Dra. Adriana Delfraro

Co-orientadora: Dra. Sandra Frabasile

Sección Virología. Facultad de Ciencias. Universidad de la Republica

MONTEVIDEO 2023

INDICE

AGRADECIMIENTOS	4
ABREVIATURAS	5
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN	7
Herpesvirus.....	7
Ciclo biológico.....	8
Propiedades Biológicas.....	10
Taxonomía y clasificación	10
<i>Alphaherpesvirinae</i>	11
<i>Betaherpesvirinae</i>	12
<i>Gammaherpesvirinae</i>	12
Interacción virus- hospederos	12
Orden Chiroptera.....	13
Características e importancia de los murciélagos en los ecosistemas.....	13
Taxonomía	15
¿Por qué estudiar Herpesvirus en murciélagos?.....	18
Justificación de este estudio.....	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Procesamiento de muestras.....	21
Estudios Moleculares.....	22
Extracción de ADN.....	22
Amplificación de la región polimerasa viral del genoma	23
Amplificación de la región glicoproteína gB del genoma.....	23
Protocolo Ehlers et al., 2007 con Taq Platinum®	24

Protocolo Ehlers et al., 2007 con modificaciones utilizando Fast Cycling (QIAGEN®)	25
Protocolo Ehlers et al., 2007 con modificaciones utilizando Q5® High-Fidelity 2X Master Mix	25
Protocolo con nuevos cebadores	25
Electroforesis en gel de agarosa	28
Secuenciación	28
Análisis filogenético	28
Análisis de distancias genéticas pareadas entre individuos	29
RESULTADOS	30
Detección de herpesvirus por PCR anidada del fragmento de la polimerasa viral	31
Secuenciación y análisis filogenético de la polimerasa viral de Hv	32
Amplificación del gen de la glicoproteína de superficie gB	43
PCR anidada para glicoproteína de superficie gB utilizando los cebadores descritos por Ehlers et al., 2007	43
PCRs para glicoproteína de superficie gB utilizando nuevos cebadores	44
Análisis filogenético de la glicoproteína gB de herpesvirus de murciélagos insectívoros y hematófagos	44
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	53
PERSPECTIVAS	54
BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXO	63

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutoras, Adriana y Sandra, por abrirme las puertas del laboratorio y aceptarme en la maestría. Su orientación a lo largo de este proceso de aprendizaje ha sido fundamental para mi desarrollo como científica, inspirándome a esforzarme cada día con el objetivo de mejorar y crecer en este campo.

A mis compañeros de virología por la buena onda y el aguante.

Al Dr. German Botto por su amable disposición y generosidad en todo momento.

A mis amigos por su apoyo incondicional y comprensión durante todo este proceso de formación.

A mis compañeros de trabajo, especialmente a Coral y Myriam, sin su apoyo diario esto no hubiese sido posible.

A la ANII por la beca de maestría otorgada.

Agradezco a las Doctoras Leticia Maya, Elisa Bolatti y Natalia Olivero por aceptar ser parte del tribunal evaluador de esta tesis.

Quiero dar las gracias a Martin por haberme acompañado en esta última etapa de la tesis, siempre dispuesto a escucharme, ayudarme y a entenderme siempre.

Por último, pero no menos importante, agradezco a mi familia por su apoyo incondicional durante toda mi vida. Especialmente a vos ma, gracias por todo.

ABREVIATURAS

μL	Microlitro	Kb	kilobase
Mm	Micrómetro	L	Litro
ADN	Ácido desoxirribonucleico	M	Molar
ARN	Ácido ribonucleico	mL	Mililitro
Beta-Hv	Betaherpesvirus	mM	Milimolar
dNTPS	Desoxinucleótidos	MgCl₂	Cloruro de Magnesio
Gamma-Hv	Gammaherpesvirus	nt	Nucleótidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	PM	Marcador de peso molecular
Hv	Herpesvirus	pb	pares de bases
IgA	Inmunoglobulina A	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
IgE	Inmunoglobulina E	Poli-A	Poli adenilado
IgG	Inmunoglobulina G	TAE	Tris Acetato EDTA
IgM	Inmunoglobulina M	HSV-1	Virus Herpes Simple

RESUMEN

La familia *Orthoherpesviridae* es conocida por producir infecciones latentes que pueden reactivarse periódicamente y afectar tanto a la salud humana como animal. Los murciélagos son un grupo de mamíferos que tienen una gran diversidad y un importante papel ecológico, desde la polinización hasta la dispersión de semillas, por lo que resulta interesante estudiar virus asociados a ellos. Recientemente, se describió la presencia de herpesvirus en murciélagos de Uruguay. El objetivo general de este trabajo fue detectar y caracterizar genéticamente herpesvirus en murciélagos del Uruguay a fin de ampliar el conocimiento de su distribución geográfica y la diversidad de especies infectadas. Para ello, se analizaron muestras de hisopados bucales de murciélagos provenientes de diferentes localidades del Uruguay. Se realizó una extracción de ácidos nucleicos totales y se amplificó una región parcial del gen que codifica para la ADN polimerasa viral y de la glicoproteína de superficie gB. Los resultados mostraron una alta prevalencia de herpesvirus, con un total de 139 muestras positivas en 215 analizadas (65%). Se detectó infección en individuos de 11 especies diferentes. El 57% de los herpesvirus detectados pertenecieron a la subfamilia *Gammaherpesvirinae* y el 43% a *Betaherpesvirinae*. No se encontraron individuos infectados con subfamilia *Alphaherpesvirinae*. En general, la relación filogenética hallada en los virus analizados sugiere dos procesos concomitantes para explicar la similitud entre secuencias virales: la cercanía filogenética y similitud ecológica entre los hospedadores. Por otro lado, las muestras de *Desmodus rotundus* se agruparon únicamente en la subfamilia *Gammaherpesvirinae*, formando dos clados e indicando mayor diversidad viral respecto a trabajos previos, en función del aumento en el número de muestras. A partir del análisis de la glicoproteína de superficie gB en un subconjunto de muestras, se ha observado que este marcador resulta más informativo o al menos más variable en los insectívoros. En conclusión, se reportó una amplia distribución geográfica y diversidad de murciélagos del Uruguay con una alta prevalencia de herpesvirus.

INTRODUCCIÓN

Herpesvirus

La familia *Orthoherpesviridae*, es una de las familias de virus ADN que afecta la salud humana y animal, además de estar ampliamente distribuida en la naturaleza. En los humanos se producen numerosas patologías, desde infecciones subclínicas, hasta enfermedades fatales del sistema nervioso (Fields et al., 2013). Una de las características principales de esta familia es que después de la infección primaria, establece una infección latente de por vida en los hospederos infectados y se reactiva periódicamente. La enfermedad grave generalmente se observa en fetos y/o adultos inmunocomprometidos (Avendaño 2011; Ho et al., 2020; Gatherer et al., 2021).

Los herpesvirus (Hv) tienen un core compuesto por una molécula lineal de ADN de doble cadena de 120-241 kb, rodeado por una cápside icosaédrica de aproximadamente 120 a 200 nm de diámetro formada de 162 capsómeros dispuestos en 150 hexones y 11 pentones. Dicha cápside se encuentra rodeada de un tegumento de proteínas y una envoltura de membrana lipídica que determina el tamaño definitivo del virus, donde se encuentran insertas espículas, formadas por glicoproteínas virales de superficie (glicoproteínas B (gB), H (gH), L (gL), M (gM) y N (gN) siendo algunas esenciales para que el virus se adhiera a las células (Figura 1). Al ser un virus envuelto, cuando está expuesto a ambientes extracelulares, puede ser degradado por agentes fisicoquímicos (Avendaño 2011; Bascones-Martínez & Pousa-Castro 2011; Fields et al., 2013; Gatherer et al., 2021).

Una característica de los genomas de los Hv es la disposición de sus secuencias terminales e internas repetidas que pueden variar en el número de copias, así como secuencias que pueden perderse o duplicarse durante la multiplicación viral, lo que lleva a una variación dentro de las especies en la longitud del genoma que puede exceder los 10 kb. Cada transcripción viral generalmente codifica una sola proteína y tiene una secuencia promotora/reguladora, una caja TATA, un sitio de inicio de la transcripción de 20 a 25 pb corriente abajo de la caja TATA, una secuencia líder en 5' de 30-300 pb (no traducida), una secuencia no traducida en 3' de 10- 30 pb y una señal poli A (Fields et al., 2013; ViralZone 2022).

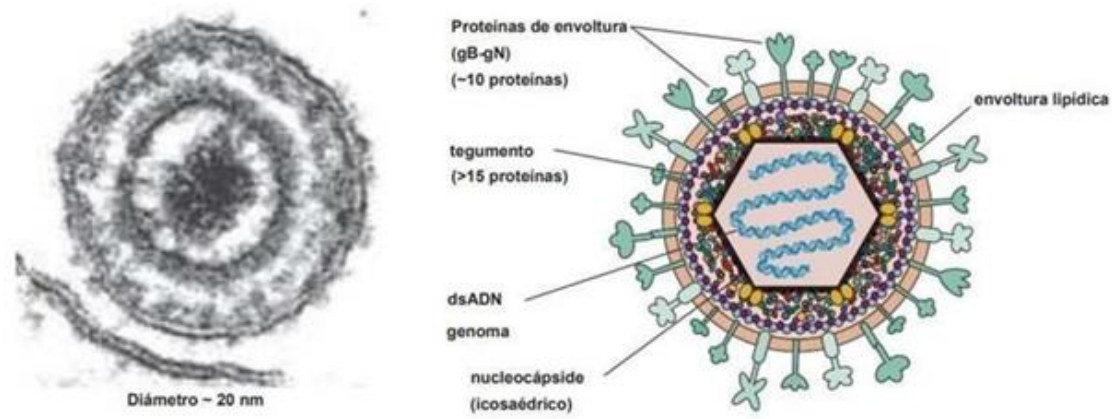


Figura 1. Morfología de un Hv a partir de microscopia electrónica y esquema general de un virión de la familia *Orthoherpesviridae*. Extraída y adaptada de Principles of Virology, 4th ed (Flint et al., 2015).

Ciclo biológico

El primer paso de la infección requiere la interacción entre las glicoproteínas de superficie del virus (gB, gC y gD) con los receptores presentes en la superficie celular (principalmente heparán sulfato). Esta unión va a provocar la penetración por endocitosis o la fusión con la membrana citoplasmática y el ADN viral se libera de la cápside en el poro nuclear, seguido por la circularización del genoma y la transcripción de los *genes tempranos inmediatos* por la ARN polimerasa II de la célula hospedera. Los ARNs de éstos genes migran al citoplasma donde son traducidos y luego las proteínas tempranas inmediatas se transportan al núcleo donde se activa la transcripción de los *genes tempranos* que se transportan al citoplasma donde se traducen (Figura 2). Estas participan en la replicación del ADN, generando un concatámero. Los *genes tardíos* son transcritos y sus productos codifican proteínas estructurales del virión. Una vez que se sintetizan estas proteínas, se envuelven alrededor del ADN y luego se incorporan proteínas del tegumento. Se produce la gemación y adquiere una envoltura a partir de la membrana nuclear interna atravesando el citoplasma celular por el retículo endoplasmático. Posteriormente brota a través de vesículas derivadas del aparato del Golgi, tras lo cual sale de la célula produciendo la lisis celular (Avendaño 2011; Fields et al., 2013 ; Carroll et al., 2016) (Figura 2).

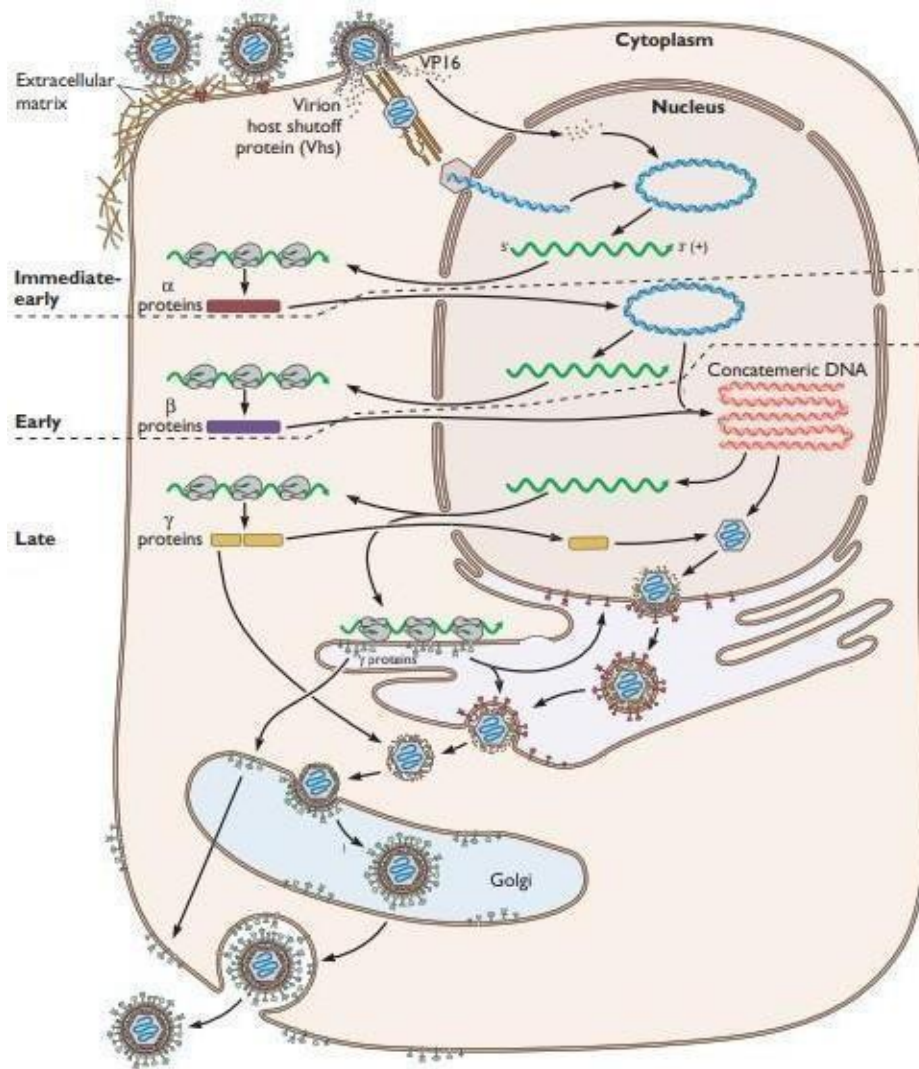


Figura 2. Ciclo reproductivo del virus Herpes Simple tipo 1 (Infección productiva).
Extraída y adaptada de Principles of Virology, 4th ed (Flint et al., 2015).

En el ciclo de latencia, el virus persiste en el núcleo como un episoma (genoma no integrado). En esta fase de latencia sólo algunos genes, llamados transcritos asociados a latencia (LAT), cuya función podría ser prevenir la expresión de otros genes virales que promuevan la replicación viral y la apoptosis (Fields et al., 2013; ViralZone 2022) (Figura 3).

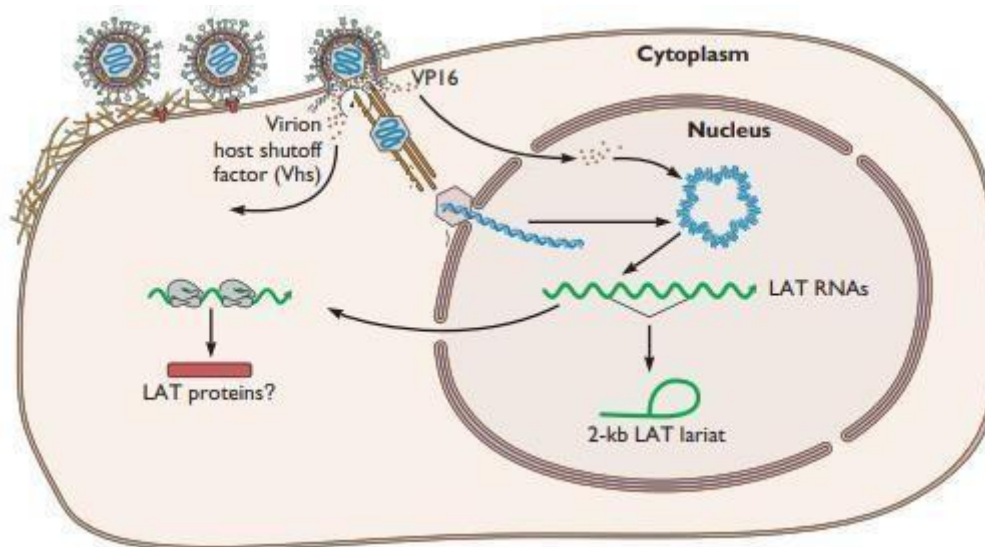


Figura 3. Ciclo reproductivo del virus Herpes Simple tipo 1 (Infección latente).
Extraída y adaptada de *Principles of Virology*, 4th ed (Flint et al., 2015).

Propiedades Biológicas

Los miembros de la familia *Orthoherpesviridae* comparten cuatro propiedades biológicas significativas:

- La transcripción de los genes virales y síntesis de ADN ocurre en el núcleo y el procesamiento final del virión sucede en el citoplasma (Fields et al., 2013).
- Producen infecciones latentes de por vida en sus hospederos y experimentan reactivación periódica. Estas características se consideran clave para su supervivencia (Fields et al., 2013; ViralZone 2022).
- Codifican un amplio número de enzimas, algunas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos, síntesis de ADN y procesamiento de proteínas, sin embargo, el conjunto exacto de enzimas puede variar de un Hv a otro (Fields et al., 2013).
- La infección productiva implica la destrucción de la célula infectada (Fields et al., 2013; ViralZone 2022).

Taxonomía y clasificación

Los Hv pertenecen al orden *Herpesvirales* que incluye las familias *Alloherpesviridae*, *Malacoherpesviridae* y *Orthoherpesviridae* (ICTV 2022).

En el presente estudio, dirigiremos nuestra atención hacia la familia *Orthoherpesviridae* debido a su relevancia en el contexto de las infecciones en

murciélagos. Esta familia incluye las subfamilias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae* (Figura 4), las cuales se clasifican en función de su estructura viral, sus ciclos replicativos, su patogenicidad y en función de similitudes biológicas y de secuencia (Fields et al., 2013; Davison 2010; Gatherer et al., 2021)

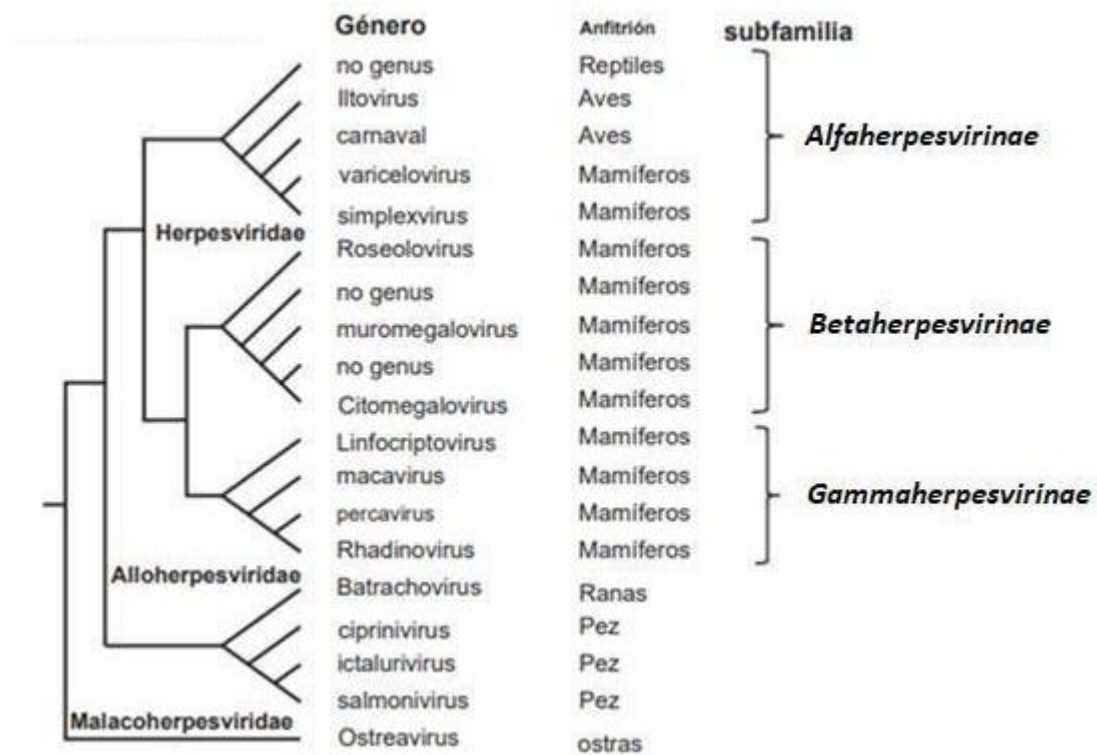


Figura 4. Principales relaciones filogenéticas dentro del orden *Herpesvirales*. Extraído y modificado de *Fields virology*, 6th ed (Fields et al., 2013).

Alphaherpesvirinae

Los miembros de esta subfamilia se caracterizan por tener un ciclo de replicación corto, que puede durar horas y una rápida propagación en cultivos celulares. Además, tienen la capacidad de destruir eficientemente las células infectadas y de establecer una latencia primaria, aunque no exclusiva, en los ganglios sensitivos del sistema nervioso. Ejemplos representativos de virus en esta subfamilia son los virus Herpes simple tipo 1 y 2, los cuales pueden provocar lesiones en las mucosas, como llagas orales o genitales y el virus de la varicela-zoster, el agente causal de la varicela (Fields et al., 2013).

Betaherpesvirinae

Los virus que pertenecen a esta subfamilia presentan un ciclo reproductivo más prolongado, que puede extenderse por más de 7 días (Fields et al., 2013). A pesar de que algunos de estos virus, como los citomegalovirus, pueden causar infecciones graves en personas con sistemas inmunológicos debilitados, no todos tienen efectos negativos en su hospedero. De hecho, en nuestro país se ha detectado la presencia de betaherpesvirus (Beta-Hv) en murciélagos sin síntoma evidente de enfermedad (Moreira et al., 2021).

Gammapherpesvirinae

Los virus de esta subfamilia pueden infectar y permanecer latentes en los linfocitos T o B del sistema inmunológico, lo que puede provocar graves consecuencias, como el desarrollo de ciertos tipos de cáncer como linfomas y leucemias. Un ejemplo es el virus Epstein-Barr, agente causal de la mononucleosis infecciosa. Adicionalmente, se han constatado gammaherpesvirus (Gamma-Hv) en murciélagos de diferentes especies sin evidencia de enfermedad (Wray et al., 2016; Escalera-Zamudio et al., 2016; Moreira et al., 2021; Botto 2021).

Interacción virus- hospederos

Una amplia diversidad de hospederos vertebrados, que incluyen reptiles, aves y mamíferos, han sido identificados como portadores de diversos virus pertenecientes a la familia *Orthoherpesviridae*. Entre estos hospederos se encuentran murciélagos de distintas regiones geográficas (Wibbelt et al., 2007; Baker et al., 2013 B; Escalera-Zamudio et al., 2016, Zheng et al., 2016; Wray et al., 2016; James et al., 2020; Griffiths et al., 2020; Moreira et al., 2021; Botto 2021). Los virus requieren dependencia con un sistema vivo para poder multiplicarse, esta estrecha relación puede dar lugar a fenómenos de coevolución entre el virus y el hospedador (Davison et al., 2010; Azab et al., 2018). Estudios realizados en los últimos años, han descubierto genomas virales integrados en los genomas del hospedero, aportando mayor conocimiento en este tema (Kaján et al., 2020).

Por lo general, en hospederos sanos, las infecciones fatales son eventos poco frecuentes. Los virus que se integran en el genoma sin causar una infección fatal pueden establecer una coevolución con el hospedero, tal como se observa en el caso

de los murciélagos. Desde una perspectiva de supervivencia viral, las infecciones fatales son menos favorables para el virus, ya que disminuyen la probabilidad de transmisión (Fields et al., 2013).

Orden Chiroptera

El orden Chiroptera está constituido por más de 1400 especies de murciélagos, que representan más del 20% de mamíferos en todo el mundo, formando así el grupo con mayor número de especies después de los roedores y se distribuyen ampliamente por todo el mundo, a excepción de las regiones polares extremas (Teeling et al., 2018; Simmons & Cirranello 2023).

Características e importancia de los murciélagos en los ecosistemas

Los murciélagos juegan un importante rol ecológico y económico. Existen especies insectívoras, que se alimentan de insectos como los escarabajos y polillas, lo que resulta beneficioso en el control de plagas forestales y de cultivo. Por otro lado, hay especies frugívoras que comen frutos y al hacerlo, contribuyen a la dispersión de semillas de árboles y plantas, algunos de importancia económica como el naranjo; otros murciélagos, se nutren de néctar y polen, lo que los convierte en valiosos polinizadores de árboles y flores. Existen también murciélagos carnívoros, que se alimentan de una variedad de vertebrados, y los hematófagos, que se nutren de la sangre de sus presas (Newman et al., 2011; Moratelli & Calisher 2015; Santana & Cheung 2016; Serra-Cobo & López-Roig 2017).

Además los murciélagos presentan una serie de cualidades biológicas y hábitos de vida que los diferencian del resto de los mamíferos. Son los únicos mamíferos que pueden volar, se distribuyen de manera casi cosmopolita viviendo en ambientes muy diferentes, como desiertos, selvas tropicales y subtropicales, montañas, islas, regiones templadas, regiones boreales, etc. Algunas especies tienen la particularidad de formar grandes colonias con cientos o miles de individuos (Calisher et al., 2006; Serra-Cobo & López-Roig 2017; Woo & Lau 2019; Gorbunova et al., 2020).

Otra característica que poseen es el sistema de ecolocalización, donde estos animales emiten una serie de pulsos de alta frecuencia a través de la laringe, transformándose en sonidos ultrasónicos que se emiten por la boca. Este sistema altamente preciso les

permite orientarse y cumplir con su misión de localizar fuentes de alimento incluso en total oscuridad (Kuzmin et al., 2011; Serra-Cobo & López-Roig 2017; Woo & Lau 2019).

Los murciélagos presentan una longevidad excepcional, viven tres veces y media más que otros mamíferos de tamaño similar, dicha longevidad está directamente relacionada a la tasa de reproducción, la tendencia a hibernar, la masa corporal y su uso de refugios en cuevas (Wilkinson & South 2002; Luis et al., 2013; Moratelli & Calisher 2015; Gorbunova et al., 2020).

Estos mamíferos poseen características distintivas que les permiten convivir con diversos virus sin sufrir daños o enfermedades. Se han propuesto varias hipótesis acerca de su capacidad como reservorio de enfermedades. Entre ellas, se destaca la modificación inmunológica durante el periodo de hibernación o las altas temperaturas experimentadas durante el vuelo, conocida como la hipótesis de la fiebre, que podrían disminuir la carga viral y, por ende, mantener esta condición. Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que se trata de una tolerancia a la infección viral en lugar de una reducción activa de la carga viral (Schountz et al., 2017; Irving et al., 2021).

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa de los murciélagos contra los virus. Estos animales generan citocinas que incluyen la expresión constitutiva de interferón y genes estimulados por interferón, así como una mayor expresión de proteínas de choque térmico, y alteraciones en los receptores celulares, lo que les permite reaccionar rápido ante una infección viral. Estudios serológicos han demostrado que los murciélagos generan anticuerpos contra numerosos virus y producen diferentes tipos de inmunoglobulinas, como IgG, IgA, IgM e IgE (Baker et al., 2013 A; Schountz 2014; Gorbunova et al., 2020).

Como se ha mencionado, los murciélagos son el reservorio natural de muchos virus, lo que los convierte en un importante factor en la aparición y transmisión de virus zoonóticos, como los coronavirus, paramyxovirus y filovirus. Además, pueden albergar otras familias de virus ADN como *Orthoherpesviridae*, *Adenoviridae* y *Papillomaviridae* (Li et al., 2005; Calisher et al., 2006; Smith & Wang, 2013; Luis et al., 2013; Moratelli &

Calisher, 2015; Wray et al., 2016; Cui et al., 2019; James et al., 2020; Wiederkehr et al., 2022; Bolatti et al., 2022).

El contacto entre el hombre y los murciélagos se incrementa década tras década, lo que puede generar riesgos de tipo sanitario, sin embargo, para que ocurra la transmisión de virus de murciélagos a humanos o animales domésticos, requiere una sucesión de hechos relacionados entre sí (Plowright et al., 2017). Los cambios en el medio ambiente, además de los producidos por las actividades humanas, promueven nuevas interacciones entre hospederos, virus y vectores que pueden provocar infecciones virales (Luis et al., 2013; Botto et al., 2019 B; Plowright et al., 2021; Moreira et al., 2021, Bolatti et al., 2022). La infección de cualquier organismo tiene un costo propio para el hospedero y el agente infeccioso, además de un equilibrio entre la respuesta del hospedador y la replicación del virus. Para que se pueda dar este tipo de evolución conjunta, los virus deben transmitirse a otros hospederos susceptibles antes de que la respuesta inmunitaria elimine la infección (Calisher et al., 2006; Schountz 2014).

Las infecciones virales transmitidas por los murciélagos pueden ocurrir a través de varias vías, como el contacto directo con mucosas mediante gotitas y fómites (propagación por aerosol) y contacto fecal-oral (Bolatti et al., 2022).

Taxonomía

Tradicionalmente el orden Chiroptera se encontraba dividido en dos subórdenes: Microchiroptera y Megachiroptera. Recientemente, estudios moleculares y análisis filogenéticos dieron lugar a una nueva clasificación de los murciélagos en dos nuevos subórdenes: Yinpterochiroptera constituidos por la familia Pteropodidae (originalmente Megachiroptera) junto con la superfamilia Rhinolophoidea (originalmente incluida en Microchiroptera) y los Yangochiroptera que incluyen a los microquirópteros restantes (Figura 5) (Teeling et al., 2018; Woo & Lau 2019).

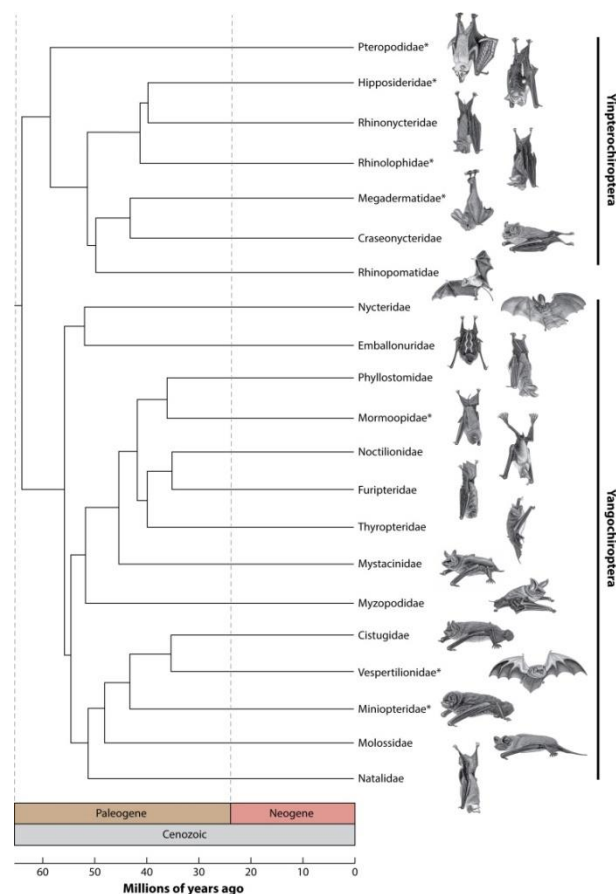


Figura 5. Árbol filogenético del orden Chiroptera, donde se divide en Yinptero y Yangochiroptera, extraído de Teeling et al., 2018.

En Uruguay contamos con 22 especies de murciélagos que comprenden las familias Phyllostomidae, Molossidae y Vespertilionidae (Figura 6) (Tabla 1). La distribución de las especies es heterogénea y se extiende por todo el territorio nacional (Botto et al., 2019 A; PCMU 2023). Las familias Molossidae y Vespertilionidae se caracterizan por reunir murciélagos insectívoros, mientras que la familia Phyllostomidae está representada en Uruguay por dos especies frugívoras y el murciélago *Desmodus rotundus* (hematófago), siendo éste último el principal transmisor de la rabia parálitica en Sudamérica. El primer brote de rabia transmitida por murciélagos en ganado fue detectado en Uruguay en el año 2007 (Botto et al., 2019 B).



Figura 6. Fotos de especies de murciélagos presentes en Uruguay. A) *Eptesicus montanus*, B) *Desmodus rotundus* (Vampiro común), C) *Molossus molossus*. Foto Dr. German Botto.

Tabla 1. Murciélagos del Uruguay

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>Promops</i>	<i>P. centralis</i>	Insectívora
Vespertilionidae	<i>Eptesicus</i>	<i>E. furinalis</i>	Insectívora
		<i>E. diminutus</i>	Insectívora
		<i>E. montanus</i>	Insectívora
		<i>E. velatus</i>	Insectívora
	<i>Lasiurus</i>	<i>L. blossevilli</i>	Insectívora
		<i>L. ega</i>	Insectívora
		<i>L. villosissimus</i>	Insectívora
	<i>Myotis</i>	<i>M. albescens</i>	Insectívora
		<i>M. levis</i>	Insectívora
		<i>M. nigricans</i>	Insectívora
		<i>M. pampa</i>	Insectívora

¿Por qué estudiar Herpesvirus en murciélagos?

Como se mencionó en párrafos anteriores, los murciélagos exhiben rasgos distintivos que los posicionan como posibles portadores de virus pertenecientes a la familia *Orthoherpesviridae*. Estos virus pueden desempeñar un papel destacado como marcadores para la comprensión de la ecología de los murciélagos. La mayoría de los trabajos científicos que han buscado Hv en murciélagos se han llevado a cabo principalmente en África, Europa y Asia (Baker et al., 2013 B; Sasaki et al., 2014; Sano et al., 2015; Escalera-Zamudio et al., 2016, Zheng et al., 2016; Inagaki et al., 2020; James et al., 2020). En el Neotrópico, sin embargo, hay escasos estudios sobre Hv en murciélagos (Wray et al., 2016; James et al., 2020; Griffiths et al., 2020; Moreira et al., 2021; Botto 2021).

Los análisis preliminares realizados han revelado una alta prevalencia y diversidad de estos virus. Esta información adquiere relevancia en el contexto de comprender los patrones de desplazamiento de los murciélagos y en el caso de virus más patogénicos que conllevan un mayor riesgo para la población humana, permite entender sus patrones de propagación y transmisión (Botto 2021; Moreira et al., 2021).

Justificación de este estudio

Hasta el momento el conocimiento de la diversidad de Hv en murciélagos en el Neotrópico es escaso. Uno de los principales trabajos fue el estudio de Wray et al., 2016 en Guatemala, donde detectaron virus de las subfamilias *Gamma-* y *Betaherpesvirinae* en hisopado bucal, fecal y sangre de varios ejemplares de *D. rotundus*.

A su vez James et al., 2020 realizó un extenso trabajo en Martinica (Antillas francesas) y Guayana Francesa identificando nuevos Hv pertenecientes a la subfamilia *Gamma* y *Betaherpesvirinae* en murciélagos de distintas especies, como *D. rotundus*, *Carollia perspicillata* y *Pteronotus rubiginosus*, entre otras, afirmando la gran diversidad de Hv en murciélagos.

Adicionalmente en el estudio realizado por Griffiths et al., 2020, se encontraron nuevos virus de la subfamilia *Betaherpesvirinae* en *D. rotundus* de diferentes regiones de Perú.

En nuestro país, Moreira et al., 2021 describió por primera vez la presencia de Hv en murciélagos del Uruguay, analizando un limitado número de muestras y observó una gran diversidad genética. Se identificaron Beta-Hv y Gamma-Hv que podrían ser potencialmente clasificados como nuevos Hv de murciélagos, debido a la divergencia de secuencia observada de la polimerasa viral y su ubicación en el árbol filogenético obtenido en los análisis de secuencias (Moreira et al., 2021).

A su vez, Botto 2021 realizó un amplio trabajo sobre Hv en murciélagos de la especie *D. rotundus* de Uruguay y Belice, donde utilizó a los Hv como un marcador ecológico para tratar de obtener una aproximación de la relación entre virus y la ecología de estos mamíferos (Botto 2021).

En base a lo expuesto anteriormente sobre el estudio de los Hv en murciélagos del Neotrópico, resulta relevante incrementar el conocimiento acerca de la caracterización y diversidad de estos virus en Uruguay, mediante el análisis de un mayor número de muestras y mayor diversidad desde el punto de vista taxonómico, geográfico y ecológico. Estos virus tienen una alta prevalencia y su estudio puede proporcionar información valiosa sobre la interacción inter e intra-colonias de murciélagos, lo que nos podría llegar a dar información muy útil para aportar estrategias de control de otros agentes que si son patogénicos y de interés médico y veterinario como el virus de la rabia (género *Lyssavirus*).

HIPÓTESIS

- Los herpesvirus tienen una amplia distribución geográfica y diversidad genómica. En nuestro país, estos virus están presentes en murciélagos de varias especies autóctonas.
- En base a la estructura conocida de los herpesvirus, el ectodominio de la glicoproteína de superficie gB, nos brindará más información acerca de la variabilidad del virus.
- El análisis en conjunto de la variabilidad de la polimerasa y la glicoproteína de superficie gB es una herramienta que nos permitirá hacer inferencias sobre la ecología de los murciélagos.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Detectar y caracterizar genéticamente herpesvirus en murciélagos del Uruguay a fin de ampliar el conocimiento de su distribución geográfica y la diversidad de murciélagos infectados.

Objetivos específicos

- Identificar herpesvirus mediante la amplificación parcial del gen de la polimerasa viral y de la glicoproteína de superficie gB, analizando su diversidad genética y sus relaciones filogenéticas con herpesvirus de la región.
- Realizar un estudio longitudinal de seguimiento de algunos individuos de *D. rotundus* recapturados para analizar la diversidad viral.
- Explorar la variabilidad genética de los herpesvirus como herramienta aplicable al análisis de la interacción entre individuos y colonias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procesamiento de muestras

En este trabajo fueron analizadas un total de 215 muestras de hisopados bucales de murciélagos, 123 pertenecieron a murciélagos insectívoros cuya captura se realizó entre los años 2018 y 2019 en distintos departamentos del país como, Artigas, Canelones, Cerro Largo, Maldonado, Montevideo, Soriano, Rio Negro y Rivera. Las restantes muestras (92) pertenecieron a murciélagos de la especie *D. rotundus*, capturados entre los años 2017 a 2019, en los departamentos de Cerro Largo, Rivera y Maldonado (Tabla 2). Se incluyó en este grupo muestras provenientes de recapturas de individuos (Salamanca).

Las capturas de los ejemplares 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 y en algunos casos se hizo captura directa en los refugios (redes de mano). Las muestras de saliva de cada individuo se obtuvieron utilizando hisopos de algodón estériles y se conservaron entre 0.5 y 1 mL de DNA/RNA Shield® (Zymo Inc.). Las mismas se mantuvieron en campo a -20°C en un freezer portátil y una vez en el laboratorio, fueron guardados a -80°C para mantener la integridad del material genético. Los individuos se identificaron por características morfológicas (González & Martínez-Lanfranco 2010).

Las muestras utilizadas en esta tesis fueron colectadas por un equipo liderado por el Dr. Germán Botto y conformado por la Lic. Lucía Moreira, Mariana Díaz, Giannina Lemus, Paula Hernández, Yves Bas, Kévin Barré y Juan Manuel Díaz, en el marco de los proyectos: “Estudios genéticos, acústicos y de trayectorias de murciélagos en Uruguay: impacto de las turbinas de viento en su comportamiento y conservación”, “Conservación de murciélagos cavernícolas en Uruguay” y “Effect of landscape fragmentation in bat population dynamics and disease persistence in Uruguay.”

Tabla 2. Familia, especie, localidad y año de captura de las muestras de murciélagos analizadas.*incluye 9 recapturas.

Familia	Especie	Muestras	Localidad	Departamento	Año
Phyllostomidae	<i>Desmodus rotundus</i>	33*	Salamanca	Maldonado	2017
		50*	Salamanca	Maldonado	2018
		5	Usina Cuñapirú	Rivera	2018
		4	Álvarez	Cerro Largo	2019
Molossidae	<i>Eumops bonariensis</i>	1	Javier de Viana	Artigas	2018
		1	Los Molinos	Soriano	2018
	<i>Molossops temminckii</i>	3	Javier de Viana	Artigas	2018
		3	Los Molinos	Soriano	2018
	<i>Molossus molossus</i>	2	Los Matreros	Maldonado	2018
		2	Palmares de Caranday	Rio Negro	2019
		1	El Pinar	Canelones	s/fecha
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	24	Usina Cuñapirú	Rivera	2018
		12	Usina Cuñapirú	Rivera	2019
		3	San Javier	Rio Negro	2019
		1	Barrio Unión	Montevideo	2018
		1	s/localidad	s/localidad	2018
		1	s/localidad	s/localidad	s/fecha
Vespertilionidae	<i>Eptesicus spp</i>	1	Usina Cuñapirú	Rivera	2018
	<i>Eptesicus diminutus</i>	3	Los Molinos	Soriano	2018
	<i>Eptesicus furinalis</i>	3	Arroyo Tres Cruces	Artigas	2018
		4	Javier de Viana	Artigas	2018
		2	Los Molinos	Soriano	2018
	<i>Eptesicus montanus</i>	5	Los Matreros	Maldonado	2018
		1	Cueva de Lázaro	Cerro Largo	2019
	<i>Lasiurus blossevillii</i>	1	Javier de Viana	Artigas	2018
	<i>Lasiurus ega</i>	2	Los Molinos	Soriano	2018
		2	Javier de Viana	Artigas	2018
		1	Arroyo Tres Cruces	Artigas	2018
	<i>Myotis albescens</i>	11	Javier de Viana	Artigas	2018
		2	Usina Cuñapirú	Rivera	2018
		5	Usina Cuñapirú	Rivera	2018
	<i>Myotis levis</i>	2	Javier de Viana	Artigas	2018
		1	Los Molinos	Soriano	2018
		1	Salamanca	Maldonado	2018
		1	Paso Manuel Díaz	Rivera	2018
	<i>Myotis pampa</i>	1	Paso Manuel Díaz	Rivera	2018
	<i>Myotis spp.</i>	7	Usina Cuñapirú	Rivera	2018
		7	Usina Cuñapirú	Rivera	2019
		2	Isla La Gotera	Cerro Largo	2019
		2	Cueva de la Tigra	Cerro Largo	2019
		1	Javier de Viana	Artigas	2018
		1	s/localidad	s/localidad	s/fecha

Estudios Moleculares

Extracción de ADN

A partir de las muestras tomadas, se extrajo el ADN total utilizando el Kit comercial Quick-DNA/RNA Pathogen Miniprep® (Zymo Research) siguiendo el protocolo especificado en el mismo y se las almacenó a -80°C hasta el momento de su análisis.

Amplificación de la región polimerasa viral del genoma

Se realizó una PCR anidada para amplificar un fragmento total de 200-300 pb el cuál codifica para la región parcial de la ADN polimerasa viral, utilizando cebadores degenerados según VanDevanter et al., 1996 (Figura 1 Anexo). Dado que es una región conservada, resulta un blanco ideal para la detección molecular de dicho virus. Para ello 1µL de extracto de ADN fue agregado a una mezcla conteniendo 12.65µL de H₂O estéril, 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)(Tabla 3) en un formato multiplex y 0.1µL de Taq Platinum®, completando un volumen final de 25µL. Partiendo del producto amplificado, se realizó una segunda ronda de amplificación donde se utilizó 2.5µL de los oligonucleótidos TGV e IYG (10 µM) (Tabla 3), una alícuota de 2.5µL de la primera ronda de PCR, 13.65µL de H₂O estéril, 2.5µL de Buffer de PCR 10X, 0.75µL de MgCl₂ (50mM), 0.5µL de dNTPs (10mM) y 0.1µL de Taq Platinum®. El protocolo de ciclado fue igual para ambas PCRs y consta de 45 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 46°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto y una extensión final de 72°C durante 7 minutos. Se utilizó como control positivo un extracto de la propagación de una cepa de HSV-1 en cultivo celular de línea Vero realizado en Moreira et al., 2021.

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para amplificar parcialmente el gen de la ADN polimerasa viral (VanDevanter et al., 1996).

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Polaridad	Ronda de PCR
DFA	GAYTTGCNAGYYTNTAYCC	+	1°
ILK	TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA	+	1°
KG1	GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT	-	1°
TGV	TGTAAC TCGGTGTAYGGNTTYACN GGNGT	+	2°
IYG	CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT	-	2°

Amplificación de la región glicoproteína gB del genoma

A las muestras positivas obtenidas realizando una amplificación parcial de la polimerasa viral se realizaron PCRs (simple y anidada) para amplificar una región parcial del gen que codifica para la glicoproteína de superficie gB, principal sitio

antigénico del virus (Ehlers et al., 2007; Wibbelt et al., 2007; James et al., 2020). Para ello se utilizó varios protocolos, donde se emplearon cebadores degenerados descritos previamente por Ehlers et al., 2007(Tabla 4 y Figura 2 Anexo), así como otros nuevos sintetizados específicamente para este estudio (Tabla5).

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para amplificar parcialmente el gen de la glicoproteína superficie gB (Ehlers et al., 2007).

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Polaridad	Referencia
2759	CCTCCCAGGTTCArTwyGCMTAyGA	+	Ehlers et al., 2007
2762	CCGTTGAGGTTCTGAGTGTArTArTTrTAyTC	-	Ehlers et al., 2007
2760	AAGATCAACCCCAC(n/i)AG(n/i)GT(n/i)ATG	+	Ehlers et al., 2007
2761	GTGTAGTAGTTGTACTCCCTrAACAT(n/i)GTyTC	-	Ehlers et al., 2007

A continuación se describen los protocolos de estos ensayos, usando diferentes tipos de enzimas y oligonucleótidos.

Protocolo Ehlers et al., 2007 con Taq Platinum®

Se llevó a cabo una PCR anidada para amplificar un fragmento de 450 pb. Para ello se realizó un primer round en un volumen final de 25 µL, dónde se colocaron 15.15 µL de H₂O estéril, 2.5 µL de Buffer de PCR 10X, 0.75 µL de MgCl₂ (50mM), 0.5 µL de dNTPs (10mM), 2.5 µL del oligonucleótido 2759 (10 µM), 2.5 µL del oligonucleótido 2762 (10 µM), 0.1 µL de Taq DNA Polimerasa Platinum (5 U/µL) y 1 µL del extracto del ADN. La mezcla se incubó 5 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 5 segundos a 96°C, 5 segundos a 45°C y 15 segundos a 68°C, con una extensión de 1 minuto a 72°C. Para el segundo round se empleó 2.5 µL del ADN amplificado anteriormente, 2.5 µL del oligonucleótido 2760 (10 µM) y 2,5 µL del oligonucleótido 2761 (10 µM) (Tabla 4), 13.65 µL de H₂O estéril, 2.5 µL de Buffer de PCR 10X, 0.75 µL de MgCl₂ (50 mM), 0.5 µL de dNTPs (10 mM) y 0.1 µL de Taq DNA Polimerasa Platinum (5 U/µL). El ciclado fue el mismo que el utilizado en la PCR 1.

Protocolo Ehlers et al., 2007 con modificaciones utilizando Fast Cycling (QIAGEN®)

Se llevó a cabo una PCR anidada para amplificar un fragmento de 450 pb. El primer round de la PCR se realizó en un volumen final de 20 µL, dónde se colocaron 10 µL del mix Fast Cycling (QIAGEN®), 4 µL de H₂O estéril, 1 µL del oligonucleótido 2759 (10 µM), 1 µL del oligonucleótido 2762(10 µM) y 4 µL del extracto de ADN. La mezcla se incubó 5 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 5 segundos a 96°C, 5 segundos a 45°C y 15 segundos a 68°C, con una extensión de 1 minuto a 72°C. La segunda amplificación empleó el mismo protocolo utilizando 2 µL del ADN amplificado anteriormente, 10 µL del mix Fast Cycling (QIAGEN®), 1µL del oligonucleótido 2760 (10 µM), 1 µL del oligonucleótido 2761(10 µM) (Tabla 4), aumentando el volumen de agua hasta alcanzar 20 µL. El ciclado fue el mismo que el utilizado en la PCR 1.

Protocolo Ehlers et al., 2007 con modificaciones utilizando Q5® High-Fidelity 2X Master Mix

Se llevó a cabo una PCR anidada para amplificar un fragmento de 450 pb. El primer round de la PCR se realizó en un volumen final de 25 µL, dónde se colocaron 12.5 µL del Master Mix Q5® Hot Start High-Fidelity (NEB), 6 µL de H₂O estéril, 1.25 µL del oligonucleótido 2759 (10 µM), 1.25 µL del oligonucleótido 2762(10 µM) y 4 µL del extracto de ADN. La mezcla se incubó 5 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 5 segundos a 96°C, 5 segundos a 45°C y 15 segundos a 68°C, con una extensión de 1 minuto a 72°C. La segunda amplificación empleó el mismo protocolo utilizando 2 µL del ADN amplificado anteriormente, 12.5 µL del Master Mix Q5® Hot Start High-Fidelity (NEB), 1.25 µL del oligonucleótido 2760 (10 µM), 1.25 µL del oligonucleótido 2761(10 µM) aumentando el volumen de agua hasta alcanzar 25 µL. El ciclado fue el mismo que el utilizado en la PCR 1.

Protocolo con nuevos cebadores

Utilizando las secuencias disponibles en las bases de datos junto con la herramienta "Primer design" dentro del programa Geneious Prime versión 2022.1.1. se crearon nuevos cebadores (Tabla 5) con los cuales se implementaron nuevos protocolos, algunos PCR simple (Protocolo A-D) y otros, PCR anidada (Protocolo E) para poder amplificar una región parcial del gen que codifica la glicoproteína de superficie gB (ectodominio).

Tabla 5. Cebadores sintetizados en este trabajo para la amplificación una región parcial del gen que codifica para la glicoproteína de superficie gB (ecotodominio)(Figura 6 Anexo).

Protocolo	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Polaridad	Ronda de PCR	Producto PCR
A	94F	CTCCACAAAAGCCTGAGGGT	+	1°	491 pb
	585R	GCCCAGGTCTTCCAAAATGC	-	1°	
B	681F	TGGGGGCATCATGATGATCG	+	1°	439 pb
	1120R	GGGAGGGGGTGTGTTAGTTG	-	1°	
C	112F	GTCCCCAAGGTTCAAGGACAC	+	1°	463 pb
	575R	TCCAAAATGCCACTGAACGC	-	1°	
D	485F	CACACAACTGTCCACGCTG	+	1°	215 pb
	700R	CGATCATCATGATGCCCCCA	-	1°	
E	94F mod	CTBYWCAAHAGYCTRAGGGT	+	1°	606 pb
	700R	CGATCATCATGATGCCCCCA	-	1°	
	112F	GTCCCCAAGGTTCAAGGACAC	+	2°	463 pb
	575R	TCCAAAATGCCACTGAACGC	-	2°	
	112F	GTCCCCAAGGTTCAAGGACAC	+	2°	473 pb
	585R	GCCCAGGTCTTCCAAAATGC	-	2°	

Protocolo A

Se realizó una PCR simple en un volumen final de 25 µL, dónde se colocaron 12.5 µL del Master Mix Q5® Hot Start High-Fidelity (NEB), 9 µL de H₂O estéril, 1.25 µL del oligonucleótido 94F (10 µM), 1.25 µL del oligonucleótido 585R (10 µM) (Tabla 5) y 1 µL del extracto de ADN. La mezcla se incubó 30 segundos a 98°C, seguido de 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 61°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión de 2 minutos a 72°C. También se probó cambiar el ciclado por 30 segundos a 98°C, seguido de 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión de 2 minutos a 72°C.

Protocolo B

La PCR siempre se realizó en un volumen final de 25 µL, dónde se colocaron 12.5 µL del Master Mix Q5® Hot Start High-Fidelity (NEB), 9 µL de H₂O estéril, 1.25 µL del oligonucleótido 681F (10 µM), 1.25 µL del oligonucleótido, 1120R (10 µM) (Tabla 5) y 1 µL del extracto de ADN. La mezcla se incubó 10 segundos a 98°C, seguido de 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 63°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión de 2 minutos a 72°C. También se probó cambiar el ciclado por 30 segundos a 98°C, seguido de 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión de 2 minutos a 72°C.

Protocolo C

Se realizó una PCR simple en un volumen final de 25 µL, dónde se colocaron 12.5 µL del Master Mix Q5® Hot Start High-Fidelity (NEB), 9 µL de H₂O estéril, 1.25 µL del oligonucleótido 112F (10 µM), 1.25 µL del oligonucleótido 575R (10 µM) (tabla 5) y 1 µL del extracto de ADN. La mezcla se incubó 30 segundos a 98°C, seguido de 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 61°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión de 2 minutos a 72°C. También se probó cambiar el ciclado por 30 segundos a 98°C, seguido de 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión de 2 minutos a 72°C.

Protocolo D

La PCR simple se realizó en un volumen final de 25 µL, dónde se colocaron 12.5 µL del Master Mix Q5® Hot Start High-Fidelity (NEB), 9 µL de H₂O estéril, 1.25 µL del oligonucleótido 485F (10 µM), 1.25 µL del oligonucleótido, 700R (10 µM) (Tabla 5) y 1 µL del extracto de ADN. La mezcla se incubó 10 segundos a 98°C, seguido de 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 63°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión de 2 minutos a 72°C. También se probó cambiar el ciclado por 30 segundos a 98°C, seguido de 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión de 2 minutos a 72°C.

Protocolo E

El primer round de la PCR se realizó en un volumen final de 25 µL, dónde se colocaron 12.5 µL del Master Mix Q5® Hot Start High-Fidelity (NEB), 8 µL de H₂O estéril, 1.25 µL del oligonucleótido 94F mod (10 µM), 1.25 µL del oligonucleótido 700R (10 µM) (Tabla 5) y 2 µL del extracto de ADN. La mezcla se incubó 30 segundos a 98°C, seguido de 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión de 2 minutos a 72°C. Con el producto amplificado anteriormente se realizaron dos PCRs por un lado se colocaron 12.5 µL del Master Mix Q5® Hot Start High-Fidelity (NEB), 9 µL de H₂O estéril, 1.25 µL del oligonucleótido 112F (10 µM), 1.25 µL del oligonucleótido, 575R (10 µM) (Tabla 5) y 1 µL del producto amplificado. Por otro lado se realizó una segunda PCR con una mezcla de 12.5 µL del Master Mix Q5® Hot Start High-Fidelity (NEB), 9 µL de H₂O estéril, 1.25 µL del oligonucleótido 112F (10

μM), 1.25 μL del oligonucleótido, 585R (10 μM) (Tabla 5) y 1 μL del producto amplificado. En ambos casos el ciclado fue el mismo que el utilizado en la PCR 1.

Electroforesis en gel de agarosa

Los amplicones resultantes fueron analizados en geles de agarosa al 1.5 % en buffer TAE 1x, teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™, EEUU). Además de las muestras, los controles positivos y negativos, se incluyó el marcador de peso molecular GeneRuler 100pb DNA Ladder (Invitrogen™, EEUU). La visualización de los productos fue realizada en un transiluminador bajo luz ultravioleta (UV).

Secuenciación

Los amplicones obtenidos, se enviaron a purificar y secuenciar a Macrogen Inc. (Corea del Sur). Todos los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones, utilizando los cebadores de la segunda ronda de la PCR anidada, tanto para polimerasa viral (IYG y TGV) como para glicoproteína de superficie gB (2760, 2761, 112F, 575R y 258R). Los electroferogramas obtenidos fueron cotejados y editados para su posterior análisis en el software BioEdit versión 7.2.5.0 (Hall 1999). Luego de la edición, dichas secuencias fueron comparadas con secuencias disponibles en la base de datos Genbank® del *NCBI* (disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), utilizando el programa de alineamiento BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, (disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para una identificación inicial.

Análisis filogenético

Una vez editadas las secuencias y cotejadas con la base de datos, se alinearon utilizando ClustalW (Thompson et al., 1994). Se utilizó el criterio de máxima verosimilitud y los modelos evolutivos GTR y K80 de sustitución de nucleótidos estimados por el software PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) (Guindon et al., 2010). Los soportes estadísticos de los nodos del árbol se calcularon mediante aLRT (approximate-likelihood ratio test), considerando significativos los valores por encima de 70%. En la construcción de la filogenia de la subfamilia *Betaherpesvirinae*, se utilizó la secuencia de HSV-1 (MW029379) como grupo externo. En cuanto a la subfamilia *Gammaherpesvirinae*, se empleó la secuencia (MT906861), la cual fue reportada como Beta-Hv en Moreira et al., 2021. Para obtener el árbol filogenético de

la glicoproteína gB del virus del herpes, se utilizó como grupo externo la secuencia de HSV-1 (K01760) obtenida de GenBank. Por último, para la filogenia de polimerasa de Gamma-Hv (Figura 15b) se usó como grupo externo la secuencia HSV-1 (M10792) también reportado en GenBank.

Análisis de distancias genéticas pareadas entre individuos

Con el fin de evaluar la diversidad genética relativa proporcionada por los segmentos genómicos analizados, es decir, la polimerasa y glicoproteína gB, se utilizó la distancia genética p (p-distance). Este cálculo se realizó con el software MEGA11 versión 11.0.11 (Tamura et al., 2021) en un subconjunto de secuencias de polimerasa y glicoproteína gB (Figura 4 y 5 Anexo).

Para todo par de individuos analizados se calcularon dos valores de distancia genética: distancia p entre individuos para la polimerasa viral y distancia p entre individuos para la glicoproteína gB. Estas distancias se representaron conjuntamente en un gráfico de dispersión, donde cada punto corresponde a un par de individuos y sus coordenadas corresponden a las distancias calculadas (para glicoproteína gB en el eje X y para polimerasa en el eje Y).

Los pares de individuos se clasificaron según si estaban compuestos por dos *D. rotundus* (rojo), dos insectívoros (azul), dos filostómidos no vampiros (gris) o por pares insectívoro-hematófago (negro). El procesamiento de las matrices de distancia y la construcción del gráfico se realizaron utilizando el lenguaje de programación R, versión 4.2.2 (R Core Team., 2022).

Para facilitar la comparación de las diferencias entre la distancias genéticas en la polimerasa viral y en la glicoproteína gB, se incluyó en los gráficos una línea de referencia $x=y$, que representa los pares que muestran una distancia igual en ambos marcadores.

RESULTADOS

Se analizó un total de 215 muestras de murciélagos pertenecientes a 13 de las 22 especies descritas en Uruguay (Figura 7; Tabla 6). La especie muestreada más frecuente fue el vampiro (*D. rotundus*) (n=92), seguido de individuos pertenecientes a varias especies del género *Myotis* (n= 44) y *Tadarida brasiliensis* (n=42), mientras que los murciélagos de las especies *Lasiurus blossevillii* y *Myotis pampa* fueron los menos representados (Tabla 6).

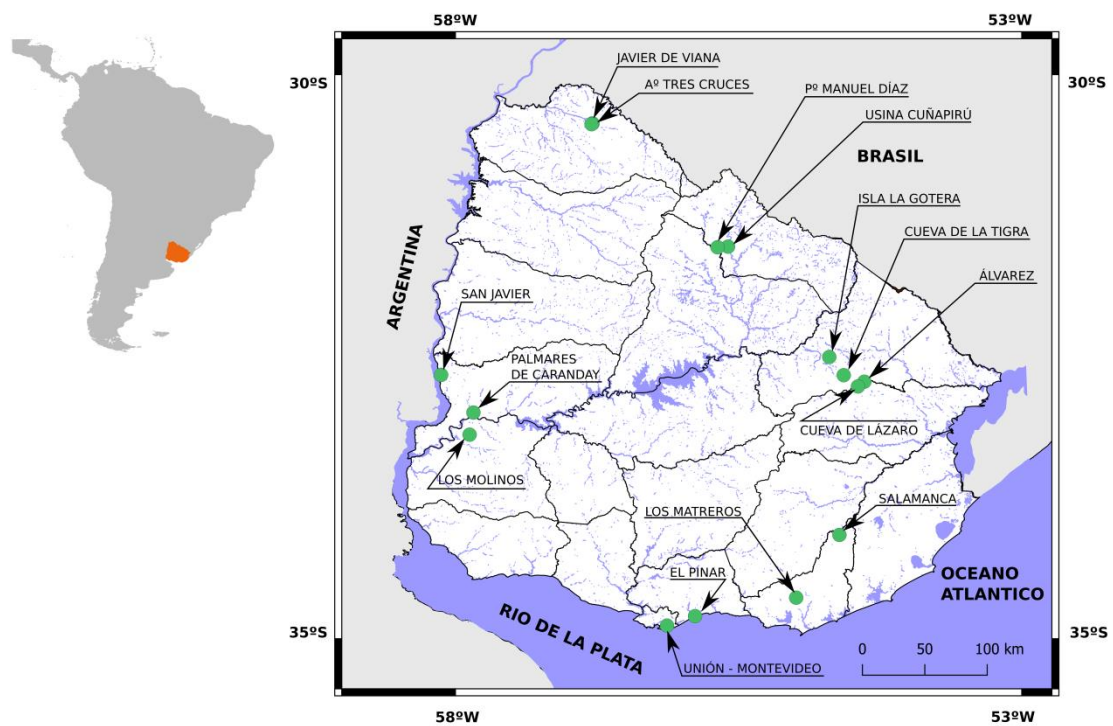


Figura 7. Posición continental de Uruguay, mostrando los 19 departamentos y la distribución geográfica de los sitios de muestreo dentro del país.

Tabla 6. Número de muestras positivas (amplificando un fragmento parcial de la polimerasa viral) por total de muestras analizadas de cada especie de murciélago indicando el porcentaje de prevalencia de Hv, la localidad y el año de donde fueron colectadas.

Familia	Especie	Muestras positivas	Prevalencia de Hv %	Localidad	Departamento	Año
Phyllostomidae	<i>Desmodus rotundus</i>	24/33	73	Salamanca	Maldonado	2017
		32/50	64	Salamanca	Maldonado	2018
		1/5	20	Usina Cuñapirú	Rivera	2018
		2/4	50	Álvarez	Cerro Largo	2019
Molossidae	<i>Eumops bonariensis</i>	0/1	0	Javier de Viana	Artigas	2018
		1/1	100	Los Molinos	Soriano	2018
	<i>Molossops temminckii</i>	3/3	100	Javier de Viana	Artigas	2018
		3/3	100	Los Molinos	Soriano	2018
	<i>Molossus molossus</i>	2/2	100	Los Matreros	Maldonado	2018
		2/2	100	Palmares de Caranday	Rio Negro	2019
		0/1	0	El Pinar	Canelones	s/fecha
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	16/24	67	Usina Cuñapirú	Rivera	2018
		9/12	75	Usina Cuñapirú	Rivera	2019
		3/3	100	San Javier	Rio Negro	2019
		0/1	0	Barrio Unión	Montevideo	2018
		0/1	0	s/localidad	s/localidad	2018
		0/1	0	s/localidad	s/localidad	s/fecha
Vespertilionidae	<i>Eptesicus spp</i>	0/1	0	Usina Cuñapirú	Rivera	2018
	<i>Eptesicus diminutus</i>	0/3	0	Los Molinos	Soriano	2018
	<i>Eptesicus furinalis</i>	1/3	33	Arroyo tres cruces	Artigas	2018
		1/4	25	Javier de Viana	Artigas	2018
		1/2	50	Los Molinos	Soriano	2018
	<i>Eptesicus montanus</i>	2/5	40	Los Matreros	Maldonado	2018
		1/1	100	Cueva de Lázaro	Cerro Largo	2019
	<i>Lasiurus blossevillii</i>	0/1	0	Javier de Viana	Artigas	2018
	<i>Lasiurus ega</i>	0/2	0	Los Molinos	Soriano	2018
		2/2	100	Javier de Viana	Artigas	2018
	<i>Myotis albescens</i>	1/1	100	Arroyo Tres Cruces	Artigas	2018
		9/11	82	Javier de Viana	Artigas	2018
		1/2	50	Usina Cuñapirú	Rivera	2018
	<i>Myotis levis</i>	5/5	100	Usina Cuñapirú	Rivera	2018
		1/2	50	Javier de Viana	Artigas	2018
		0/1	0	Los Molinos	Soriano	2018
		0/1	0	Salamanca	Maldonado	2018
		1/1	100	Paso Manuel Díaz	Rivera	2018
	<i>Myotis pampa</i>	5/7	71	Usina Cuñapirú	Rivera	2018
		6/7	100	Usina Cuñapirú	Rivera	2019
		0/2	0	Isla La Gotera	Cerro Largo	2019
		2/2	100	Cueva de la Tigra	Cerro Largo	2019
		1/1	100	Javier de Viana	Artigas	2018
		1/1	100	s/localidad	s/localidad	s/fecha

Detección de herpesvirus por PCR anidada del fragmento de la polimerasa viral

A partir de extractos de ADN de 215 muestras de hisopado bucal de murciélagos insectívoros y hematófagos, se logró amplificación genómica en 161 (74.8%) de ellos. El tamaño esperado de la amplificación es entre 200-300 pb (VanDevanter et al.,1996).

En la Figura 8 se muestran los amplicones de algunas muestras positivas y los controles correspondientes a modo de ejemplo.

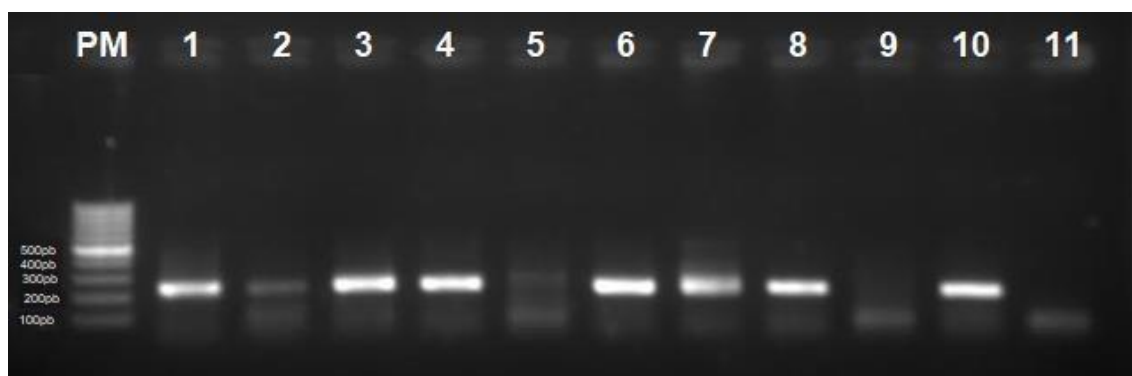


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TAE 1x teñido con SYBR Safe[®] (Invitrogen[™], EEUU) de los productos de PCR amplificados. PM: marcador de peso molecular GeneRuler de 100 pb (Thermo Scientific[™]). Carriles: 1-9 muestras, 10- control positivo (HVS-1), 11- control negativo.

Secuenciación y análisis filogenético de la polimerasa viral de Hv

De los 161 amplicones obtenidos se detectaron secuencias de buena calidad en 139 de ellos. En base a las mismas se identificaron murciélagos positivos para Hv en individuos de 11 especies (*D. rotundus*, *E. bonariensis*, *M. temminckii*, *M. molossus*, *T. brasiliensis*, *E. furinalis*, *E. montanus*, *L. ega*, *M. albescens*, *M. levis* y *M. pampa*) capturados en diferentes localidades del país (departamentos de Artigas, Cerro Largo, Maldonado, Río Negro, Rivera y Soriano) (Figura 7 y Tabla 6). Las restantes 22 secuencias no se incluyeron en los análisis por ser de mala calidad.

Las secuencias consenso obtenidas se sometieron al análisis con el programa BLAST para una clasificación inicial. A continuación, estas se alinearon y analizaron filogenéticamente junto con secuencias de referencia de la familia *Orthoherpesviridae* obtenidas de GenBank pertenecientes a diversas especies de murciélagos y otros vertebrados. Todas tuvieron similitud nucleotídica con secuencias de Gamma-Hv y Beta-Hv depositadas en la base de datos de GenBank, no encontrándose muestras pertenecientes a la subfamilia *Alphaherpesvirinae* (Tabla 7).

Tabla 7. Cantidad de muestras positivas del fragmento amplificado de la polimerasa para las subfamilias virales *Betaherpesvirinae* (60/139), *Gammaherpesvirinae* (79/139) y *Alphaherpesvirinae* (0/139) por especie de murciélago.

Especie	<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Alphaherpesvirinae</i>
<i>Desmodus rotundus</i>	0/59	59/59	0/59
<i>Eumops bonariensis</i>	1/1	0/1	0/1
<i>Molossops temminckii</i>	6/6	0/6	0/6
<i>Molossus molossus</i>	2/4	2/4	0/4
<i>Tadarida brasiliensis</i>	24/28	4/28	0/28
<i>Eptesicus furinalis</i>	2/3	1/3	0/3
<i>Eptesicus montanus</i>	0/3	3/3	0/3
<i>Lasiurus ega</i>	2/2	0/2	0/2
<i>Myotis albescens</i>	8/11	3/11	0/11
<i>Myotis levis</i>	2/6	4/6	0/6
<i>Myotis pampa</i>	1/1	0/1	0/1
<i>Myotis spp.</i>	12/15	3/15	0/15

Debido a la alta cantidad de muestras positivas obtenidas, se llevó a cabo un análisis separado especialmente en el grupo de murciélagos insectívoros, donde se obtuvo un número significativo de resultados positivos, se identificaron 60 secuencias para Beta-Hv y 20 secuencias para Gamma-Hv. A su vez, se realizó otra filogenia con las secuencias de Hv obtenidas de *D. rotundus* (N=59), pertenecientes a la subfamilia *Gammaherpesvirinae*. En cada caso, las filogenias se reconstruyeron utilizando secuencias reportadas previamente en Uruguay, así como secuencias de murciélagos y otros vertebrados disponibles en la base de datos de GenBank.

En las Figuras 9 y 10 se muestran los árboles filogenéticos reconstruidos en base a un fragmento parcial de la ADN polimerasa de Hv para las subfamilias *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae* respectivamente de los murciélagos insectívoros. Las secuencias obtenidas de GenBank (incluyendo Hv de murciélagos de Uruguay) se indican en color negro. Las secuencias generadas en el presente trabajo se indican en color bordó, con el código de laboratorio NM, señalando el género, la especie y el departamento de donde fueron colectadas las muestras de murciélago.

El análisis filogenético de la subfamilia *Betaherpesvirinae*, muestra que las secuencias obtenidas en el presente trabajo de murciélagos insectívoros (N=60) se distribuyen formando varios grupos junto con las secuencias tomadas de las bases de datos y con las previamente reportadas en el país (Figura 9). El grupo más basal de esta filogenia está formado por las secuencias NM122 y NM98 de *M. molossus* capturados en los departamentos de Rio Negro y Maldonado; estas secuencias se agrupan con un Hv de *M. molossus* capturado previamente en el departamento de Rocha y otro ejemplar de Martinica. Este grupo muestra un soporte estadístico moderado (aLRT= 0,73) y un 98% de identidad de nucleótidos.

Por otro lado, se puede distinguir un gran grupo monofilético (aLRT= 1) compuesto exclusivamente por *T. brasiliensis* (95% de identidad), incluyendo muestras analizadas en este trabajo y otras pertenecientes a estudios previos, todas ellas colectadas en el mismo refugio (Usina Cuñapirú, departamento de Rivera), a excepción de la muestra NM120, tomada en la localidad de San Javier, departamento de Rio Negro.

Asimismo se identificó un único Hv en *E. bonariensis* (NM28), el cuál ocupa una posición intermedia en el árbol filogenético en relación al grupo previamente descrito de *T. brasiliensis* y el clado que se describe a continuación.

Se aprecia la formación de un grupo formado por virus de *M. temminckii* y un *E. furinalis* (NM27) capturados en los departamentos de Soriano y Artigas, el cual presenta un alto soporte estadístico (aLRT= 0,98) y una identidad nucleotídica del 100%.

Asociado a lo anterior, se observa un grupo (84% de identidad) de alto soporte estadístico (aLRT= 0,97) integrado por Hv de diferentes especies de murciélagos, incluyendo *E. furinalis* (NM48) y *T. brasiliensis* (NM 118, 57, 116 y 44), así como otros pertenecientes a estudios previos, capturados en los departamentos de Soriano, Rivera y Rio Negro.

El siguiente agrupamiento contiene secuencias de Hv de diversas especies del género *Myotis*, pertenecientes a este trabajo y a estudios previos de Uruguay (84% de identidad). Este se divide en dos subclados con altos soportes estadísticos, el grupo con más secuencias (aLRT= 1) incluye virus *M. albescens*, *M. Levis*, *M. pampa* y *Myotis*

spp, la mayoría colectados en el mismo refugio: Usina Cuñapirú y Javier de Viana. El subclado minoritario aLRT= 0,91 incluye virus de *M. levis* y *Myotis spp*, así como de otras especies de *Myotis* de Europa.

Finalmente, los primeros Hv detectados en *L. ega* en el país (NM55 y 25) se agrupan en un clado independiente, asociados a virus de *T. brasiliensis* (NM36 Y NM46) y emparentados con virus de murciélagos más divergentes obtenidos en GenBank con una identidad de nucleótidos de 69%.



Figura 9. Árbol filogenético de secuencias parciales del gen de la ADN polimerasa de *Orthoherpesviridae*, subfamilia *Betaherpesvirinae* encontrados en los murciélagos insectívoros (N=60). Las muestras se codifican como NM y se muestran las especies y localidades. La filogenia se infirió bajo el criterio de máxima verosimilitud y el modelo GTR de sustitución de nucleótidos. Los apoyos estadísticos de los nodos se calcularon mediante aLRT y se muestran los valores mayores a 0,70. Las secuencias descargadas se identifican por el número de acceso de GenBank.

En la Figura 10 se observa la filogenia obtenida para los Gamma-Hv de murciélagos insectívoros (N=20). Los virus identificados en *M. molossus* (NM 121 y NM 92) capturados en dos departamentos distintos (Rio Negro y Maldonado), forman un grupo (90% de identidad) con un alto soporte estadístico (aLRT= 1), junto con un Hv proveniente de *M. molossus* de Guyana Francesa.

Asimismo, los Hv asociados a *T. brasiliensis* se dividen en grupos distintos y no directamente emparentados en la filogenia. Las secuencias NM 106, 119 y 86 se agrupan con un alto soporte (aLRT=1), con Hv de estudios previos obtenidos de *Myotis spp* colectados en el mismo refugio (Usina de Cuñapirú) y una identidad nucleotídica del 96%. La excepción en este grupo es la secuencia NM 119 que proviene de un *T. brasiliensis* capturado en San Javier, departamento de Rio Negro. La secuencia restante de *T. brasiliensis* (NM34) se agrupa con virus previamente identificados en Uruguay de la misma especie y capturados en el mismo refugio (Usina de Cuñapirú), el cual presenta un alto soporte estadístico (aLRT= 0,92) y 85% de identidad de nucleótidos.

Como grupo emparentado a los Gamma-Hv de *D. rotundus* identificados previamente en Uruguay por Moreira et al., 2021, se identifica un conjunto de secuencias de Hv de varios géneros y especies. Las secuencias de Hv de *Eptesicus* (NM10, NM93 y NM95) forman un grupo (91% de identidad) a pesar de pertenecer a especies diferentes y haber sido capturados en localidades distintas. Estos aparecen relacionados a Hv de murciélagos más divergentes obtenidos en GenBank, este grupo presenta un soporte estadístico moderado (aLRT= 0,87). Adicionalmente, se observa la formación de otro grupo (aLRT= 0,99) que incluye secuencias de Hv de *Myotis*, junto con secuencias de *T. brasiliensis* y *Molossus rufus* obtenidas en trabajos anteriores capturados en Usina de Cuñapirú y en el departamento de Artigas. Además, se encuentra una secuencia de *E. montanus* (NM6) proveniente de Cerro Largo. Se trata del agrupamiento más heterogéneo en especies y localidades encontrado en este estudio.

La Figura 11 muestra el análisis filogenético de Hv provenientes de *D. rotundus* analizados en el presente trabajo (N=59) junto con secuencias de Guyana Francesa (James et al., 2020) obtenidas de GenBank y secuencias de Uruguay provenientes de Moreira et al., 2021 y Botto 2021. Las muestras de este estudio se indican en color bordó, con el código de laboratorio DB, indicando el género, la especie y el departamento de donde fueron colectadas (Figura 11).

Uno de los objetivos en este estudio consistió en analizar las recapturas de la especie *D. rotundus* de la localidad de Salamanca. Para facilitar la identificación, se marcaron en color verde las muestras correspondientes a murciélagos que fueron recapturados en distintos periodos, identificados como A, B y/o C (Figura 11).

Los *D. rotundus* se dividen en dos clados principales: uno mayoritario y otro minoritario. El grupo mayoritario, con 99% de identidad nucleotídica y un soporte estadístico aLRT= 0,75, incluye las secuencias de Hv de *D. rotundus* analizadas en este estudio, así como las previamente reportados en el país. Por otro lado, el grupo minoritario (88% de identidad) se divide a su vez en dos subclados: el primero (aLRT= 0,99) contiene 11 secuencias, incluyendo los Hv identificados en este trabajo capturados en Maldonado y virus reportados previamente en individuos de Lavalleja y Maldonado, así como dos Hv de *D. rotundus* provenientes en Guyana Francesa. El segundo subclado (aLRT=1) del grupo minoritario está formado únicamente por dos Hv de *D. rotundus* de Guyana Francesa.

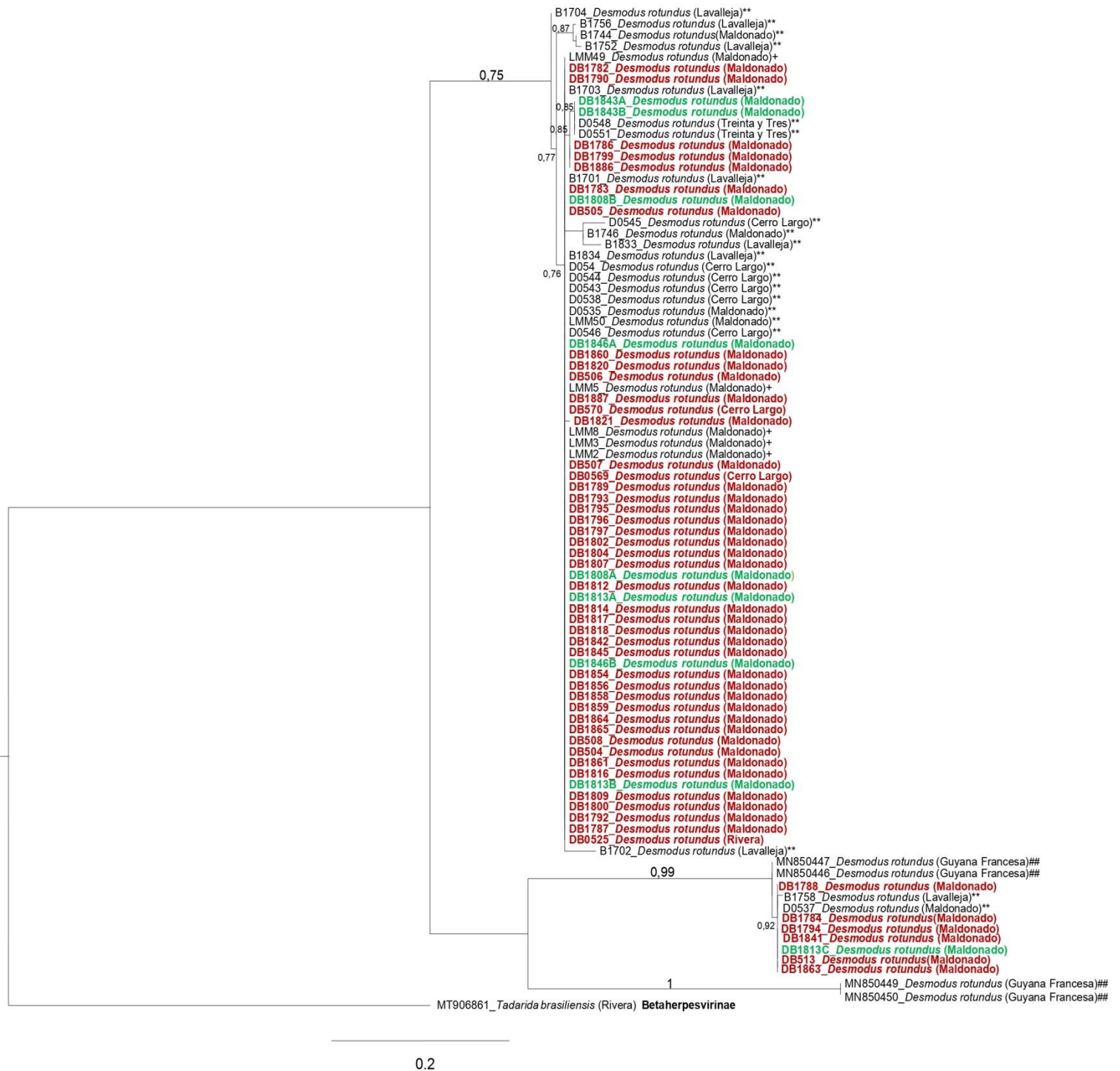


Figura 11. Árbol filogenético obtenido a partir de la ADN polimerasa de *Orthoherpesviridae* (parcial), subfamilia *Gammaherpesvirinae* para la especie *Desmodus rotundus* (N=59). Las secuencias de este trabajo se codifican en color bordó como DB y en color verde las muestras que pertenecen a murciélagos que fueron recapturados en distintos periodos indicándose con la letra A,B y/o C. Las secuencias indicadas en color negro con el símbolo (**) corresponden al trabajo Botto 2021, (+) Moreira et al 2021 y (#) James et al., 2020. La filogenia se infirió bajo el criterio de máxima verosimilitud y el modelo K80 de sustitución de nucleótidos. Los apoyos estadísticos de los nodos se calcularon mediante aLRT y se muestran los valores mayores a 0,70.

Cuatro murciélagos identificados como DB1808, DB1813, DB1843 y DB1846 fueron inicialmente marcados y recapturados entre dos o tres veces entre los años 2017 y 2018, como se muestra en el diagrama de la Figura 12a.

El individuo DB1808 tuvo dos recapturas (A y B), ambas secuencias son idénticas y se ubican en el clado mayoritario de la filogenia, integrando una politomía formada por 72 secuencias (Figura 11, 12 a y b y Figura 3 Anexo).

El murciélago DB1813 fue recapturado en tres ocasiones (A, B y C). Las secuencias de DB1813A y DB1813B son idénticas y se agrupan en la politomía del clado mayoritario (Figura 3 Anexo). Por otro lado, la secuencia DB1813C presenta 66 mutaciones (61 sustituciones nucleotídicas y 5 indels) y se encuentra en el clado minoritario, formando parte de una politomía junto con 11 secuencias. Además, es la que corresponde a la recaptura más tardía de ese individuo (Figura 11, 12 a y b).

El individuo DB1843 tuvo dos recapturas (A y B), ambas secuencias son idénticas y pertenecen a la politomía mencionada anteriormente (Figura 11, 12 a y b y Figura 3 Anexo), a pesar de haber sido muestreados con una diferencia de 7 meses.

Finalmente, el murciélago DB1846 fue recapturado en dos ocasiones (A y B) ambas secuencias son idénticas y se ubican también en la politomía del clado mayoritario (Figura 12b y Figura 3 Anexo).

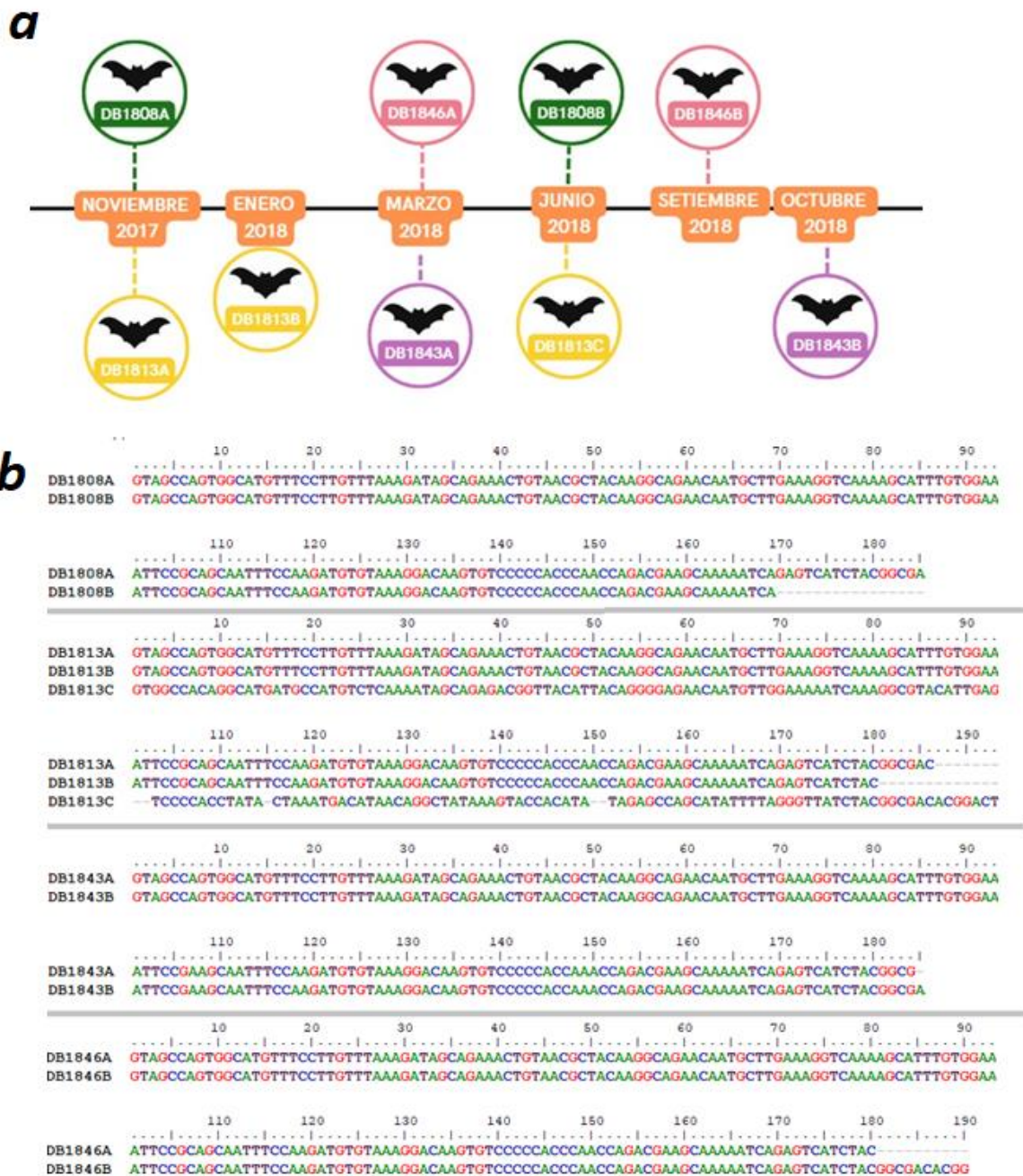


Figura 12a. Línea temporal de las recapturas realizadas para los individuos *D. rotundus* denominados (DB1808, DB1813, DB1843 y DB1846). **Figura 12b.** Alineamiento de las secuencias parciales que codifican el gen parcial de la ADN polimerasa de la familia *Orthoherpesviridae* pertenecientes a las recapturas (DB1808, DB1813, DB1843 y DB1846).

Amplificación del gen de la glicoproteína de superficie gB.

A partir de las muestras positivas que amplificaron un fragmento parcial de la polimerasa viral, se realizaron nuevos ensayos donde se utilizaron inicialmente los cebadores descritos por Ehlers y colaboradores, los cuales fueron diseñados para la amplificación genómica de la glicoproteína gB de Gamma-Hv. A fin de optimizar la amplificación de Hv de la subfamilia *Betaherpesvirinae*, se diseñaron oligonucleótidos específicos para dicha subfamilia.

A continuación se describen los resultados de estos ensayos, usando diferentes tipos de enzimas y oligonucleótidos.

PCR anidada para glicoproteína de superficie gB utilizando los cebadores descritos por Ehlers et al., 2007

El protocolo de PCR anidada donde se utilizó el kit mix Fast Cycling (QIAGEN®) permitió amplificar 21 extractos de ADN, resultando en una eficiencia del 10%. En la Figura 13 se muestran los amplicones de algunas muestras positivas y los controles correspondientes a modo de ejemplo. La utilización de una Taq Platinum® ADN polimerasa, así como el uso de una ADN polimerasa de alta fidelidad (Q5® High-Fidelity 2X Master Mix) no dieron resultados positivos en ninguna de las muestras analizadas (datos no mostrados).

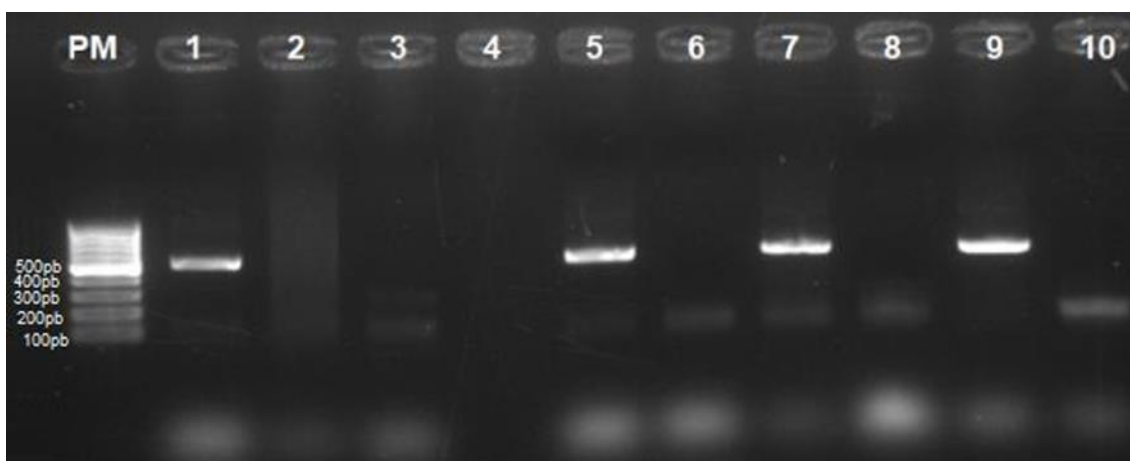


Figura 13. Gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR amplificados mediante el protocolo de Ehlers et al., 2007 con modificaciones. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; carriles 2 -8: Productos de PCR de las muestras; carril 9: Control positivo; carril10: Control negativo.

PCRs para glicoproteína de superficie gB utilizando nuevos cebadores

Para la puesta a punto de estas PCRs anidadas se utilizaron varios juegos de cebadores diseñados para la glicoproteína gB (amplificación parcial) descritos en la Tabla 5 y se probaron diferentes combinaciones. En la Figura 14 se muestra el resultado del protocolo E, donde se observaron múltiples fragmentos. Las secuencias obtenidas fueron de mala calidad, por lo que se descartaron para su posterior análisis. Para los protocolos A, B, C y D no se obtuvieron resultados positivos (datos no mostrados).

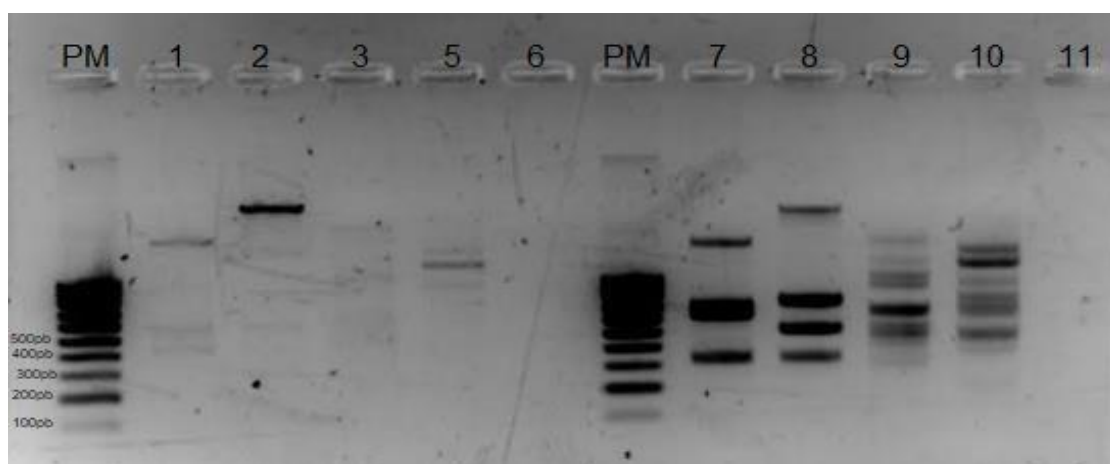


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TAE 1x teñido con SYBR Safe ® (Invitrogen™, EEUU) de los productos de PCR amplificados. PM marcador de peso molecular GeneRuler de 100 pb (Thermo Scientific). Carriles: 1-5, 7-10 muestras, 6 y 11 control negativo.

Análisis filogenético de la glicoproteína gB de herpesvirus de murciélagos insectívoros y hematófagos

La secuenciación de la glicoproteína gB se llevó a cabo con el protocolo de Ehlers modificado. En total se obtuvieron 21 secuencias: 11 secuencias de insectívoros (*Myotis spp*, *M. albescens*, *M. levis*, *E. montanus* y *M. molossus*) y 10 de *D. rotundus*.

En la Figura 15a se muestra el análisis filogenético de las secuencias parciales del gen de glicoproteína de superficie gB, las muestras analizadas se muestran en color bordó, con el código de laboratorio NMG y DBG, indicando el género, la especie y el departamento de donde fueron colectadas. Se incluyen en el análisis secuencias de Hv disponibles en la base de datos GenBank reportadas en trabajos previos (indicadas por género y especie en color negro).

Las secuencias de glicoproteína gB asociadas a *Myotis* se agrupan en dos clados. El primer clado incluye secuencias de gB de *M. albens* (NMG 22, 21 y 19) y *Myotis spp* (NMG54), a este grupo se suma un *D. rotundus* (NMG1814). Estos ejemplares fueron colectados en diferentes localidades de Artigas, Rivera y Maldonado. El segundo grupo, con un soporte estadístico de 0,97 está formado por secuencias de gB de *M. levis* (NMG 84, 29, 64 y 76) y *Myotis. spp* (NM77) colectados en el mismo refugio Usina Cuñapirú.

Asimismo se identificó una secuencia de gB de *E. montanus* (NMG6) proveniente de Cerro Largo, el cual ocupa una posición intermedia en el árbol filogenético en relación a los grupos previamente descritos y el clado de *D. rotundus* que se describe a continuación.

Las secuencias de gB de *D. rotundus* se agrupan en un clado único con un alto soporte estadístico (aLRT=0,97). Este grupo incluye muestras de ejemplares capturados en el mismo refugio (Salamanca, Maldonado) y secuencias de *D. rotundus* de Guyana Francesa. Por último, una secuencia de gB de *M. molossus* (NMG92) se agrupa con virus de otras especies provenientes de Guyana Francesa.

Utilizando las mismas muestras de la Figura 15a se realizó la reconstrucción filogenética basada en la ADN polimerasa, la que se observa en la Figura 15b. El objetivo fue determinar si la región analizada de la glicoproteína gB es más informativa filogenéticamente que la región analizada de la ADN polimerasa viral. Al comparar las dos filogenias (Figura 15 a y 15b) se observaron diferencias en la topología. En el caso de la polimerasa, los *D. rotundus* forman un clado exclusivo, mientras que con glicoproteína gB se identifica una secuencia que agrupa en el clado de *Myotis*. En cuanto a los *Myotis*, el análisis de la polimerasa los agrupa en un clado monofilético con un alto soporte (aLRT= 0,93), incluyendo una secuencia de *Eptesicus*, en tanto, en la filogenia de glicoproteína gB estos se agrupan en dos grupos incluyendo un ejemplar de vampiro. A su vez, la escala que indica el número de sustituciones por sitio en los árboles filogenéticos sugiere que el fragmento secuenciado es menos informativo.

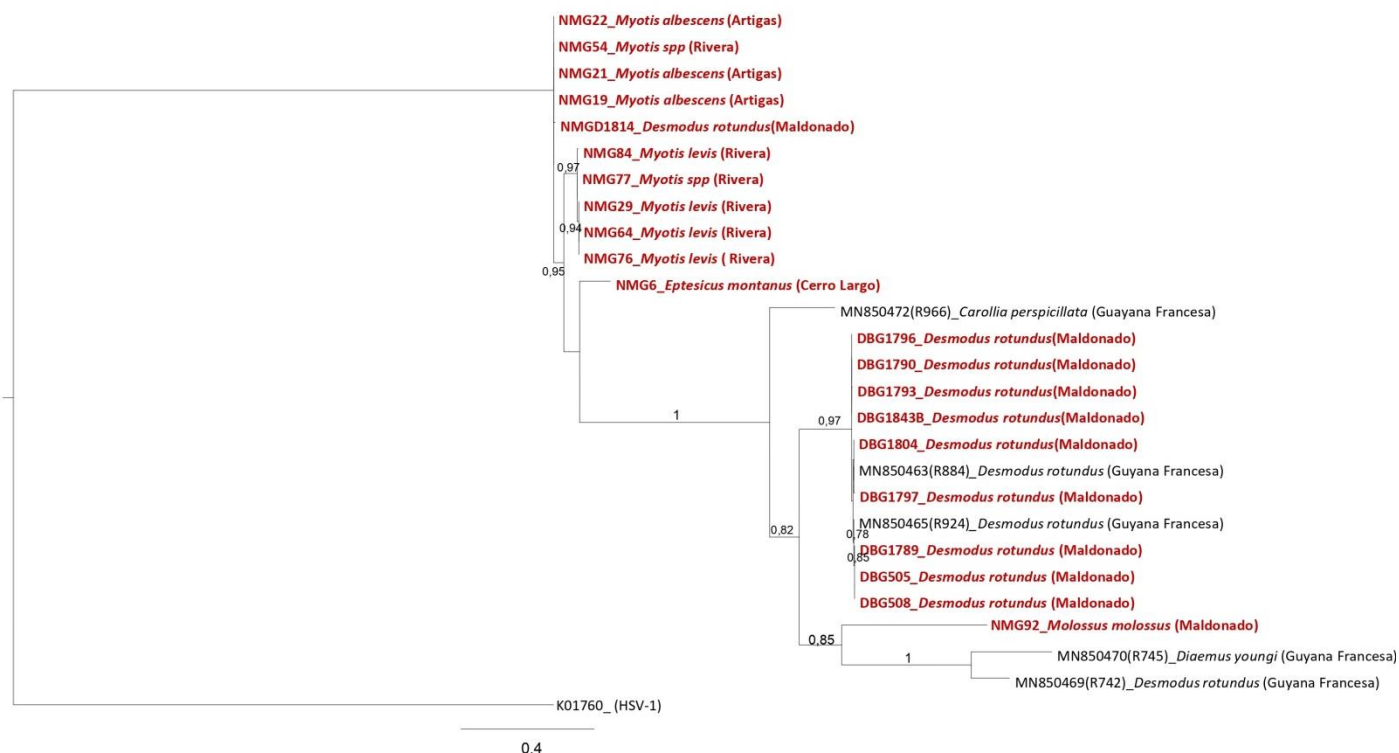
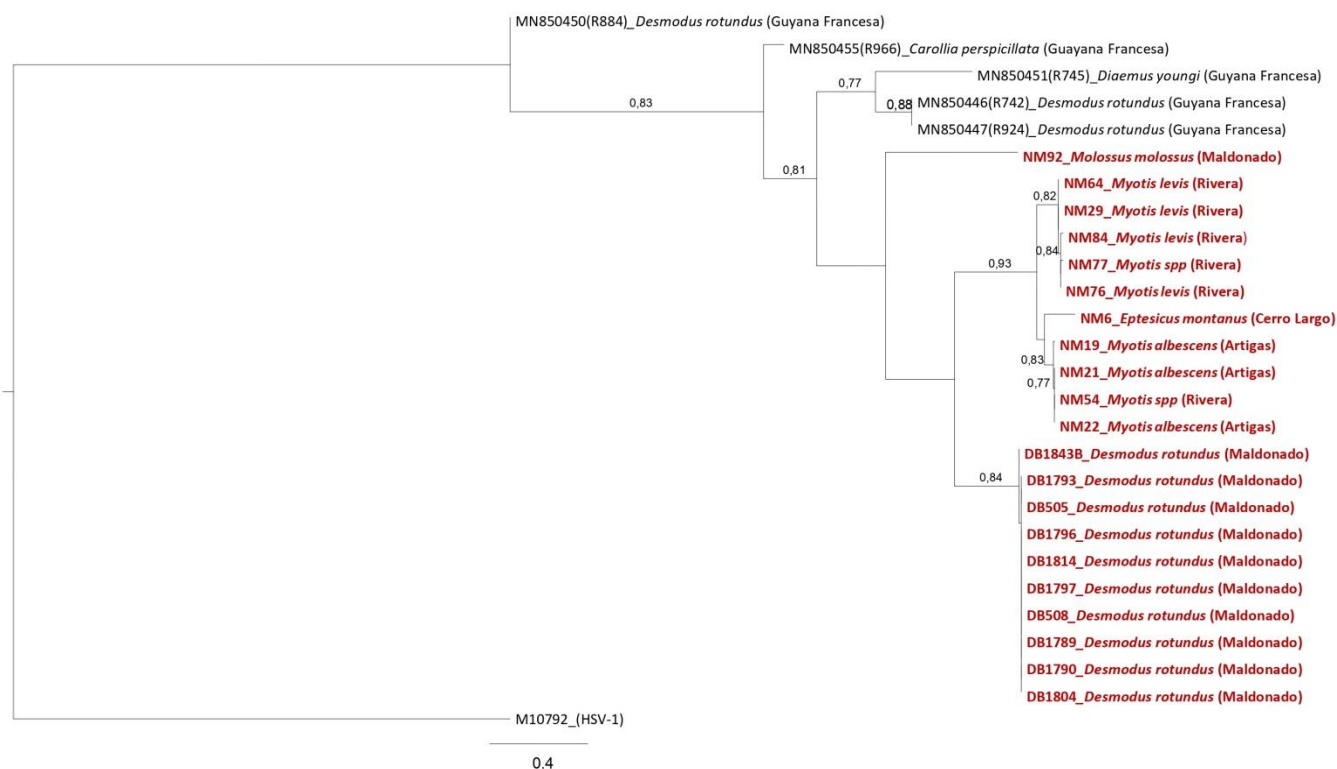
a**b**

Figura 15 a. Árbol filogenético del gen parcial de la glicoproteína de superficie gB. Las muestras positivas se codifican como NMG y DBG se indican las especies y localidades. La filogenia se infirió bajo el criterio de máxima verosimilitud y el modelo K80 de sustitución de nucleótidos. **Figura 15 b.** Árbol filogenético del gen parcial de la ADN polimerasa de *Orthoherpesviridae* subfamilia *Gammaherpesvirinae*. Las muestras positivas se codifican como NM y DB y se muestran las especies y localidades. La filogenia se infirió bajo el criterio de máxima verosimilitud y el modelo K80 de sustitución de nucleótidos. Los apoyos estadísticos de los nodos en ambos árboles se calcularon mediante aLRT y se muestran los valores mayores a 0,70. Las secuencias descargadas se identifican por el número de acceso de GenBank.

En la Figura 16 se presentan los gráficos que muestran las distancias entre las secuencias detectadas, donde se comparó las distancias obtenidas en los mismos pares de individuos para la polimerasa viral y para la glicoproteína gB. Cada medida correspondió a un par de secuencias detectadas en un par de individuos. Los pares de individuos se clasificaron según si estaban compuestos por dos *D. rotundus* (rojo), por dos insectívoros (azul), por dos filostómidos no vampiros (gris) o por pares insectívoro-hematófago (negro). Los puntos que se ubican por encima de la línea diagonal, corresponden a pares de individuos en los que se observó una distancia mayor en la polimerasa en comparación con la glicoproteína gB, mientras que los puntos que se encuentran por debajo de la diagonal corresponden a pares de individuos con mayor distancia en la glicoproteína que en la polimerasa. Este análisis se realizó considerando a todos los individuos de las filogenias presentadas en las Figuras 15 a y b, capturados en Uruguay. La realización de este análisis contó con la colaboración del Dr. Botto.

Se observó que la polimerasa viral es más informativa o al menos más variable en general, especialmente dentro de los pares de *D. rotundus* (representados en color rojo), mientras que la glicoproteína gB resulta más informativa en los insectívoros (representados en color azul).

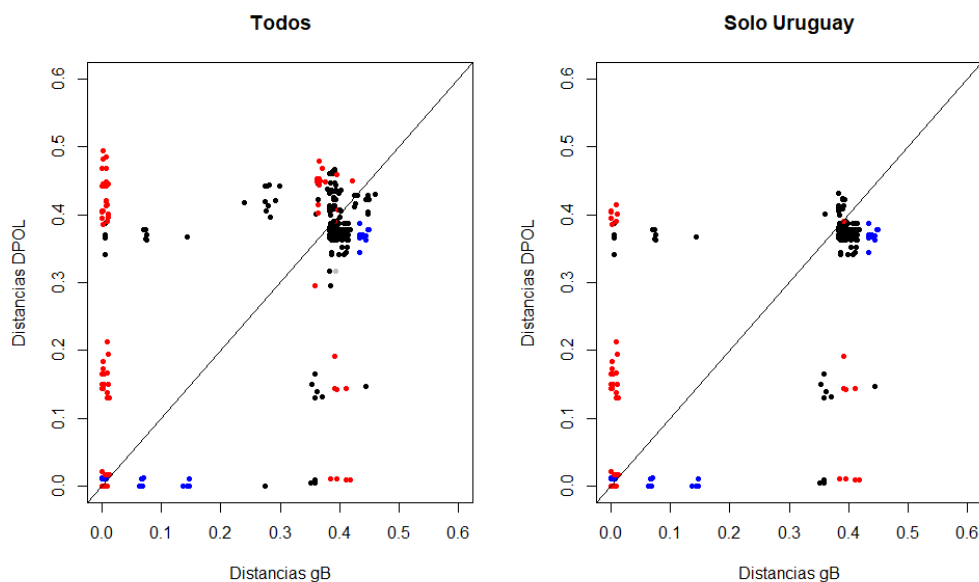


Figura 16. Distancias genéticas por pares para secuencias de polimerasa viral (eje y) y para la glicoproteína gB (eje x) en muestras de pares de *D. rotundus* (rojo), pares de insectívoros (azul), individuos del par *C. perspicillata* y *D. youngi* (gris). En negro pares de individuos que pertenecen a dos grupos diferentes.

DISCUSIÓN

Con el objetivo de ampliar el conocimiento acerca de Hv y la diversidad de especies infectadas, se analizaron 215 muestras de hisopados bucales de trece especies de murciélagos autóctonos de Uruguay.

En este trabajo se reporta por primera vez la detección de infección por Hv en individuos de las especies *E. bonariensis*, *E. montanus*, *L. ega* y *M. pampa*, siendo los primeros hallazgos en el país y la región. Además, se ha ampliado la diversidad viral en las especies *M. albescens*, *M. levis*, *E. furinalis*, *M. molossus*, *M. temminckii*, *T. brasiliensis* y *D. rotundus*. Estos nuevos resultados incluyen la identificación de Hv en localidades adicionales del territorio uruguayo, específicamente en los departamentos de Soriano, Rio Negro y Cerro Largo. Estos datos amplían el conocimiento obtenido a través de estudios previos realizados en el país por Moreira et al., 2021 y Botto 2021.

En este estudio se identificó globalmente un mayor número de individuos positivos para Gamma-Hv (N=79) en contraste con los Beta-Hv (N=60). Sin embargo, si consideramos únicamente los Hv de murciélagos insectívoros, se observó una mayor prevalencia de Beta-Hv (N=60) (Figura 9) en comparación con Gamma-Hv (N=20) (Figura 10). En cambio, cuando se analizan los *D. rotundus*, se encontraron infectados únicamente con Gamma-Hv (N=59) (Figura 11), lo cual concuerda con los resultados previos reportados en el país (Moreira et al., 2021; Botto 2021) y en estudios realizados en Guyana Francesa por James et al., 2020.

Es importante señalar que los cebadores utilizados en este estudio para amplificar el gen de la polimerasa (VanDevanter et al., 1996) son frecuentemente utilizados en la detección de Hv en murciélagos. Sin embargo, estudios recientes han indicado un sesgo hacia la detección para Gamma-Hv (Anthony et al., 2015) a pesar de que otros trabajos realizados en el Neotrópico utilizaron los mismos cebadores y han detectado considerablemente más Beta-Hv en muestras de vampiro (Wray et al., 2016; Griffiths et al., 2020). Por tanto, debemos considerar la posibilidad de que los murciélagos positivos para Gamma-Hv podrían estar infectados simultáneamente con Beta-Hv, pero estos serían menos detectables debido al sesgo en los cebadores utilizados (Moreira et al., 2021; Botto 2021). Esto sugiere la posibilidad de que haya casos de

coinfecciones no identificadas. Para detectar posibles coinfecciones, sería recomendable emplear otras técnicas complementarias, como el clonado de productos de PCR y/o secuenciación masiva. Estas técnicas se han utilizado en estudios anteriores, como los realizados por James et al., 2020; Griffiths et al., 2020 y Griffiths et al., 2022.

Se identificaron varios clados independientes en las filogenias realizadas, tanto dentro de la subfamilia *Betaherpesvirinae* como en los *Gammapherpesvirinae* (Figura 9 y 10). Observándose diversos grupos de Hv asociados a murciélagos de diferentes especies como *T. brasiliensis*, *M. albescens*, *M. levis*, *M. pampa*, *M. molossus*, *M. temminckii* y *D. rotundus*, independiente de la localización geográfica de los individuos infectados. Esto sugiere que la similitud entre los virus se explica fundamentalmente por la identidad de especie de los murciélagos hospedadores y no por su localización geográfica, es decir, sería una asociación especie específica. Sin embargo, en este estudio encontramos varias excepciones a este tipo de asociación. En la filogenia de los Beta-Hv (Figura 9), se observa un grupo que incluye secuencias de Hv de diversas especies género *Myotis*, obtenidas tanto en este trabajo como en estudios previos de Uruguay junto con dos secuencias provenientes de *T. brasiliensis* (LMM43 y LMM46), capturados en el mismo refugio (Usina Cuñapirú) con una diferencia de aproximadamente 3 años; en este caso, la similitud viral parece ser independiente de la identidad taxonómica de los murciélagos, ya que éstos son especies y familias distintas. En dicho refugio, se encuentra una colonia mixta formada por estas especies, y a pesar de pertenecer a diferentes familias, se observa una convivencia muy cercana entre ellas (Botto et al., 2018; Moreira et al., 2021). Estos resultados sugieren la persistencia de la circulación de virus muy similares en esta colonia, que infectan individuos en estrecho contacto, independiente de su grado de parentesco.

Asimismo, en la filogenia de los Beta-Hv (Figura 9) se identificó un clado formado por *M. temminckii* (NM41 y NM38) y un *E. furinalis* (NM27) capturados en la misma localidad (Javier de Viana, Artigas) en este caso, la estructura filogenética también sugiere que la asociación entre los virus podría ser impulsada mayoritariamente por similitudes ecológicas.

En la filogenia de los Gamma-Hv (Figura 10), se encuentra un grupo formado por Hv de *T. brasiliensis* (NM106, 119 y 86) junto con virus de la misma especie (LMM15) y dos Hv de *Myotis spp* (LMM39 y 42), estos últimos reportados en Moreira et al., 2021. Esta asociación está influida fuertemente por similitudes ecológicas, ya que, independientemente del año de muestreo (2015, 2018, 2019), la mayoría de los individuos fueron capturados en el mismo refugio (Usina Cuñapirú). Sin embargo, en ese grupo aparece un *T. brasiliensis* (NM119) capturado en otra localidad (Rio Negro), por lo que el factor ecológico no explica totalmente este clado.

En estos ejemplos, la estrecha relación entre murciélagos de diferentes especies podría ser favorable para el intercambio de virus (Calisher et al., 2006; Luis et al., 2013; Serra-Cobo & López-Roig 2017; Moreira et al., 2021; Botto 2021; Bolatti et al., 2022). En este sentido la relación filogenética de los virus podría estar impulsada primordialmente por similitudes ecológicas en lugar de la cercanía filogenética de los hospedadores, incluso cuando los murciélagos pertenecen a diferentes familias, como es el caso de las familias Molossidae y Vespertilionidae.

En las filogenias de las subfamilias *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*, se observaron diferentes agrupaciones de *T. brasiliensis*, una de las especies más muestreadas en este estudio, lo que sugiere que es posible que estén circulando dentro de cada subfamilia virus distintos. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis, se requieren estudios adicionales, como la utilización de técnicas de secuenciación masiva, tal como se ha demostrado en trabajos previos (Griffiths et al., 2020 y Griffiths et al., 2022). Estos estudios complementarios serían necesarios para obtener una comprensión más completa de la diversidad viral de *T. brasiliensis*.

Los virus encontrados en *D. rotundus* se identificaron como Gamma-Hv (Figura 11) y la mayoría ellos se agruparon en un clado junto con otras secuencias descriptas en los trabajos de Moreira et al., 2021 y Botto 2021. Este clado se ha expandido respecto a los trabajos mencionados anteriormente. Además, se ha identificado otro clado que ya fue mencionado en el estudio de Botto 2021, pero ahora se amplía con nuevas muestras aportadas por este estudio. Estos hallazgos revelan mejor la alta diversidad de los Hv en los *D. rotundus*, respecto a los trabajos iniciales realizados en el Uruguay.

Es importante destacar, que a pesar del amplio muestreo realizado, no se detectaron virus pertenecientes a la subfamilia *Betaherpesvirinae*.

El análisis de las recapturas realizadas en algunos individuos de la especie *D. rotundus*, nos permitió analizar la positividad y la diversidad viral. En el árbol filogenético y los alineamientos (Figura 11 y 12b), se observaron individuos infectados cuyas secuencias fueron idénticas a lo largo del tiempo (persistencia de la infección), así como la presencia de mutaciones en la región analizada, tal como se evidencia en la secuencia de Hv del individuo DB1813. En su tercera recaptura, se identificaron mutaciones en su secuencia nucleotídica y se agrupó en otro clado de la filogenia, lo que sugiere la posibilidad de que se trate de virus distintos. Es importante puntualizar que este hallazgo se basa en secuencias parciales, lo cual representa una limitación. Sin embargo este es el primer estudio de recapturas en Uruguay y constituye una herramienta que permite detectar diferencias que podrían indicar el desplazamiento de individuos mediante la observación de cambios en los virus. Este enfoque resulta de gran relevancia para el monitoreo de otras enfermedades de interés médico y veterinario, tales como el virus de la rabia y los coronavirus (Botto 2021).

Los cebadores descritos en la literatura para la amplificación de la glicoproteína gB (Ehlers et al., 2007; Wibbelt et al., 2007; James et al., 2020), fueron principalmente diseñados para Gamma-Hv. Con el fin de mejorar la eficiencia de la amplificación para la subfamilia *Betaherpesvirinae*, se sintetizaron nuevos cebadores. No obstante, la disponibilidad limitada de información en las bases de datos sobre esta subfamilia y las escasas secuencias disponibles provenientes de murciélagos que se encuentran alejados tanto filogenéticamente como geográficamente, fueron factores que limitaron el diseño de los cebadores. A pesar de esto, utilizando una versión modificada del protocolo planteado por Ehlers et al. 2007, se logró finalmente obtener 21 secuencias de glicoproteína gB, lo cual proporciona nueva información sobre los Hv presentes en Uruguay (Figura 15 a).

Comparando los dos marcadores, la polimerasa y la glicoproteína gB, se observan dos patrones distintos: uno para *D. rotundus* y otro para los insectívoros (Figuras 15 a y b y 16). En el caso de los Hv de *D. rotundus*, se evidencia que la polimerasa viral presenta un mayor nivel de información o, al menos, una mayor variabilidad en general. Estos

resultados son consistentes con los hallazgos reportados en el estudio previo realizado por James et al., 2020. Sin embargo, difieren de los obtenidos por Botto en 2021, lo cual no concuerda con la expectativa de una mayor variabilidad para la región analizada de gB (ectodominio). En cambio, cuando analizamos los Hv de insectívoros, se observa que la glicoproteína gB es más informativa, en concordancia con lo esperado.

Es de destacar que el fragmento de glicoproteína gB amplificado en este estudio corresponde al ectodominio de esta proteína, el cual desempeña un papel clave en la facilitación de la fusión del virus con la membrana celular durante la entrada del virus en las células del hospedero presentando. Esta región muestra amplia variabilidad genética, según lo reportado por Cooper et al., 2018 (Figura 6 Anexo).

Las diferencias encontradas en el ectodominio de gB entre los Hv de insectívoros y hematófagos estarían indicando patrones diferentes de variabilidad para cada grupo, por lo que ameritan ser analizados con mayor profundidad en estudios futuros.

CONCLUSIONES

- Se reportó una alta prevalencia (65%) de Hv en murciélagos de las 215 muestras analizadas. Se identificó por primera vez infección por Hv en individuos de las especies *E. bonariensis*, *E. montanus*, *L. ega* y *M. pampa*, siendo los primeros hallazgos en el país y la región. A su vez, se encontraron Hv en nuevas localidades del territorio uruguayo, en los departamentos de Soriano, Rio Negro y Cerro Largo.
- Se identificaron varios clados independientes en las filogenias realizadas, tanto dentro de la subfamilia *Betaherpesvirinae* como en los *Gammapesvirinae*. Específicamente, se encontraron 79 muestras positivas para Gamma-Hv y 60 muestras positivas para Beta-Hv. En algunos casos la similitud entre los virus se debe principalmente a la identidad de especie de los murciélagos hospedadores y no a su localización geográfica, lo que indica una asociación especie específica. En otros casos, la presencia de virus está impulsada principalmente por similitudes ecológicas en lugar de la cercanía filogenética de los hospedadores.
- En el contexto del análisis de la diversidad de Hv en *D. rotundus* se realizó el primer estudio longitudinal de seguimiento de individuos recapturados. Este enfoque se presenta como una herramienta que permitiría detectar desplazamiento de individuos, a través de la observación de cambios en los virus con potenciales aplicaciones en el rastreo de virosis de interés médico y veterinario.
- Se puso a punto una PCR anidada para la amplificación parcial de la glicoproteína de superficie (gB) de Gamma-Hv, obteniéndose 21 nuevas secuencias de Hv de murciélagos del Uruguay.
- En el análisis de la distancia genética (p-distance), se observó que la polimerasa viral es más informativa o al menos más variable como marcador molecular, especialmente para *D. rotundus*, mientras que la glicoproteína gB resulta más informativa en los Hv de murciélagos insectívoros.

PERSPECTIVAS

- Procesar muestras adicionales con el objetivo de ampliar la línea temporal y llevar a cabo estudios longitudinales con mayor número de secuencias.
- Profundizar en el estudio de las recapturas con abordajes como secuenciación masiva o secuenciación de clones a fin de identificar coinfecciones.
- Obtener mayor información de secuencia a fin de analizar estos virus desde el punto de vista aminoacídico.
- Dado que en este estudio se ha observado una mayor prevalencia de ciertas especies en comparación con otras, sería pertinente orientar los esfuerzos de futuras investigaciones hacia la obtención de una representación más equitativa de las especies que tuvieron una menor presencia en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Anthony, S. J., Islam, A., Johnson, C., Navarrete-Macias, I., Liang, E., Jain, K., Hitchens, P. L., Che, X., Soloyvov, A., Hicks, A. L., Ojeda-Flores, R., Zambrana-Torrel, C., Ulrich, W., Rostal, M. K., Petrosov, A., Garcia, J., Haider, N., Wolfe, N., Goldstein, T., Morse, S. S., ... Lipkin, W. I. (2015). Non-random patterns in viral diversity. *Nature communications*, 6, 8147. <https://doi.org/10.1038/ncomms9147>
- Avendaño, L (2011) Virologia Clínica. Editorial Mediterráneo. Capítulo 17 pag 213-215
- Azab, W., Dayaram, A., Greenwood, A. D., & Osterrieder, N. (2018). How Host Specific Are Herpesviruses? Lessons from Herpesviruses Infecting Wild and Endangered Mammals. *Annual review of virology*, 5(1), 53–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043227>
- Bascones-Martínez, A., & Pousa-Castro, X. (2011). Herpesvirus. *Avances en Odontoestomatología*, 27(1), 11-24.
- Baker, M. L., Schountz, T., & Wang, L. F. (2013 A). Antiviral immune responses of bats: a review. *Zoonoses and public health*, 60(1), 104–116. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01528.x>
- Baker, K. S., Leggett, R. M., Bexfield, N. H., Alston, M., Daly, G., Todd, S., Tachedjian, M., Holmes, C. E., Crameri, S., Wang, L. F., Heeney, J. L., Suu-Ire, R., Kellam, P., Cunningham, A. A., Wood, J. L., Caccamo, M., & Murcia, P. R. (2013 B). Metagenomic study of the viruses of African straw-coloured fruit bats: detection of a chiropteran poxvirus and isolation of a novel adenovirus. *Virology*, 441(2), 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.03.014>
- Bolatti, E. M., Viarengo, G., Zorec, T. M., Cerri, A., Montani, M. E., Hosnjak, L., Casal, P. E., Bortolotto, E., Di Domenica, V., Chouhy, D., Allasia, M. B., Barquez, R. M., Poljak, M., & Giri, A. A. (2022). Viral Metagenomic Data Analyses of Five New World Bat Species from Argentina: Identification of 35 Novel DNA Viruses. *Microorganisms*, 10(2), 266. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020266>
- Botto Nuñez, G., Genta, M., Díaz, M., Rodales, A.L. & González, E.M. (2018). Circannual sex distribution of the Brazilian free-tailed bat, *Tadarida*

brasiliensis (Chiroptera: Molossidae), suggests migration in colonies from Uruguay. *Mastozool Neotrop* 25:213-219

- Botto Nuñez, G., González, E.M., & Rodales, A.L. (2019 A). 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
- Botto Nuñez, G., Becker, D. J., & Plowright, R. K. (2019 B). The emergence of vampire bat rabies in Uruguay within a historical context. *Epidemiology and infection*, 147, e180. <https://doi.org/10.1017/S0950268819000682>
- Botto Nuñez, G (2021). Effect of Landscape fragmentation on bat population dynamics and disease persistence in Uruguay (Tesis de doctorado). Montana State University. Bozeman, Montana.
- 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>
- Carroll K.C., & Hobden J.A., & Miller S, & Morse S.A., & Mietzner T.A., & Detrick B, & Mitchell T.G., & McKerrow J.H., & Sakanari J.A.(Eds.), (2016). Herpesvirus. *Microbiología médica*, 27e. McGrawHill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/Content.aspx?bookid=1837§ionid=128959909>
- Cooper, R. S., Georgieva, E. R., Borbat, P. P., Freed, J. H., & Heldwein, E. E. (2018). Structural basis for membrane anchoring and fusion regulation of the herpes simplex virus fusogen gB. *Nature structural & molecular biology*, 25(5), 416–424. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0060-6>
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature reviews. Microbiology*, 17(3), 181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Davison A. J. (2010). Herpesvirus systematics. *Veterinary microbiology*, 143(1), 52–69. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.014>
- Ehlers, B., Küchler, J., Yasmum, N., Dural, G., Voigt, S., Schmidt-Chanasit, J., Jäkel, T., Matuschka, F. R., Richter, D., Essbauer, S., Hughes, D. J., Summers, C., Bennett, M., Stewart, J. P., & Ulrich, R. G. (2007). Identification of novel rodent

herpesviruses, including the first gammaherpesvirus of *Mus musculus*. *Journal of virology*, 81(15), 8091–8100. <https://doi.org/10.1128/JVI.00255-07>

- Escalera-Zamudio, M., Rojas-Anaya, E., Kolokotronis, S. O., Taboada, B., Loza-Rubio, E., Méndez-Ojeda, M. L., Arias, C. F., Osterrieder, N., & Greenwood, A. D. (2016). Bats, Primates, and the Evolutionary Origins and Diversification of Mammalian Gammaherpesviruses. *mBio*, 7(6), e01425-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01425-16>
- Fields B. N. Knipe D. M. & Howley P. M. (2013). *Fields virology* (6th ed.). Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Flint S. J. Racaniello V. R. Rall G. F. Skalka A. M. & Enquist L. W. (2015). *Principles of virology* (4th ed.). ASM Press.
- Gatherer, D., Depledge, D. P., Hartley, C. A., Szpara, M. L., Vaz, P. K., Benkő, M., Brandt, C. R., Bryant, N. A., Dastjerdi, A., Doszpoly, A., Gompels, U. A., Inoue, N., Jarosinski, K. W., Kaul, R., Lacoste, V., Norberg, P., Origgi, F. C., Orton, R. J., Pellett, P. E., Schmid, D. S., ... Davison, A. J. (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Herpesviridae* 2021. *The Journal of general virology*, 102(10), 001673. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001673>
- González, E. M & J. A. Martínez –Lanfranco. (2010). Mamíferos del Uruguay. Guía de campo e introducción a su estudio y conservación. Banda Oriental, Vida Silvestre & MNHN. Pp- 1- 464. Montevideo.
- Gorbunova, V., Seluanov, A., & Kennedy, B. K. (2020). The World Goes Bats: Living Longer and Tolerating Viruses. *Cell metabolism*, 32(1), 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.013>
- Griffiths, M. E., Bergner, L. M., Broos, A., Meza, D. K., Filipe, A., Davison, A., Tello, C., Becker, D. J., & Streicker, D. G. (2020). Epidemiology and biology of a herpesvirus in rabies endemic vampire bat populations. *Nature communications*, 11(1), 5951. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19832-4>
- Griffiths, M. E., Broos, A., Bergner, L. M., Meza, D. K., Suarez, N. M., da Silva Filipe, A., Tello, C., Becker, D. J., & Streicker, D. G. (2022). Longitudinal deep sequencing informs vector selection and future deployment strategies for transmissible vaccines. *PLoS biology*, 20(4), e3001580. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001580>

- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, 59(3), 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Hall, T.A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. (1999). Nucleic Acids Symposium Series-41: 95-98.
- Ho, D. Y., Enriquez, K., & Multani, A. (2020). Herpesvirus Infections Potentiated by Biologics. *Infectious disease clinics of North America*, 34(2), 311–339. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2020.02.006>
- Inagaki, T., Yamada, S., Fujii, H., Yoshikawa, T., Shibamura, M., Harada, S., Fukushi, S., Le, M. Q., Nguyen, C. T., Nguyen, T. T. T., Nguyen, T. T., Nguyen, T. T., Quach, V. T., Thong, V. D., Mori, K., Sasaki, M., Setiyono, A., Handharyani, E., Takeyama, H., Hasebe, F., ... Saijo, M. (2020). Characterization of a Novel Alphaherpesvirus Isolated from the Fruit Bat *Pteropus lylei* in Vietnam. *Journal of virology*, 94(18), e00673-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00673-20>
- International Committee on Taxonomy of Viruses <https://ictv.global/report/chapter/orthoherperviridae/orthoherperviridae>
- Irving, A. T., Ahn, M., Goh, G., Anderson, D. E., & Wang, L. F. (2021). Lessons from the host defences of bats, a unique viral reservoir. *Nature*, 589(7842), 363–370. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03128-0>
- James, S., Donato, D., de Thoisy, B., Lavergne, A., & Lacoste, V. (2020). Novel herpesviruses in neotropical bats and their relationship with other members of the Herpesviridae family. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 84, 104367. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104367>
- Kaján, G. L., Doszpoly, A., Tarján, Z. L., Vidovszky, M. Z., & Papp, T. (2020). Virus-Host Coevolution with a Focus on Animal and Human DNA Viruses. *Journal of molecular evolution*, 88(1), 41–56. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09913-4>
- 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, 7159.
<https://doi.org/10.3402/ehth.v4i0.7159>

- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., Wang, H., Cramer, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B. T., Zhang, S., & Wang, L. F. (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5748), 676–679. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>
- Luis, A. D., Hayman, D. T., O'Shea, T. J., Cryan, P. M., Gilbert, A. T., Pulliam, J. R., Mills, J. N., Timonin, M. E., Willis, C. K., Cunningham, A. A., Fooks, A. R., Rupprecht, C. E., Wood, J. L., & Webb, C. T. (2013). A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special?. *Proceedings. Biological sciences*, 280(1756), 20122753. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>
- Moratelli, R., & Calisher, C. H. (2015). Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses?. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(1), 1–22. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150048>
- Moreira Marrero, L., Botto Nuñez, G., Malta, L., Delfraro, A., & Frabasile, S. (2021). Ecological and Conservation Significance of Herpesvirus Infection in Neotropical Bats. *EcoHealth*, 18(1), 123–133. <https://doi.org/10.1007/s10393-021-01530-2>
- 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
- Programa para la Conservación de los Murciélagos de Uruguay (PCMU).(2023). <https://sites.google.com/site/murcielagosuruguay/especies-en-uruguay>
- Plowright, R. K., Parrish, C. R., McCallum, H., Hudson, P. J., Ko, A. I., Graham, A. L., & Lloyd-Smith, J. O. (2017). Pathways to zoonotic spillover. *Nature reviews. Microbiology*, 15(8), 502–510. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.45>
- Plowright, R. K., Reaser, J. K., Locke, H., Woodley, S. J., Patz, J. A., Becker, D. J., Oppler, G., Hudson, P. J., & Tabor, G. M. (2021). Land use-induced spillover: a call to action to safeguard environmental, animal, and human health. *The Lancet. Planetary health*, 5(4), e237–e245. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00031-0)

- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Sano, K., Okazaki, S., Taniguchi, S., Masangkay, J. S., Puentespina, R., Jr, Eres, E., Cosico, E., Quibod, N., Kondo, T., Shimoda, H., Hatta, Y., Mitomo, S., Oba, M., Katayama, Y., Sassa, Y., Furuya, T., Nagai, M., Une, Y., Maeda, K., Kyuwa, S., ... Mizutani, T. (2015). Detection of a novel herpesvirus from bats in the Philippines. *Virus genes*, 51(1), 136–139. <https://doi.org/10.1007/s11262-015-1197-6>
- Santana, S. E., & Cheung, E. (2016). Go big or go fish: morphological specializations in carnivorous bats. *Proceedings. Biological sciences*, 283(1830), 20160615. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0615>
- Sasaki, M., Setiyono, A., Handharyani, E., Kobayashi, S., Rahmadani, I., Taha, S., Adiani, S., Subangkit, M., Nakamura, I., Sawa, H., & Kimura, T. (2014). Isolation and characterization of a novel alphaherpesvirus in fruit bats. *Journal of virology*, 88(17), 9819–9829. <https://doi.org/10.1128/JVI.01277-14>
- Simmons, N. B. & Cirranello, A. L. (2023). *Bat Species of the World: A Taxonomic and Geographic Database*. <https://batnames.org/>
- Schountz T. (2014). Immunology of bats and their viruses: challenges and opportunities. *Viruses*, 6(12), 4880–4901. <https://doi.org/10.3390/v6124880>
- Schountz, T., Baker, M. L., Butler, J., & Munster, V. (2017). Immunological Control of Viral Infections in Bats and the Emergence of Viruses Highly Pathogenic to Humans. *Frontiers in immunology*, 8, 1098. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01098>
- Serra-Cobo, J., & López-Roig, M. (2017). Bats and Emerging Infections: An Ecological and Virological Puzzle. *Advances in experimental medicine and biology*, 972, 35–48. https://doi.org/10.1007/5584_2016_131
- Smith, I., & Wang, L. F. (2013). Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Current opinion in virology*, 3(1), 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.11.006>

- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Teeling, E. C., Vernes, S. C., Dávalos, L. M., Ray, D. A., Gilbert, M., 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>
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673– 4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- VanDevanter, D. R., Warrenner, 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. <https://doi.org/10.1128/JCM.34.7.1666-1671.1996>
- ViralZone- Herpesviridae.(2022). https://viralzone.expasy.org/176?outline=all_by_species
- Wibbelt, G., Kurth, A., Yasmum, N., Bannert, M., Nagel, S., Nitsche, A., & Ehlers, B. (2007). Discovery of herpesviruses in bats. *The Journal of general virology*, 88(Pt 10), 2651–2655. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83045-0>
- Wiederkehr, M. A., Qi, W., Schoenbaechler, K., Fraefel, C., & Kubacki, J. (2022). Virus Diversity, Abundance, and Evolution in Three Different Bat Colonies in Switzerland. *Viruses*, 14(9), 1911. <https://doi.org/10.3390/v14091911>
- Wilkinson, G. S., & South, J. M. (2002). Life history, ecology and longevity in bats. *Aging cell*, 1(2), 124–131. <https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2002.00020.x>
- Woo, P., & Lau, S. (2019). Viruses and Bats. *Viruses*, 11(10), 884. <https://doi.org/10.3390/v11100884>
- Wray, A. K., Olival, K. J., Morán, D., Lopez, M. R., Alvarez, D., Navarrete-Macias, I., Liang, E., Simmons, N. B., Lipkin, W. I., Daszak, P., & Anthony, S. J. (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>

- Zheng, X. Y., Qiu, M., Chen, S. W., Xiao, J. P., Ma, L. Z., Liu, S., Zhou, J. H., Zhang, Q. H., Li, X., Chen, Z., Wu, Y., Chen, H. F., Jiang, L. N., Xiong, Y. Q., Ma, S. J., Zhong, X. S., Huo, S. T., Ge, J., Cen, S. W., & Chen, Q. (2016). High prevalence and diversity of viruses of the subfamily Gammaherpesvirinae, family Herpesviridae, in fecal specimens from bats of different species in southern China. *Archives of virology*, 161(1), 135–140. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2614-9>

ANEXO

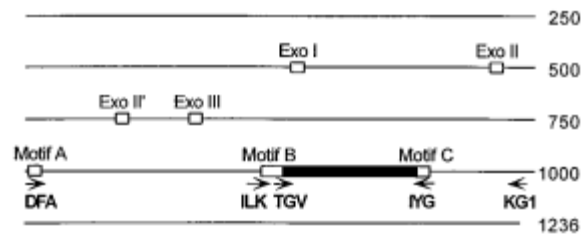


Figura 1. Posiciones relativas de la PCR para los cebadores DFA, ILK, KG, TGV e IYG (flechas) dentro de un mapa de codificación de aminoácidos del gen de la ADN polimerasa del virus del herpes humano 1. Extraída de VanDevanter et al., 1996.

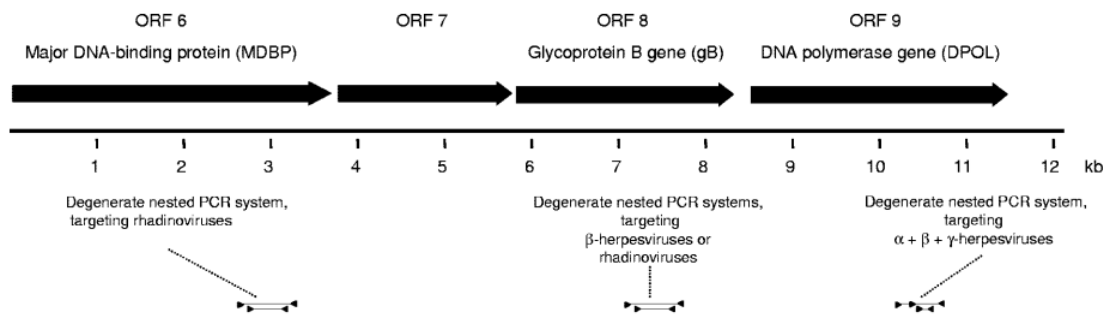


Figura 2. Mapa de la amplificación parcial del gen MDBP, el gen gB o el gen DPOL de Rhadinovirus, utilizando cebadores degenerados (triángulos negros). Extraída de Ehlers et al., 2007.

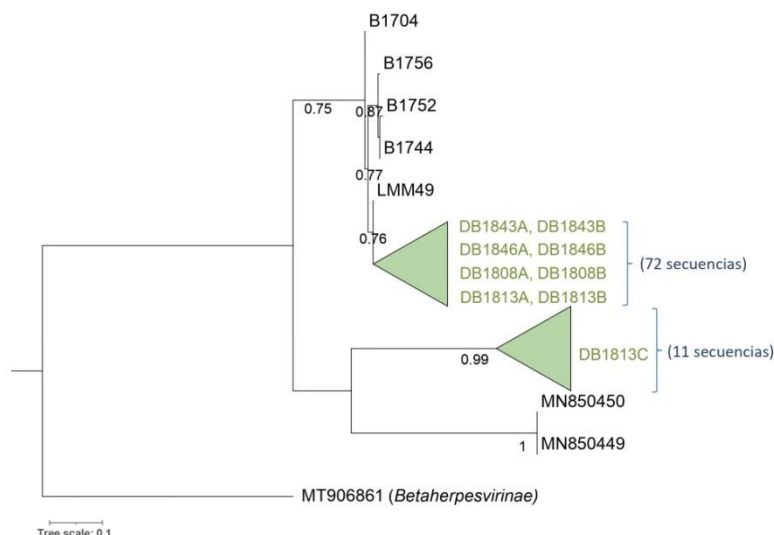


Figura 3. Árbol filogenético obtenido a partir de la ADN polimerasa de *Orthoherpesviridae* (parcial), subfamilia *Gammaherpesvirinae* para la especie *D. rotundus*, mostrando las politomías formadas. Se indican en verde las secuencias provenientes de eventos de recaptura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1. 1790																											
2. 1793	0.0																										
3. 1796	0.0	0.0																									
4. 1797	0.0	0.0	0.0																								
5. 1814	0.0	0.0	0.0	0.0																							
6. 508	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																						
7. 1843b	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																					
8. 505	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																				
9. 1804	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																			
10. 1789	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																		
11. 19	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4																	
12. 21	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0																
13. 22	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0															
14. 29	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.1	0.1	0.1														
15. 6	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.1	0.1	0.1	0.2													
16. 64	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.1	0.1	0.1	0.0	0.2												
17. 54	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1											
18. 76	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.1	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.1										
19. 77	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0									
20. 84	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0								
21. 92	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4							
22. R884	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5						
23. R742	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4					
24. R924	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0				
25. R966	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3			
26. R745	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4	0.3	0.3	0.4		
27. M10792 ext	0.6	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5	0.6	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5	0.5	0.6	0.6	

Figura 4. Diagrama obtenido de distancias genéticas en un subconjunto de secuencias de polimerasa utilizando la distancia genética p (p-distance).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1. 19																											
2. 21	0.0																										
3. 22	0.0	0.0																									
4. 29	0.1	0.1	0.1																								
5. 54	0.0	0.0	0.0	0.1																							
6. 6	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1																						
7. 64	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1																					
8. 76	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0																				
9. 77	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0																			
10. 84	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0																		
11. 92	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4																	
12. 1789	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4															
13. 1790	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0														
14. 1793	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0													
15. 1796	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0	0.0												
16. 1797	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0											
17. 1804	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0										
18. 1814	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4									
19. 505	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4									
20. 508	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0								
21. 1843b	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0							
22. R924	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0						
23. R884	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0					
24. R966	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3				
25. R745	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4			
26. R742	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2		
27. K01760HSV1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.5	0.6	

Figura 5. Diagrama obtenido de distancias genéticas en un subconjunto de secuencias de glicoproteína gB utilizando la distancia genética p (p-distance).

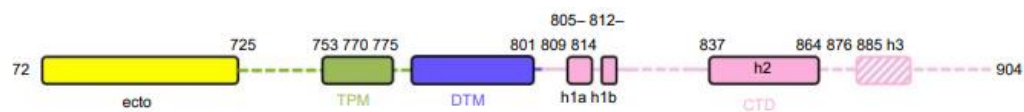


Figura 6. Diagrama de barras de la porción cristalizada de glicoproteína gBΔ71. Extraído de Cooper et al., 2018.